



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**Aislamiento y evaluación *in vitro* de organismos
antagonistas para el control de *Fusarium spp.*, agente
causal de la marchitez y Pokkah boeng en caña de azúcar**

SILVIA MARIEL HERNÁNDEZ VILLALOBOS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

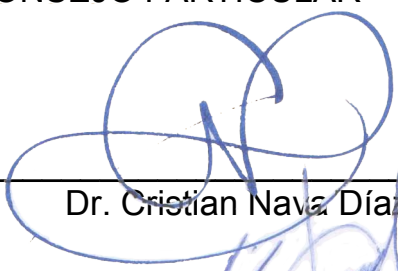
La presente tesis titulada: “**Aislamiento y evaluación *in vitro* de organismos antagonistas para el control de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez y Pokkah boeng en Caña de azúcar**”. Realizada por la alumna Silvia Mariel Hernández Villalobos, bajo la dirección del Consejo Particular indicado; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

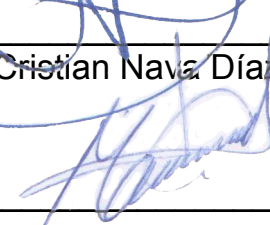
MAESTRA EN CIENCIAS

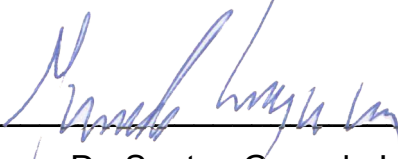
FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
_____ Dr. Cristian Nava Díaz

ASESORA: 
_____ Dra. Marianguadalupe Hernández Arenas

ASESOR: 
_____ Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESORA: 
_____ Dra. Bertha Tlapa Bolaños

Montecillo, Texcoco, México, noviembre 2014

Aislamiento y evaluación *in vitro* de organismos antagonistas para el control de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez y Pokkah boeng en Caña de azúcar

Silvia Mariel Hernández Villalobos, M.C
Colegio de Postgraduados, 2014

Se aislaron cepas nativas de *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., de suelos y plantas de caña de azúcar en el Estado de Morelos. La toma de muestras se realizó en los municipios de Jojutla, Tlaquiltenango, Zacatepec, Cuatla, Yautepec, Ciudad Ayala y Tlaltizapan. Se obtuvieron dos cepas de *Fusarium* de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) aislados de tejidos de plantas con síntomas de Pokkah boeng. Las cepas de *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp., se aislaron de raíces de plantas sanas y de suelo mediante la siembra de tejido en medio PDA y el método de dilución en serie y siembra en cajas Petri con agar nutritivo. La caracterización molecular se hizo utilizando las regiones ITS, el factor de elongación TEF 1 α y EF 1 α y la región 16S

Por medio de la identificación morfológica y molecular se determinó que uno de los aislados de *Fusarium* pertenece a *F. proliferatum* y el otro a *F. verticillioides*, se probó la patogenicidad de estos aislados inoculando cañas con una suspensión de esporas y ambas especies produjeron síntomas de la enfermedad en tallo.

Se obtuvieron 34 aislados de *Trichoderma*, y 52 bacterias, se evaluó la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp., y de las bacterias mediante la técnica de cultivos duales, se clasificó el antagonismo y se midió el porcentaje

de inhibición del patógeno. Los aislados que tuvieron mejor desempeño fueron CM3, CM14, CM21 y CM24 para *Trichoderma* y CMB10 y CMB13 para las bacterias. Con estos aislados se evaluó la producción de compuestos volátiles por medio de confrontaciones en cajas separadas y selladas y no volátiles por medio del crecimiento del patógeno en medio de cultivo con diferentes concentraciones de los filtrados del antagonista. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza. En cultivos duales los aislados de *Trichoderma* inhibieron al patógeno entre un 22% y un 40% mientras de las bacterias lo hicieron entre un 21% y un 34%, en cuanto a la producción de compuestos volátiles los aislados de *Trichoderma* inhibieron al patógeno entre un 8% y un 15% mientras las bacterias lo hicieron entre un 19% y un 27%, dichos aislados tienen la capacidad de producir compuestos no volátiles. CM21 y CM24 fueron los que mejores resultados presentaron, con la inhibición de los patógenos entre un 21% y un 53%. Estos seis antagonistas desempeñaron una fuerte competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis contra ambos *Fusarium*. Por último, de acuerdo a la caracterización morfológica y molecular se identificaron a CM3, CM21 y CM24 como *Trichoderma harzianum* Rifai, a CM14 como *Trichoderma asperellum* Samuels, Liechfeldt & Nirenberg, mientras que las bacterias fueron identificadas como *Bacillus subtilis* Ehreberg (CMB10) y *Bacillus amyloliquefaciens* Priest (CMB13)

Palabras clave: Metabolitos secundarios, compuestos difusibles, volátiles inhibitorios, *Trichoderma*, *Bacillus*

Isolation and *in vitro* evaluation of antagonistic organisms for control of *Fusarium* spp., causal agent of wilt and Pokkah boeng in sugarcane

Silvia Mariel Hernández Villalobos, M.C

Colegio de Postgraduados, 2014

Native strains of *Trichoderma* spp., and *Bacillus* spp., were isolated from soils and from plants of sugarcane in Morelos State. Sampling was conducted in Jojutla, Tlaquiltenango, Zacatepec, Cuatla, Yautepec Tlaltizapan, and Ciudad Ayala counties. Two strains of *Fusarium* were obtained from the collection of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) isolated from tissues of plants with symptoms of Pokkah boeng. *Trichoderma* spp., and *Bacillus* spp., were isolated from roots of healthy plants and soil by planting tissues on PDA medium and serial dilution and plated on Petri plate with nutrient agar method. Molecular characterization was done using ITS regions, the elongation factor EF 1 α and TEF 1 α and 16S region. 34 strains of *Trichoderma* and 52 bacteria, were obtained.

Fusarium were identified molecularly, and morphologically, of the two *Fusarium* isolates one corresponded to *F. proliferatum* and the other one to *F. verticillioides*, the pathogenicity of these *Fusarium* specie were tasted inoculating sugar cane stalks with a spore suspension, both of the isolated species produced disease symptoms in stalk. The antagonistic capacity of *Trichoderma* and bacteria samples were evaluated using the dual culture technique, the grade of antagonism was qualified and the percentage inhibition of the pathogen was measured. The isolates which offered the best control or inhibition the pathogen were CM3, CM14, CM21 and CM24 for *Trichoderma* and CMB10 and CMB13 for bacteria. These isolates were evaluated for the production of volatile compounds

by confrontation in separated plates and sealed, and nonvolatile by growth up the pathogen in culture medium containing different concentrations of antagonist filtrates Data obtained was subjected to a variance analysis test. In dual cultures *Trichoderma* isolates were able to inhibited the pathogen´s growth between 22% and 40% while the bacteria reduced the growth of the same pathogen between 21% and 34%, *Trichoderma* isolates with the production of volatiles inhibited the pathogen between a 8% and 15% while bacteria volatiles reduced the growth between 19% and 27%, these isolates also have the ability to produce non-volatile compounds, but, CM21 and CM24 presented the best results, they were cable of inhibiting the pathogen´s growth for up to 21% and 53% .These are very aggressive and competed for space and nutrients, they also displayed levels of mycoparasitism and antibiosis against both *Fusarium* species. The morphological and molecular characterization of the isolates CM3, CM21 and CM24 identified them as being *Trichoderma harzianum* Rifai, and CM14 as *Trichoderma asperellum* Samuels, Liechfeldt & Nirenberg, while the bacteria species isolated CMB10 and CMB13 were identified as *Bacillus subtilis* Ehreberg and *Bacillus amyloliquefaciens* Priest respectively.

Key words: Secondary metabolites, diffusible compounds, volatile inhibitory, *Trichoderma*, *Bacillus*

AGRADECIMIENTOS

A los mexicanos que pagan impuestos, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A mi consejo particular, Dr. Cristian Nava Díaz, Dra. Marianguadalupe Hernández Arenas, Dr. Santos Gerardo Leyva Mir y Dra. Bertha Tlapal Bolaños, por el esfuerzo, el tiempo, la dedicación y el apoyo incondicional para mi persona

A los profesores que fueron parte de mi formación académica.

A mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados, quienes me dieron su apoyo, su ayuda incondicional, e hicieron mi estancia en este país sumamente agradable.

DEDICATORIA

A DIOS, quien me ha bendecido de una y mil maneras

A mis padres, Johnny Hernández Vega y Sonia Villalobos Carvajal que son pilares fundamentales en mi vida; a mis hermanos Johnny, Juan Carlos y Viviana por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi bello sobrino Jeremy por iluminar mi vida

A mis cuñados Daniel y Mabel por formar parte de esta familia

Al resto de mi familia y amigos que siempre me tuvieron presente en sus oraciones

A Johan por su apoyo y palabras de aliento para seguir

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1. Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> spp. | 4 |
| 1.1 Marchitez (Wilt) | 4 |
| 1.2 Pokkah boeng | 5 |
| 1.3 Control..... | 5 |
| 1.4 Uso de Agentes de control biológico | 6 |
| 1.5 <i>Trichoderma</i> spp..... | 7 |
| 1.6 PGPR | 7 |
| 2. Hipótesis..... | 8 |
| 3. Objetivos | 8 |
| 4. Literatura citada | 9 |
| Capítulo I Caracterización molecular y confirmación de patogenicidad de aislados de <i>Fusarium</i> spp. asociados a caña de azúcar. | 14 |
| Resumen..... | 14 |
| Abstract..... | 15 |
| 1. Introducción..... | 15 |
| 2. Materiales y Métodos | 18 |
| 2.1. Obtención de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. | 18 |
| 2.2. Extracción de ADN | 18 |
| 2.3 Pruebas de patogenicidad..... | 19 |
| 3. Resultados y Discusión..... | 20 |
| 3.1. Caracterización molecular | 20 |
| 3.2 Pruebas de patogenicidad..... | 20 |
| 4. Literatura citada..... | 22 |
| Capítulo II Aislamiento y evaluación <i>in vitro</i> de organismos antagonistas para el control de <i>Fusarium</i> spp., agente causal de la marchitez y Pokkah boeng en Caña de azúcar. | 23 |
| Resumen..... | 23 |
| Abstract..... | 24 |
| 1. Introducción..... | 25 |
| 2. Materiales y Métodos | 28 |
| 2.1 <i>Obtención del patógeno</i> | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 Aislamiento de organismos antagonistas..... | 28 |
| 2.3 Evaluación preliminar..... | 28 |
| 2.4 Evaluación in vitro de <i>Trichoderma</i> spp (Cultivos duales)..... | 29 |
| 2.5 Evaluación in vitro de bacterias (Cultivos duales)..... | 30 |
| 2.6 Detección de posibles compuestos volátiles producidos por <i>Trichodermas</i> y bacterias..... | 30 |
| 2.7 Detección de posibles compuestos difusibles no-volátiles producidos por <i>Trichoderma</i> | 31 |
| 2.8 Detección de posibles compuestos difusibles no-volátiles producidos por bacterias..... | 32 |
| 2.9 Caracterización morfológica de los agentes de control biológico | 32 |
| 2.10 Evaluación del micoparasitismo por medio de microcultivos | 33 |
| 2.11 Identificación molecular de los organismos antagonistas | 33 |
| 3. Resultados | 34 |
| 3.1 Aislamiento de organismos antagonistas y evaluación preliminar..... | 34 |
| 3.2 Evaluación in vitro de <i>Trichoderma</i> spp y bacterias (Cultivos duales) contra <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 35 |
| 3.3 Efecto de compuestos volátiles producidos por <i>Trichoderma</i> y bacterias contra <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 37 |
| 3.4 Efecto de compuestos no volátiles producidos por <i>trichodermas</i> y bacterias aisladas de raíz y suelo en el cultivo de caña de azúcar, contra <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 38 |
| 3.4 Caracterización morfológica y molecular de los antagonistas | 40 |
| 3.6 Evaluación del micoparasitismo | 42 |
| 4. Discusión..... | 44 |
| 5. Literatura citada..... | 48 |
| Conclusiones..... | 59 |
| Recomendaciones..... | 59 |

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Cebadores y condiciones de PCR para la identificación de especies de <i>Fusarium</i> | 19 |
|--|----|

CAPITULO II

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Cebadores y condiciones de PCR para la identificación de Trichodermas (ITS, TEF 1 α) y bacterias (16 s) | 34 |
| Cuadro 2. Antagonismo en cultivos duales de cuatro aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp contra <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 36 |
| Cuadro 3 Antagonismo en cultivos duales de bacterias contra <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 36 |
| Cuadro 4. Efecto inhibitorio de compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp., y bacterias contra <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 37 |
| Cuadro 5. Efecto de compuestos no volátiles producidos por cuatro aislados de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 39 |
| Cuadro 6. Efecto de compuestos no volátiles producidos por dos bacterias sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i> | 39 |
| Cuadro 7. Medidas de las diferentes estructuras de CM3, CM21 y CM24 | 40 |
| Cuadro 8. Caracterización morfológica y bioquímica de CMB10 y CMB13..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Reproducción de síntomas típicos de Pokkah boeng en tallos de caña de azúcar con dos especies de *Fusarium*. Las flechas indican el lugar de la inoculación 21

CAPITULO II

Figura 1 . Distribución de las clases de antagonismo según la escala de Bell *et al*, 1982.....35

Figura 2. Inhibición de *F. Proliferatum* por parte de dos bacterias antagonistas38

Figura 3. Interacción de los antagonistas con *F. verticillioides* y *F. proliferatum* estructuras en forma de apresorio y enrollamiento.....43

INTRODUCCIÓN GENERAL

La caña de azúcar (género *Saccharum*) es uno de los cultivos industriales más importantes en el mundo. Se utiliza principalmente, para obtener azúcar y alcohol etílico (Martins *et al.*, 2009). Este cultivo crece en todas las regiones tropicales y subtropicales, en ambos lados de la línea ecuatorial hasta los 35° N y 35° S de latitud, (Gomes and Lima, 1964); se siembra en más de 90 países alrededor del mundo, donde los mayores productores son Brasil, India y China (FAOSTAT, 2014).

En México se siembra en 15 regiones, distribuidas en la costa del Pacífico, Área Central, Golfo de México y Área Caribeña de la Península de Yucatán, con una extensión de 845,162.67 ha y una producción de 61,182,077. 38 toneladas (SIAP, 2014).

La caña de azúcar, pertenece al género *Saccharum* L., que es parte de la familia de las Poaceas (gramíneas) y de la tribu Andropogonea. Esta tribu incluye gramíneas y cereales tropicales y subtropicales como *Sorghum* y *Zea* (maíz) (D'Hont *et al.*; 2008). Es una gramínea perenne, que se forma de la planta madre o de los tallo, puede alcanzar varios metros de longitud y son jugosas con alta concentración de sacarosa (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011).

Es un pasto con un metabolismo C4, altamente productivo, con una gran eficiencia fotosintética. El hábito de crecimiento de la planta se caracteriza por una aglutinación de tallos sólidos que llevan los nudos o uniones espaciadas regularmente de 10 a 25 cm de distancia, cada uno con un solo brote capaz de propagación asexual (Cordeiro *et al.*, 2007; Altpeter y Oraby, 2010).

La caña de azúcar tiene esencialmente cuatro fases de crecimiento: a) fase de establecimiento; la cual implica germinación y emergencia, ya sea en plantación

(plantillas) o en rebrote o retoños (socas y resocas) de los cuales crecerán nuevos tallos (macollamiento), b) fase de ahijamiento, formativa o reposo fisiológico, c) fase de crecimiento rápido, y d) fase de maduración y cosecha (Allen, 2006)

Según Cheavegatti-Gianotto *et al.* (2011), la caña de azúcar está ubicada taxonómicamente de la siguiente forma:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsida

SUBCLASE: Commelinidae

ORDEN: Poales

FAMILIA: Poaceae

SUBFAMILIA: Panicoideae

TRIBU: Andropogoneae

SUBTRIBU: Saccharinae

GÉNERO: *Saccharum*

ESPECIE: *S. officinarum*

S. spontaneum

Mukherjee. (1957), acuñó por primera vez el término “complejo *Saccharum*” que incluye los géneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Narenga* y *Miscanthus*. El género *Saccharum* está constituido por seis especies; cuatro domesticadas (*S. officinarum*, *S. edule*, *S. barberi*, *S. sinensis*) y dos silvestres (*S. spontaneum*, *S. robustum*) (Daniels y Roach, 1987).

Hoy en día, los cultivares de caña de azúcar son el producto del cruce entre especies del género *Saccharum*, las especies más importantes que conforman las variedades actuales son *S. officinarum* y *S. spontaneum* (Matsuoka *et al.*, 1999). La primera es ampliamente cultivada por acumular sacarosa, posee tallos de gran diámetro, hojas anchas y entrenudos cortos, bajo contenido de fibra y con baja tolerancia a climas tropicales sobre todo donde se producen heladas mientras que, *S. spontaneum* crece vigorosamente y está estrechamente adaptada a especies silvestres que contribuyen con los genes a la resistencia a enfermedades y estrés como sequías, inundaciones, salinidad, temperatura y congelación. Es más diversa genéticamente, los genotipos varían y van desde tipos cortos, hoja estrecha con apariencia de hierba que aparece casi sin tallo hasta tipos grandes con más de 5 metros de altura, son altos en fibra (Tew y Cobill, 2008).

Históricamente, varias enfermedades han afectado la producción de caña de azúcar. Estas constituyen una seria amenaza para la producción del cultivo en todos los lugares donde se siembra (Comstock, 2013; Huang *et al.*, 1994). Desafortunadamente esta amenaza continúa, el aumento acelerado en la incidencia de las enfermedades es preocupante y la rentabilidad está disminuyendo cada año ya que debido a las enfermedades, los países productores están perdiendo entre el 10% y el 15% de la producción de azúcar (Viswanathan y Rao. 2011; Comstock; 2013).

El cultivo se ve afectado por diferentes patógenos, entre ellos hongos, bacterias y virus. Los principales países productores como India y China reportan que las enfermedades fungosas de mayor importancia son: la podredumbre roja causado por *Colletotrichum falcatum* Wend, marchitez y Pokkah boeng causados

por *Fusarium sacchari* (E.J. Bluter) W. Gams, y *Fusarium moniliforme* Sheldon, el carbón, causado por *Ustilago scitaminea* Sydow, y la roya causada por *Puccinia melanocephala* Sydow y *P. kuehnii* Butl. Las enfermedades bacterianas más comunes son atribuidas a bacterias como la enfermedad de la escaldadura de la hoja causado por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, y el raquitismo de la soca causado por *Leifsonia xyli* subsp *xyli* (Davis *et al.*, 1980). Entre las enfermedades virales se pueden mencionar los mosaicos y amarillamientos de las hojas, causados por el *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y el *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) (Viswanathan y Rao, 2011; Huang, 2004).

1. Enfermedades causadas por *Fusarium* spp.

1.1 Marchitez (Wilt)

De las enfermedades fungosas más importantes destaca la marchitez que afecta seriamente en muchas regiones productoras de caña de azúcar. El agente causal asociado a esta enfermedad aun es tema de debate, en India, Butler y Khan. (1913), identificaron a *Cephalosporium sacchari*. Singh *et al.* (1975), reportan dos especies de *Acremonium*: *A. furcatum* y *A. terricola* y en menor grado *Fusarium moniliforme*. Waraitch. (1981), encontró a *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* presente en todos los aislados de plantas con síntomas de marchitez y ocasionalmente *Acremonium* sp. Viswanathan *et al.* (2011), compararon *Fusarium* obtenidos de tallos de caña con marchitez, encontraron que *F. sacchari* fue el que reprodujo los síntomas de marchitez, y que cepas como *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. napiforme* eran no patogénicas o menos virulentas.

La marchitez es una seria enfermedad del tallo que afecta el rendimiento de caña de azúcar en muchos países alrededor del mundo donde se cosecha, afecta la germinación, causa reducción en la producción, en la extracción y calidad del jugo (alrededor de 15% a 30%), así como reducción de hasta un 20% en la recuperación de la caña (Viswanathan y Rao, 2011).

1.2 Pokkah boeng

Pokkah boeng es una enfermedad fungosa causada por *Fusarium moniliforme* (teleomorfo: *Gibberella fujikuroi*). Sin embargo, existe un debate sobre la especie que está involucrada, debido a que se ha aislado a *F. andiyazi*, *F. sacchari*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, de tejidos afectados (McFarlane y Rutherford, 2010; Viswanathan *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2012). El micelio de *Fusarium moniliforme* puede presentar varios colores, desde blanco pálido pasando por rosado y llegando a púrpura, denso con apariencia afelpada y polvoriento debido a la formación de macroconidios (Vishwakarma *et al.*, 2013).

Singh *et al.* (2006), reportó que Pokkah boeng, reduce el peso, el largo, la circunferencia y la cantidad de entrenudos, así como la cantidad de jugo y el contenido de azúcar.

1.3 Control

Generalmente para el control de estas enfermedades se utilizan semillas de variedades resistentes y aplicaciones de fungicidas como carbendazim (1 g/l.), oxiclورو de cobre (0.2%), mancozeb al 0.3% (3 g/L), que son efectivos para la reducción de la enfermedad (Vishwakarma *et al.*, 2013). También se hacen desinfecciones del suelo, aplicando 1 o 2 kilos por hectárea de tiofanato

metílico (Campos *et al.*, 2012). Debido a que estos patógenos se pueden transmitir por medio del viento, lluvia, riego y sobreviven en desechos de caña en el suelo es necesario la aplicación de prácticas de manejo integrado (Vishwakarma *et al.*, 2011). Dentro de estas prácticas se debe utilizar variedades resistentes, remover y destruir los materiales de desecho de la cosecha así como una adecuada fertilización. Sin embargo, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias ambientalmente viables para el control de estas y otras enfermedades en el cultivo de caña de azúcar (Vishwakarma *et al.*, 2013).

1.4 Uso de Agentes de control biológico

Para el manejo de enfermedades existen varios métodos como el uso de productos de síntesis química, cultivos resistentes y el control biológico. El concepto de control biológico involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plaga (Heydari y Pessarakli, 2010) y es una alternativa promisoriosa al uso extendido de plaguicidas, los cuales a menudo son caros, se acumulan en el suelo o plantas y tienen un efecto adverso en los humanos (Nagorska *et al.*, 2007)

Dentro de los agentes de control biológico se pueden encontrar hongos como *Trichoderma* spp., y rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR siglas en inglés) de los géneros *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, y *Rhodococcus* entre otras (Babalola, 2010)

1.5 *Trichoderma* spp.

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre que se encuentran comúnmente en el suelo y en el ecosistema de las raíces, algunas cepas son oportunistas, poseen una simbiosis avirulenta con la planta y pueden establecer una colonización duradera en la superficie de las raíces o penetrar en la epidermis de las células por debajo de la misma (Harman *et al.*, 2004).

Las especies de *Trichoderma* pueden antagonizar y controlar un rango amplio de patógenos de plantas económicamente importantes incluyendo hongos, virus y bacterias (Harman, 2006). Este hongo actúa directamente sobre el patógeno por medio de micoparasitismo, producción de enzimas hidrolíticas, antibiosis y competencia por nutrientes, así como, la estimulación de mecanismos de defensa de las plantas y la producción de sustancias promotoras del crecimiento (Harman *et al.*, 2004; Benitez *et al.*, 2004)

1.6 PGPR

Las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) se encuentran en la rizosfera que define como la región alrededor de las raíces, son bacterias de vida libre que benefician de forma importante a la agricultura. Dentro de los efectos benéficos de las PGPR están el estímulo en el crecimiento y la salud de la planta, la supresión de enfermedades causada por patógenos y la asimilación de nutrientes (Babalola, 2010).

Las PGPR utilizan varios mecanismos para el control de las enfermedades entre ellos está el antagonismo y la competencia con hongos patógenos, producción de compuestos anti fúngicos, producción de sideróforos

y la producción de ácido indolacético entre otros (Shanahan *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 2008).

2. Hipótesis

De manera natural existe un balance entre los patógenos y los organismos benéficos en las raíces de las plantas sanas de caña de azúcar en Morelos. La hipótesis es que con medios convencionales es posible aislar a los organismos presentes en la rizosfera y determinar su potencial antagonista.

3. Objetivos

- Confirmar molecularmente la identidad de las especies de *Fusarium* spp. presentes en las principales zonas productoras de caña de azúcar de Morelos
- Determinar si las especies de *Fusarium* spp. aisladas son patogénicas en el cultivo de caña de azúcar
- Aislar microorganismos (hongos y bacterias) de la rizosfera de plantas sanas de caña de azúcar en Morelos.
- Evaluar *in vitro*, la capacidad antagónica de los microorganismos aislados contra *Fusarium* spp.

- Identificar bioquímicamente y molecularmente los hongos y bacterias con capacidad antagonista a *Fusarium* spp.
- Conservar y depositar las cepas más promisorias en el INIFAP para futuras evaluaciones en campo.

4. Literatura citada

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Micro Res.* 162: 173-181.

Allen R. G., 2006. Evapotranspiración del cultivo. Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos por organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación fao estudio FAO riego y drenaje 56, Roma, 323 p.

Altpeter, F., Oraby, H., 2007. Sugarcane. In: F. Kempken and C Jung (eds). *Genetic Modification of Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 64: 453-472

Babalola, O.O., 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-1570.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology.* 7: 249-260

Butler, E.J., and Khan, A.H., 1913. Some new sugarcane disease: Part I. Wilt. *Mem Dept. Agr. India. Bot. Ser.* 6. 180-190

- Campo, A., Cruz, E., Canul, J., 2012. Tecnología para el manejo y control de plagas y enfermedades en caña de azúcar en el estado de Morelos. SAGARPA-Inifap. Folleto para los productores.6: 1-15
- Cheavegatti-Gianotto A, H. M. Couto, P. Arruda, J.C. Bespalhok, W. Lee, S. Creste, L. di Ciero, J. Aparecido, A. Vargas de Oliveira, T. de Sousa, M F. Grossi-de-Sá, E C. Guzzo, H. P. Hoffmann, M. Guimarães de Andrade, N. Macedo, S. Matsuoka, F. de Castro, E. Romano, W. da Silva, M. de Castro, E. C. Ulian., 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biol.* 4:62–89.
- Comstock, J.C. 2013. Sugarcane Diseases: Futuristic Management Strategies. *Sugar Tech* 15(1):1–2
- Cordeiro, G., Amouyal, O., Elliott, F., Henry, R., 2007. C. Kole (ed). Sugarcane. In: *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, Vol 3. Pulses, Sugar and Tuber crops. 175-203
- Daniels, J., Roach, B.T., 1987. Taxonomy and evolution. In: D. Heinz (ed). *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 7–84
- Davis, M., Gillaspie, A., Harris, R., Lawson, R., 1980. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. *Science*. 210: 365-367.
- D’Hont, Menossi, M., Vincentz, M., Van-Sluys, M.A., Glaszmann, J.C., Ulian, E., 2008. Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol, and Bio-energy. In: P.H. Moore, R. Ming (eds) *Genomics of Tropical Crop Plants*: 483-513
- FAOSTAT. 2014. FAO. Statistical data bases. Consultado el 24 de octubre del 2014

- Gomes F.P., Lima U., 1964. A cana-de-açúcar no mundo. In: Malavolta et al (eds) Cultura e adubação da cana-de-açúcar. Instituto Brasileiro de Potassa, São Paulo, pp 11–26.
- Harman, G. E., 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84 (4): 377-393
- Harman, G. E., 2006. The Nature Application of Biocontrol Microbes: *Trichoderma* spp. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96 (2): 190-194
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2, 43-56
- Heydari, A., Pessarakli, M., 2010. A Review on Biological Control of Fungal Planta Pathogens Using Microbial Antagonists. Journal of Biological Sciences. 10 (4): 273-290.
- Huang H.N., Xu, Y.N., 1994. Preliminary discussion on sugarcane breeding for disease-resistance in mainland China..Sugarcane and Canesugar, 4: 5-10
- Huang S.L., 2004. Progress of sugarcane disease research in China: Recent Developments. Sugar Tech 6(4):261–265.
- Martin, J. P., H. L. Hong, and C. A. Wismer., 1961. Pokkah boeng. In Sugar-cane diseases of the world. Vol. 1, Elsevier Publ. Co. New York. 247-257
- Matsuoka S., García, A.A.F., Calheiros, G.C., 1999. Hibridação em cana de-açúcar In: Borém A (ed) Hibridação Artificial de Plantas. Viçosa: Editora UFV, 221–254p.

- McFarlane. G.P., Rutherford, R.S., 2010. *Fusarium* species causing Pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera: Pyralidae). Proc S Afr Sug Technol Ass. 83: 267 – 270.
- Mohammadi, A., Nejad, R.F., Mofrad, N.N., 2012. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. Plant Protect. Sci. 48 (2): 80-84.
- Mukherjee, S.K., 1957. Origin and distribution of Saccharum. Bot Gaz 119: 55-61.
- Nagorska, K., Bikowski, M., Obuchowki, M., 2007. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substance support usage of *Bacillus subtilis* as powerful biocontrol agent. Acta Biochim Pol. 54:495–508.
- Shanahan, P., O’Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., O’Gara, F., 1992. Isolation of 2,4-diacetylphlorogucinol from a fluorescent *pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production. Appl. Environ. Microbiol. 58. 353-358
- SIAP, 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Consultado 24 de octubre del 2014
- Singh, A., Chauhan, S.S., Singh, A., Singh, S.B., 2006. Deterioration in sugarcane due to Pokkah Boeng disease. Sugar Tech (2-3): 187-190
- Singh, K., and R.P. Singh., 1974. Involvement and pathogenicity of *Acremonium* in wilt syndrome of sugarcane. Sugarcane Pathologists’ Newsletter 11(12): 24–25.
- Singh, K., Singh, R.P., Agnihotri, V.P., 1975. Taxonomy and Pathogenicity of fungi causing sugarcane wilt syndrome. Indian Phytopatholgy. 6: 86-91

Viswanathan R., Poongothai, M., Malathi, P., 2011. Pathogenic and molecular confirmation of *Fusarium sacchari* causing wilt in sugarcane. Sugar Tech 13 (1): 68-76.

Viswanathan R., and G. P. Rao., 2011. Disease scenario and management of major sugarcane diseases in India. Sugar Tech 13(4):336–353.

Vishwakarma S.K., Kumar, P., Nigam, A., Singh, A., Kumar, A., 2013. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. J Plant Pathol Microb 4: 170.

Waraitch, K.S., 1981. Wilt disease in Co 1148 in Punjab and assessment of losses caused by it. Indian Sugar 31: 37–40.

Capítulo I Caracterización molecular y confirmación de patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. asociados a caña de azúcar.

Silvia Hernández-Villalobos^a, Marianguadalupe Hernández-Arenas^b, Santos Gerardo Leyva-Mir^c, Bertha Tlapal Bolaños^c, Cristian Nava-Díaz^a

^a Departamento de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. México

^b Departamento de Fitosanidad. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Inifap). Morelos, México

^c Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma de Chapingo. México

Resumen

Con el objetivo de complementar la caracterización de especies de *Fusarium* spp., presentes en zonas cañeras, se identificaron molecularmente dos cepas de *Fusarium* spp., procedentes del estado de Morelos de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) que fueron aislados de tejidos de plantas con síntomas de Pokkah boeng e identificadas morfológicamente. Para ello se hizo la extracción de ADN de cultivos monosporicos y el producto se envió a secuenciar a Macrogen (Corea), utilizando la región ITS1 e ITS4 y el factor de elongación TE-1 α . Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las especies identificadas a nivel morfológico y molecular fueron *Fusarium proliferatum* (Teleomorfo: *Gibberella intermedia*) y *Fusarium verticillioides* (Teleomorfo: *Gibberella moniliformis*). Se hicieron pruebas de patogenicidad de ambos *Fusarium* y ambos reprodujeron los síntomas de la enfermedad en tallos de caña de azúcar

Palabras clave: Patogenicidad, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, molecular

Abstract

In order to complement the characterization of species of *Fusarium* spp., present in sugar cane zones, two strains of *Fusarium* spp were molecularly identified from the Morelos state, of the collection of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), that were isolated from tissues of plants with Pokkah boeng symptoms and identified morphologically. DNA extraction was done with monospore cultures and the product was sent to sequencing in Macrogen (Korea) using the ITS1 and ITS4 regions and the elongation factor TE-1 α . The sequences were compared with the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The species identified at the morphological and molecular level were *Fusarium proliferatum* (Teleomorph: *Gibberella intermedia*) and *Fusarium verticillioides* (Teleomorph: *Gibberella moniliformis*). Pathogenicity tests were made both *Fusarium* and both reproduced symptoms of the disease in sugarcane stalks

Key words: Pathogenicity, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, molecular

1. Introducción

El cultivo de la caña de azúcar, a nivel mundial, es afectado por diversas enfermedades causadas por hongos, entre las que destacan: la roya común (*Puccinia melanocephala*), la roya naranja (*Puccinia kuehni*), la pudrición roja de la nervadura (*Colletotrichum falcatum*), el carbón (*Sporisorium scitamineum*) la

marchitez (*Fusarium moniliforme*) y el Pokkah-boeng (*Fusarium verticillioides*) (Ramírez y Nass, 2005).

Pokkah boeng es un término Javanés que denota malformación y distorsión de la parte superior, es una enfermedad potencialmente destructiva y está presente en casi todas las áreas productoras de caña de azúcar del mundo. El primer reporte se hizo en Java en 1896 por Walker y Went, después de este reporte la presencia de la enfermedad se ha informado en otros países. Varios trabajos indican que la gravedad de la enfermedad es muy alta en algunas variedades comerciales. La enfermedad comienza cuando la planta tiene de 3 a 7 meses de edad, en etapas avanzadas se presenta una podredumbre de los puntos de crecimiento y toda la parte superior de la planta muere (Martin *et al.*, 1961; Singh *et al.*, 2006; McFarlane y Rutherford, 2010; Vishwakarma *et al.*, 2013).

Los síntomas característicos de Pokkah boeng son la aparición de manchas cloróticas hacia la base de las hojas jóvenes, la base de las hojas afectadas a menudo es más estrecha en comparación con las hojas normales. Las hojas apicales pueden mostrar arrugas pronunciadas, malformaciones y una torsión. A medida que la infección se desarrolla, pueden aparecer rayas o pecas rojas pequeñas dentro de la zona clorótica y, posteriormente, en el envés de las hojas se puede apreciar sobre las lesiones un polvillo blanco característico, formado por las esporas del hongo. En los casos agudos la enfermedad muestra una distorsión del tallo con lesiones en forma de cortes en la parte interna y externa, también hay presencia de podredumbre en la parte apical del tallo y cogollos que pueden ocasionar la muerte de la planta. (Martin *et al.*, 1961; Lyrene *et al.*, 1977; Vishwakarma *et al.*, 2013). En un estudio hecho por Singh *et al.*

(2006), se midió varios parámetros para ver la calidad tanto en cañas sanas así como en cañas afectadas por Pokkah boeng, se obtuvo como resultado que el peso, el largo, la circunferencia y la cantidad de entrenudos disminuía, así como la cantidad de jugo y el contenido de azúcar en las cañas enfermas.

Pokkah boeng es una enfermedad fungosa causada por *Fusarium moniliforme* (teleomorfo: *Gibberella fujikuroi*). (Vishwakarma *et al.*, 2013). Sin embargo, en otras investigaciones se ha aislado a *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. sacchari*, y *F. proliferatum* de tejidos afectados que muestran los síntomas característicos de Pokkah boeng (Nirenberg y O'Donnell, 1998; McFarlane y Rutherford, 2010; Viswanathan *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2012). El micelio de *Fusarium moniliforme* puede presentar varios colores, desde blanco pálido pasando por rosado y llegando a púrpura, denso con apariencia afelpada y polvoriento debido a la formación de macroconidios. (McFarlane y Rutherford, 2010; Mohammadi *et al.*, 2012; Vishwakarma *et al.*, 2013).

Básicamente la enfermedad se transmite a través del aire, las esporas se mueven de un lugar a otro por este medio, colonizando hojas, flores y tallos, la dispersión de esporas depende de las condiciones climáticas (si el día está ventoso, seco o lluvioso). De forma secundaria la enfermedad se dispersa por esquejes infectados, agua de riego, salpicaduras de agua de lluvia y suelo. El patógeno puede sobrevivir hasta por un año en restos vegetales y en condiciones naturales, Las condiciones de clima frío y seco favorecen la supervivencia del hongo en restos vegetales. La enfermedad también se puede dispersar por medio de la semilla contaminada (Vishwakarma *et al.*, 2013).

Pokkah boeng es controlado mediante el uso semillas de variedades resistentes unido al uso de fungicidas, así como el uso de bacterias endofíticas (Lyrene *et al.*, 1977; Vishwakarma *et al.*, 2013). El objetivo del presente estudio es complementar la identificación de especies de *Fusarium* asociadas al cultivo de caña de azúcar y determinar la patogenicidad de las mismas.

2. Materiales y Métodos

2.1. Obtención de los aislados de *Fusarium* spp.

Los aislados de *Fusarium* previamente identificados morfológicamente fueron dados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Estos fueron aislados de plantas con síntomas de Pokkah boeng

2.2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción y purificación de ADN de los dos aislados de *Fusarium* por medio del kit DNeasy Plant Mini Kit 50 de Quiagen de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Todos los aislados se identificaron amplificando la región ITS y con el factor de elongación EF-1 α (Cuadro 1)

El producto de la extracción se secuenció en Macrogen (Corea). Las secuencias se compararon con la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (National Center for Biotechnology Information) NCBI.

Cuadro 1. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la identificación de especies de *Fusarium*

| Locus | Primer | Primer | Condiciones de PCR |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--|
| ITS 1- ITS 4 | (ITS1) TTCGTAGGTGAACCT GCGG | (ITS4) GGAAGTAAAAGTCGT AACAAAGG | Desnaturalización de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 57°C y 60 s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C |
| EF-1 α | (EF1) ATGGGTAAGGAGGA CAAGAC | (EF2) GGAAGTACCAGTGAT CATGTT | 2 min a 94 C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 C, 1 min a 53 C y 1 min a 72 C, seguido por 5 min a 72 C. |

2.3 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas se realizaron de acuerdo a Viswanathan *et al.*, 2011 con dos aislados, Se utilizaron cañas cortadas con 6 entrenudos, y se probaron 5 tratamientos:

Tratamiento 1: No se les hizo nada a las cañas.

Tratamiento 2: Solo se le abrió un hueco a las cañas en el tercer entrenudo con una broca estéril y se selló el entrenudo con papel parafilm.

Tratamiento 3: Se abrió un hueco a las cañas en el tercer entrenudo y se inocularon con 50 μ l de agua destilada estéril, el entrenudo se selló con parafilm.

Tratamiento 4: Consistió en abrir un hueco con broca estéril en el tercer entrenudo y se inocularon con 50 μ l de una suspensión de esporas del *Fusarium* a probar, con una concentración de 1×10^6 . El entrenudo se selló con parafilm.

Tratamiento 5: Consistió en abrir un hueco e inocular con un disco de PDA de 3 mm que contenía micelio del hongo.

Las cañas se mantuvieron con humedad relativa y temperatura constantes. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y las evaluaciones se realizaron a los 8 y a los 15 días

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización molecular

El análisis molecular confirmó la identificación morfológica previamente hecha en el INIFAP, en donde los aislados fueron identificados como *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*. Los resultados obtenidos de la comparación de secuencias de la región ITS con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), muestran un 99% de coincidencia con cepas ya reportadas de *Fusarium proliferatum* y un 99% de coincidencia con *Gibberella moniliformis*. Con respecto a la comparación de las secuencias del factor de elongación con la base de datos del NCBI, uno de los aislados coincidió en un 99% con *Gibberella intermedia* y el otro coincidió un 98% con *Fusarium verticillioides* lo que ratificó la identificación morfológica hecha previamente.

3.2 Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad de los aislados de *Fusarium* se confirmó en las cañas inoculadas. Estas presentaron los síntomas típicos como una pigmentación rosada anaranjada que cruzaba los internudos y luego la pudrición de las mismas. (Figura 1). Mientras que los testigos no presentaron ningún síntoma, y

el tejido se observó sano y sin ninguna coloración anormal. Por lo tanto las especies del genero *Fusarium* asociadas a plantas de caña de azúcar y que provocan síntomas de Pokkah-boeng en la región Morelos fueron *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*. Ambas especies reprodujeron los síntomas de la enfermedad en el tallo y ya han sido reportadas como patógenos de la caña de azúcar. (Alizadeh *et al*, 2010; Mohammadi *et al*. 2012)

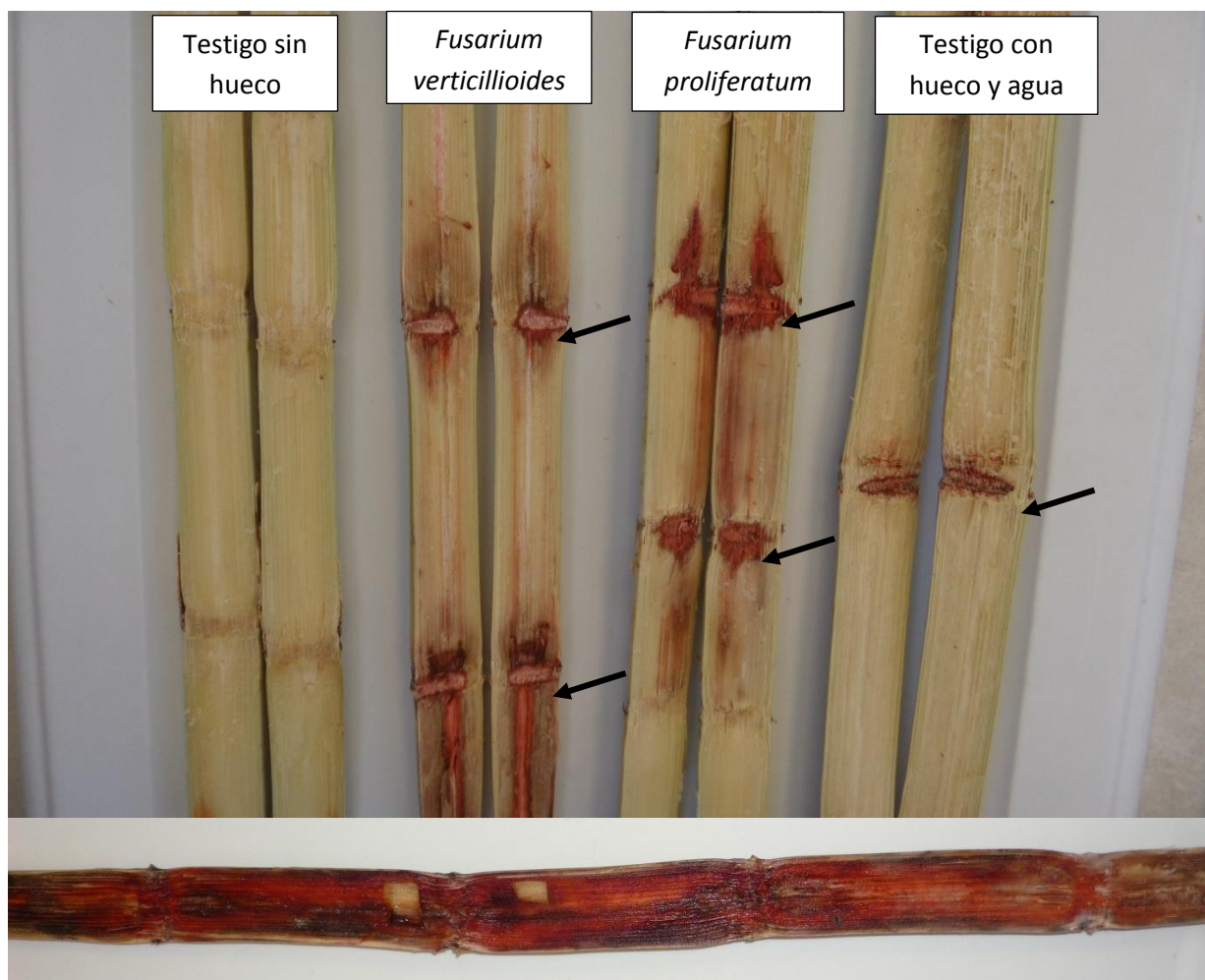


Figura 1. Reproducción de síntomas típicos de Pokkah boeng en tallos de caña de azúcar con dos especies de *Fusarium*. Las flechas indican el lugar de la inoculación

En el presente estudio se puede concluir que con la aplicación de los postulados de Koch se demostró la patogenicidad de los *Fusarium* aislados de plantas de caña con síntomas de Pokkah boeng mediante la inoculación artificial

del patógeno aislado. Por último se puede concluir que en el estado de Morelos tanto *F. verticillioides* como *F. proliferatum* causan el enfermedad de Pokkah boeng

4. Literatura citada

Alizadeh, A., Javan-Nikkahah, M., Fotouhifar, K.B., Motlagh, E. R., Rahjoo, V., 2010. Genetic Diversity of *Fusarium proliferatum* Populations from Maize, Onion, Rice and Sugarcane in Iran Based on Vegetative Compatibility Grouping. The Plant Pathology Journal. 26 (3): 216-222

Lyrene, P.M., Dean, J.L., James, I., 1977. Inheritance of resistance to Pokkah boeng in sugarcane crosses. Phytopathology 67: 689-692.

Martin, J. P., Hong, H. L., and Wismer, C. A., 1961. Pokkah boeng. In: Sugarcane diseases of the world. Vol. 1, Elsevier Publ. Co. New York. 542 p.

McFarlane. G.P., Rutherford, R.S., 2010. *Fusarium* species causing Pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera: Pyralidae). Proc S Afr Sug Technol Ass. 83: 267 – 270.

Mohammadi, A., Nejad, R.F., Mofrad, N.N., 2012. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. Plant Protect. Sci. 48 (2): 80-84.

Nirenberg, H.I., and O'Donnell, K., 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434-458

Ramírez, E., Nass, H., 2005. Presencia de patógenos fúngicos en el cultivo de caña de azúcar en Venezuela. Rev. Caña de Azúcar 23 (1 y 2): 5-15.

Singh. A., Chauhan, S.S., Singh, A., and Singh, S.B., 2006. Deterioration in sugarcane due to Pokkah Boeng disease. Sugar Tech (2-3): 187-190.

Vishwakarma S.K., Kumar, P., Nigam, A., Singh, A., Kumar, A., 2013. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. J Plant Pathol Microb 4: 170.

Viswanathan R., Poongothai, M., Malathi, P., 2011. Pathogenic and molecular confirmation of *Fusarium sacchari* causing wilt in sugarcane. Sugar Tech 13 (1): 68-76.

Capítulo II Aislamiento y evaluación *in vitro* de organismos antagonistas para el control de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez y Pokkah boeng en Caña de azúcar.

Silvia Hernández-Villalobos^a, Marianguadalupe Hernández-Arenas^b, Santos Gerardo Leyva-Mir^c, Bertha Tlapal-Bolaños^c. Cristian Nava-Díaz^a

^a Departamento de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. México

^b Departamento de Fitosanidad. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Inifap). Morelos, México

^c Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma de Chapingo. México

Resumen

Esta investigación se realizó con el objetivo de aislar y caracterizar organismos antagonistas para el control de *Fusarium* spp., en caña de azúcar. Treinta y cuatro aislados de *Trichoderma* fueron aislados de las raíces de cañas sanas y 52 bacterias de la rizosfera. En un ensayo preliminar se probó la capacidad antagonista en cultivos duales, de estas cuatro *Trichoderma* (CM3, CM14, CM21, CM24) y 2 bacterias (CMB10 Y CMB13) inhibieron significativamente a *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Estos seis organismos se probaron *in vitro* para la producción de compuestos volátiles y no volátiles utilizando cajas Petri selladas y filtrados, también se observó bajo microscopio la interacción entre los antagonistas y ambos patógenos. Todos los antagonistas tienen la capacidad de

producir compuestos volátiles que inhiben entre un 8.3% y 27.87%, también producen compuestos no volátiles que inhiben entre un 5% y un 53%. Los cuatro *Trichoderma* poseen la capacidad de micoparasitar a los dos patógenos ya sea enrollándose o produciendo estructuras parecidas a apresorios. Finalmente la identificación morfológica y molecular indican que CM3, CM21 Y CM24 tienen un 99% de similitud con *T. harzianum*, CM14 un 99% de similitud con *T. asperellum* y que ambas bacterias pertenecen al género *Bacillus* CMB10 a *B. subtilis* y CMB13 a *B. amyloliquefaciens*

Palabras clave: Metabolitos secundarios, compuestos difusibles, volátiles inhibitorios, *Trichoderma*, *Bacillus*

Abstract

The aim of this research was to isolate and characterize antagonistic organisms to control of *Fusarium* spp in sugarcane. 34 *Trichoderma* isolates were obtained from the roots of healthy sugar canes and 52 bacteria isolates from the rhizosphere. In a preliminary assay, the antagonistic capacity was tested in dual cultures, and four *Trichoderma* isolates (CM3, CM14, CM21, CM24) and 2 bacteria isolates (CMB10, CMB13) significantly inhibited *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. These 6 organisms were tested *in vitro* for the production of volatile and nonvolatile compounds using sealed Petri plate and culture filtrate screening methods respectively. The interaction between antagonists and both pathogens was also observed under microscope. All antagonists are able to produce volatile compounds which inhibit between 8.3% and 27.87%, they also produce non-volatile compounds which inhibit the growth of the pathogen between 5% and 53%. Four *Trichoderma* isolates possess the ability to mycorasitize both

pathogens by either strangulation or by producing structures like appresoria. Finally the morphological and molecular identification indicate that CM3, CM21 and CM24 as having a 99% similarity with *T. harzianum*, CM14 a 99% similarity with *T. asperellum* and both bacteria belonging to the genus *Bacillus*, CMB10 to *B. subtilis* and CMB13 to *B. amyloliquefaciens*

Key words: Secondary metabolites, diffusible compounds, volatile inhibitory, *Trichoderma*, *Bacillus*.

1. Introducción

Las plantaciones de caña de azúcar históricamente han sido afectadas por varias enfermedades causadas por diferentes patógenos, entre ellos bacterias, virus y hongos, lo que constituye una seria amenaza para la producción en todos los lugares donde se cultiva (Comstock, 2013; Huang *et al.*, 1994). El aumento acelerado en la incidencia de las enfermedades es preocupante ya que disminuye la rentabilidad, con pérdidas entre el 10% y el 15% de la producción de azúcar. (Viswanathan y Rao, 2011; Comstock, 2013).

Este cultivo está sujeto a más de diez enfermedades fungosas entre ellos la marchitez que afecta el tallo y el Pokkah boeng término Javanés que significa malformación o punta retorcida (Huang, 2004; Vishwakarma *et al.*, 2013). Ambas enfermedades se han asociado con diferentes hongos entre ellos varias especies de *Fusarium* como: *F. moniliforme*, *F. sacchari*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. napiforme*, *F. andiyazi*, *F. moniliforme* var. *Subglutinans*. (Waraitch, 1981; McFarlane y Rutherford, 2010, Viswanathan *et al.*, 2011, Mohammadi *et al.*, 2012).

En plantaciones de caña afectadas con estos patógenos se presenta una reducción en la germinación, el número de entrenudos, el peso, la altura y circunferencia de las plantas lo que provoca pérdidas en el rendimiento, la calidad, contenido de azúcar y extracción del jugo (12%-22%) (Singh y Goswami, 2002; Singh *et al.*, 2006)

El género *Fusarium* es un grupo cosmopolita y algunas especies son patógenas del suelo, en los cultivos de caña pueden sobrevivir en el suelo hasta por 3 años, así como un año en el material de desecho de la cosecha (Viswanathan y Rao, 2011; Vishwakarma *et al.*, 2013).

Tradicionalmente el manejo se ha hecho por medio del uso de semilla limpia, control cultural como la remoción y destrucción de los materiales de desecho de la cosecha, así como una adecuada fertilización y aplicaciones de fungicidas como carbendazim (1 g/l.), oxiclورو de cobre (0.2%), mancozeb al 0.3% (3 g/L), que son efectivos para la reducción de la enfermedad y en algunas ocasiones el uso de variedades resistentes (Viswanathan *et al.*, 2011; Vishwakarma *et al.*, 2013).

La persistencia del patógeno en el suelo y los problemas asociados al control químico como la pérdida de efectividad debido al desarrollo de resistencia, la afectación a organismos no plaga y a la salud humana así como la contaminación ambiental han hecho que surja la necesidad del uso de productos alternativos como el control biológico (Van der Werf, 1996; Kavlock, 1996).

El control biológico es la inhibición o supresión de un organismo o la enfermedad que este produce por medio de otro organismo (Heydari y Pessarakli, 2010). Las especies de *Trichoderma* spp., así como las rizobacterias

promotoras del crecimiento (PGPR) entre ellas *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido ampliamente utilizadas para el control de un extenso rango de patógenos en la agricultura (Anees *et al.*, 2010; Recep *et al.*, 2009; Dubey y Singh, 2007).

Los mecanismos de acción empleados por el género *Trichoderma* y por las PGPR como *Bacillus* para el control de patógenos de plantas es muy variado, los principales son micoparasitismo y excreción de enzimas líticas, competencia por espacio y nutrientes, producción de antibióticos y metabolitos secundarios, producción de biocidas volátiles (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005). También poseen la habilidad de inducir la resistencia y promover el crecimiento de las plantas, facilitan la solubilización y captación de nutrientes, mejoran la tolerancia al estrés, el desarrollo radicular e inactivación y degradación de enzimas del patógeno, además producen sideroforos y quelan hierro (Harman, 2000; Koepper *et al.*, 2004; Harman, 2006).

Tanto *Trichoderma* como *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido evaluadas para el control de varias especies de *Fusarium* en diferentes cultivos, obteniendo un control efectivo al inhibir al patógeno (Rini *et al.*, 2007; Hajieghrari *et al.*, 2008; Fernandes Qualhato *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). El propósito del presente estudio fue aislar organismos nativos del cultivo de caña de azúcar con potencial antagonista, probar *in vitro* su actividad contra *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*, e identificar dichos microorganismos para futuros ensayos.

2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención del patógeno

Las cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum* se obtuvieron de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del estado de Morelos, México. Estas cepas se mantuvieron en medio papa dextrosa agar (PDA) y se almacenaron a 4° C.

2.2 Aislamiento de organismos antagonistas

Los organismos se aislaron a partir de suelo y raíces de plantas de caña sanas. Se tomó 1 g de raíces sanas, se desinfectaron con cloro al 3% y se enjuagaron con agua destilada estéril, luego se colocaron en cajas Petri con PDA por 3 días a 28° C. Un gramo de suelo se suspendió en 9 ml de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente, se prepararon diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-3} , se tomó 100 μ l de la última dilución y se colocó sobre cajas Petri con agar nutritivo, estas se incubaron 48 horas a 28° C. Las colonias típicas de *Trichoderma* se aislaron y se purificaron por el método de cultivo monosporico y se mantuvieron en medio PDA, las bacterias con diferente morfología y apariencia se purificaron tomando una única colonia y se mantuvieron en medio agar nutritivo.

2.3 Evaluación preliminar

Se hizo una prueba preliminar de antagonismo con los *Trichoderma* y las bacterias, para ello se colocó un disco de 5 mm de agar con el patógeno en el centro de una caja Petri con PDA y a 3 cm de distancia sobre los 4 puntos cardinales se colocó un disco de micelio de los diferentes *Trichoderma* o bacterias y se observó si el antagonista produjo algún halo de inhibición o si hubo

crecimiento sobre el patógeno. Los organismos con potencial antagónico se probaron por medio de cultivos duales.

2.4 Evaluación *in vitro* de *Trichoderma spp.* (Cultivos duales)

El ensayo se realizó en medio PDA, en el extremo de una caja Petri de 9 cm y a 2 cm del borde se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio del hongo *Fusarium* tomado de la periferia de la colonia y con 5 días de crecimiento, al otro extremo de la caja se colocó otro disco de 5 mm de PDA con micelio del hongo *Trichoderma spp.*, de 5 días de crecimiento y también de la periferia de la colonia (Dennis y Webster, 1971a). En el caso de los testigos se colocó un disco de 5 mm de micelio tomado de la periferia de la colonia con 5 días de crecimiento y se colocó en el centro de una caja Petri con medio PDA. El experimento se realizó dos veces con tres repeticiones. Tanto los tratamientos como los testigos se incubaron a 28° C con fotoperíodo 12 horas luz/oscuridad y la evaluación se hizo a los tres días.

La evaluación del grado de antagonismo se hizo de dos maneras una utilizando el sistema de puntuación de Bell *et al.* (1982), con una escala de 5 clases, se considera antagonista si la puntuación es ≤ 2 y no antagonista si es ≥ 3

La inhibición del crecimiento radial se midió por medio de la siguiente fórmula: $PI = (P_1 - P_2) / P_1 \times 100$. En donde: P_1 = Crecimiento del patógeno en el plato control o testigo y P_2 = Crecimiento del patógeno en el cultivo dual.

2.5 Evaluación *in vitro* de bacterias (Cultivos duales)

La prueba se repitió dos veces y se realizó en medio Waksman agar, el cual contiene 10 g de glucosa, 20 g de agar, 5 g de peptona, 1 g de dihidrógeno fosfato de potasio y 0.5 g de sulfato de magnesio por litro. En un extremo de una caja Petri de 9 cm y a 3 cm del borde se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio del hongo *Fusarium* de 5 días de crecimiento y tomado de la periferia de la colonia, a 3 cm del disco de *Fusarium* se colocaron 100 µl de una suspensión bacteriana con una concentración de 10^{-8} unidades formadora de colonia (UFC mL⁻¹). Los testigos consistieron en un disco de 5 mm de diámetro con micelio del hongo tomado de la periferia de la colonia con 5 días de crecimiento, el cual se colocó en el centro de una caja Petri con medio PDA. Se hicieron 3 repeticiones por tratamiento y por cada testigo, la evaluación se realizó a los 5 días después de incubarse a 28°C se midió el halo de inhibición entre el patógeno y la bacteria y el porcentaje de inhibición del patógeno de acuerdo a la fórmula del apartado 2.4.

Basado en los resultados de las pruebas de cultivos duales, los aislamientos más efectivos de *Trichoderma* y bacterias fueron seleccionados para los siguientes experimentos *in vitro*.

2.6 Detección de posibles compuestos volátiles producidos por *Trichodermas* y bacterias

Con la finalidad de medir la capacidad para producir compuestos volátiles inhibitorios, discos de 5 mm de 4 aislados de *Trichoderma* de 5 días de crecimiento y 2 bacterias con 48 horas de crecimiento fueron inoculados en el centro de cajas con papa dextrosa agar (PDA) y agar nutritivo respectivamente.

La tapa de cada caja Petri fue reemplazada con el fondo de otra caja con PDA e inoculada en la parte central con un disco de 5 mm de micelio tomado del cultivo del patógeno en PDA y sellados completamente para evitar la fuga de gases (Dennis y Webster, 1971b; Saidi *et al.*, 2009). El testigo consistió en discos de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno tomado de la periferia de la colonia con 5 días de crecimiento el cual se puso en el centro de una caja Petri con medio PDA. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó a los 7 días después de la inoculación a 28° C por medio de la fórmula descrita en el apartado 2.4. El experimento se repitió dos veces con tres repeticiones por cada tratamiento y testigo.

2.7 Detección de posibles compuestos difusibles no-volátiles producidos por Trichoderma

Con el propósito de medir el efecto de inhibidores difusibles (Dennis y Webster, 1971c), 4 aislados de *Trichoderma* fueron inoculados en 350 ml de caldo papa dextrosa estéril en matraces de 1000 ml. Los matraces inoculados con 3 discos de PDA con micelio de cada hongo fueron incubados en un agitador por 10 días a 120 rpm. Bajo condiciones asépticas los cultivos fueron filtrados con un filtro Millipore de 0.22 µm usando un sistema al vacío. Se hizo una segunda filtración con un filtro para jeringa de 0.1 µm. Los filtrados se agregaron al medio PDA fundido hasta obtener una concentración de 15%, 30%, 45% y 60% (v/v). El medio se vertió en cajas Petri, una vez solidificado se inoculó en el centro con un disco de 5 mm del patógeno y se incubó a 28° C. Los testigos consistieron en un disco de 5 mm de micelio del patógeno tomado de la periferia de la colonia con 5 días de crecimiento el cual se puso en el centro de una caja

Petri con medio PDA sin ningún filtrado. El porcentaje de inhibición se midió a los 7 días con la fórmula descrita en el apartado 2.4. Este experimento se realizó dos veces con tres repeticiones por tratamiento y por cada testigo.

2.8 Detección de posibles compuestos difusibles no-volátiles producidos por Bacterias

Dos aislados de bacterias fueron inoculados en 100 ml de caldo nutritivo estéril en matraces de 250 ml. Los matraces inoculados con una azada de masa bacteriana fueron incubados en un agitador por 72 horas a 120 rpm. Bajo condiciones asépticas los filtrados fueron probados en su habilidad para inhibir el crecimiento de *Fusarium* con el método de Chaurasia *et al.*, (2007). En cajas Petri con medio PDA, se inoculó el centro de la caja con un disco de 5 mm del patógeno y a 2 cm del disco del patógeno se puso un disco de papel estéril de 5 mm previamente sumergido en el filtrado de cada bacteria la caja se invirtió y se incubó a 28° C por 3 días. El testigo consistió en un disco de 5 mm de micelio del patógeno tomado de la periferia de la colonia con 5 días de crecimiento el cual se puso en el centro de una caja Petri con medio PDA y sin el filtrado. Los platos se examinaron a los 5 días, la inhibición del patógeno se midió con la fórmula descrita en el apartado 2.4

2.9 Caracterización morfológica de los agentes de control biológico

Para la caracterización morfológica de los aislados de *Trichoderma* se hicieron preparaciones semipermanentes con lactofenol estas se observaron en un microscopio compuesto con cámara digital instalada y usando el objetivo 100 X, se midieron el largo y ancho de 25 conidios. La base, parte media y largo de

25 fiálides, también fue evaluado el largo y ancho de 25 conidióforos y el ancho de 25 clamidosporas; empleando el programa computacional Motic Image Plus 2.0. También se observó la forma y color de los conidios, la disposición de las fiálides y el crecimiento de la colonia. En cuanto a las bacterias se hizo una caracterización de acuerdo al método descrito en el Manual de determinación bacteriológica de Bergey's por medio de pruebas bioquímicas con el API20E, más la tinción de Gram, de esporas y determinación de la temperatura máxima de crecimiento.

2.10 Evaluación del micoparasitismo por medio de microcultivos

La interacción del hongo patógeno con el agente antagonico se determinó colocando 2 cuadros de PDA de 5 mm² sobre un portaobjetos a 10 mm de distancia uno del otro. En los bordes del primer cuadro se colocó micelio y esporas de *Trichoderma* y en el borde del segundo cuadro se puso micelio y esporas de *Fusarium*. Después se colocó un cubreobjetos estéril encima de los dos cuadros y los microcultivos se pusieron en cámara húmeda y se incubaron en oscuridad a 28° C con tres repeticiones por tratamiento. Las observaciones al microscopio se hicieron a los 5 y 7 días.

2.11 Identificación molecular de los organismos antagonistas

Se realizó la extracción y purificación de ADN de todos los organismos con potencial como antagonista (*Trichoderma* y bacterias) por medio del kit DNeasy Plant Mini Kit 50 de Quiagen de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN se envió a secuenciar a la empresa MacroGen en Korea, donde se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación

de las regiones del genoma que se muestran en el cuadro 1. Las secuencias de nucleótidos obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology information)

Cuadro 1. Cebadores y condiciones de PCR para la identificación de *Trichodermas* (ITS, TEF 1 α) y bacterias (16 s)

| Locus | Primer | Primer | Condiciones de PCR |
|----------------|--|--|--|
| ITS | (ITS 4) TCCTCCGCTTATTGATATGC White <i>et al</i> , 1990 | (ITS 5) GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG White <i>et al</i> , 1990 | 1 ciclo a 95 °C durante 2min, 30 ciclos 95 °C por 1min; 50 °C por 30s y 72 °C por 2min y un ciclo de extensión final durante 10 min a 72 °C. |
| 16 s | (518F) CCAGCAGCCGCGTAATAC G | (800R) TACCAGGGTATCTAATCC | Desnaturalización inicial 4 min a 95° C, 30 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 56° C, 2 min a 72° C y una extensión final de 20 min a 72° C |
| TEF 1 α | (Ef728M) CATCGAGAAGTTCGAGAAG G Carbon y Kohn, 1999 | (tef1rev) GCCATCCTTGGAGACCAGC Kullning-Gradinger <i>et al</i> , 2002 | Desnaturalización inicial 5 min a 94° C, 35 ciclos de 45 s a 94° C, 45 s a 63° C, 1 min a 72° C y una extensión final de 10 min a 72° C |

3. Resultados

3.1 Aislamiento de organismos antagonistas y evaluación preliminar

En total se aislaron 34 *Trichoderma* y 52 bacterias. Los 86 aislados fueron evaluados en una prueba preliminar para observar la producción de halos de inhibición producidos por las bacterias y el crecimiento sobre el patógeno o la rapidez del crecimiento por parte de los aislados de *Trichoderma*. Se encontró

que solo 12 bacterias produjeron un halo de inhibición de 4 mm en promedio, las demás bacterias no tuvieron ningún efecto y más bien el patógeno creció sobre ellas. En cuanto a los aislados de *Trichoderma* los 34 tuvieron un crecimiento rápido, 2 días aproximadamente, inhibiendo el crecimiento del patógeno.

3.2 Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. y bacterias (Cultivos duales) contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

Las pruebas mostraron que 82% de los aislados de *Trichoderma* exhibieron niveles de antagonismos clase 1 y 2 contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, esto significa que los aislados crecieron sobre el patógeno u ocuparon más de 2/3 partes de la caja Petri en tan solo 3 días inhibiendo así el crecimiento del patógeno. El otro 18% parece no tener actividad antagonista (rango ≥ 3) (Fig 1).

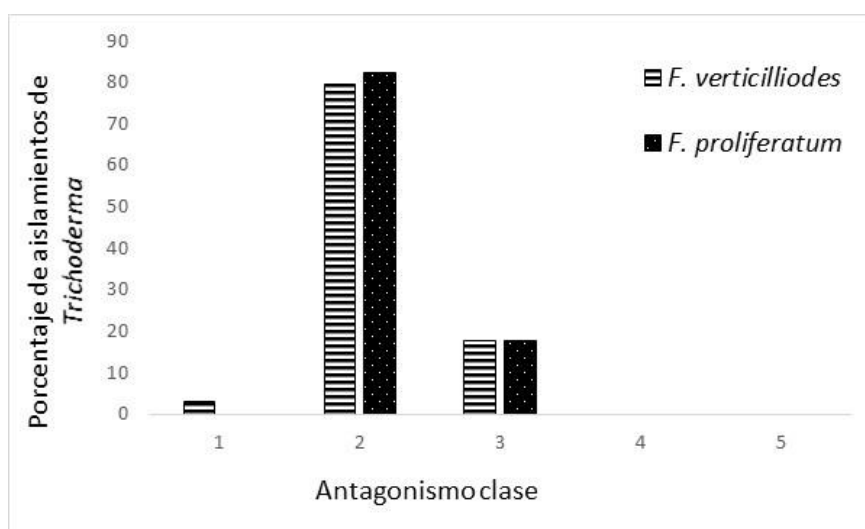


Figura 1. Distribución de las clases de antagonismo según la escala de Bell *et al*, 1982

De los 34 aislados, solo 4 (CM3, CM14, CM21 y CM24) suprimieron significativamente a *F. verticillioides* inhibiendo su crecimiento; CM3 mostró la

máxima inhibición con un 40% seguido por CM14 y CM21 y en menor grado CM24 con un 23% de inhibición. Dos aislamientos (CM21 y CM24) fueron prometedores contra *F. proliferatum* reduciendo su crecimiento de un 22% a un 24% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Antagonismo en cultivos duales de cuatro aislamientos de *Trichoderma* spp contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

| Antagonista | Crecimiento radial (mm) | | % de Inhibición | |
|-------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. verticillioides</i> * | <i>F. proliferatum</i> * |
| CM3 | 7.1 | – | 40 ^a | – |
| CM14 | 8.4 | – | 25 ^{bc} | – |
| CM21 | 7.8 | 7.8 | 30 ^{ab} | 24 ^a |
| CM24 | 8.6 | 8.1 | 23 ^{bcd} | 22 ^{ab} |

*El experimento se repitió dos veces con tres repeticiones cada una. Dentro de las columnas, los promedios seguidos por una letra común no difieren significativamente ($P>0.01$) de acuerdo con la diferencia menos significativa (LSD) test

De las 12 bacterias probadas en cultivos duales, solo 2 de ellas (CMB10 y CMB13) inhibieron significativamente a ambos *Fusarium* con un porcentaje entre 21% y 34% y exhibieron un halo de más de 5 mm de ancho (Cuadro 3). Las restantes 10 bacterias no fueron efectivas inhibiendo a ambos patógenos.

Cuadro 3 Antagonismo en cultivos duales de bacterias contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

| Antagonista | % de Inhibición | | Halo de Inhibición (mm) | |
|--------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| | <i>F. verticillioides</i> * | <i>F. proliferatum</i> * | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. proliferatum</i> |
| CMB10 | 21.45 ^a | 34.03 ^a | 5.78 | 8.74 |
| CMB13 | 21.13 ^{ab} | 28.57 ^{ab} | 5.20 | 7.15 |

*El experimento se repitió dos veces con tres repeticiones cada una. Dentro de las columnas, los promedios seguidos por una letra común no difieren significativamente ($P>0.01$) de acuerdo con la diferencia menos significativa (LSD) test

3.3 Efecto de compuestos volátiles producidos por *Trichoderma* y bacterias contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.

Los resultados del ensayo sugieren que tanto los aislados de *Trichoderma* como las bacterias son capaces de producir compuestos volátiles en condiciones *in vitro* y muestran efectos adversos en el crecimiento del patógeno. CM3, CM21 y CM24 tuvieron un desempeño similar entre ellos con respecto a cada uno de los patógenos, con un rango de 11.32% a 13.72% de inhibición contra *F. verticillioides* y de 15.33% a 15.84% contra *F. proliferatum*. El aislado CM14 fue menos efectivo contra ambos patógenos comparado con los otros antagonistas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto inhibitorio de compuestos volátiles de *Trichoderma* spp., y bacterias contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

| | <i>Trichoderma</i> spp | | | | Bacterias | | |
|-------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|
| | Crecimiento radial (mm) | | % de inhibición | | | % de inhibición | |
| | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. verticillioides</i> * | <i>F. proliferatum</i> | | <i>F. verticillioides</i> * | <i>F. proliferatum</i> |
| CM3 | 29.05 | 22.14 | 13.72 ^a | 15.33 ^a | CMB10 | 19.19 ^a | 23.86 ^a |
| CM14 | 30.89 | 23.6 | 8.34 ^a | 9.45 ^b | CMB13 | 20.88 ^a | 27.87 ^a |
| CM21 | 29.88 | 21.99 | 11.32 ^a | 15.84 ^a | - | - | - |
| CM24 | 29.83 | 22.08 | 11.57 ^a | 15.65 ^a | - | - | - |

*El experimento se repitió dos veces con tres repeticiones cada una. Dentro de las columnas, los promedios seguidos por una letra común no difieren significativamente ($P > 0.01$) de acuerdo con la diferencia menos significativa (LSD) test

En cuanto a las bacterias, ambas tienen la capacidad de producir compuestos volátiles que inhiben el crecimiento de ambos patógenos (Cuadro 4) con porcentajes de inhibición que van desde 19% hasta 27.8%, siendo *F. proliferatum* el más afectado por ambos antagonistas (Fig. 2)

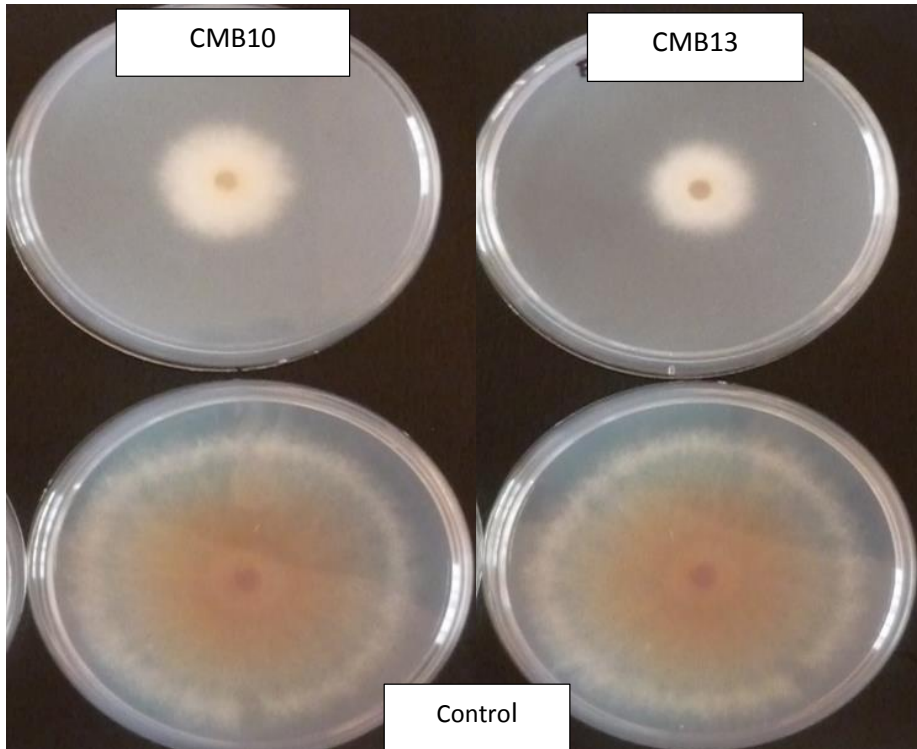


Figura 2. Inhibición de *F. proliferatum* por parte de dos bacterias antagonistas

3.4 Efecto de compuestos no volátiles producidos por trichoderma y bacterias aisladas de raíz y suelo en el cultivo de caña de azúcar, contra *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

Todos los aislados de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, sin embargo CM3 y CM14 mostraron un rendimiento muy bajo o nulo frente a ambos patógenos comparado con los otros dos aislamientos. Los aislamientos CM21 y CM24 tuvieron el mejor desempeño frente a ambos patógenos, al incrementarse la concentración del filtrado del antagonista el crecimiento radial del patógeno fue proporcionalmente disminuyendo.

De los dos patógenos, *F. proliferatum* mostro la mayor inhibición del crecimiento con CM21 y CM24. La máxima inhibición (53%) del crecimiento micelial se observó con la concentración de 60% del filtrado CM24, seguido de

un 39.65% con la máxima concentración de CM21. En cuanto a *F. verticillioides* los rangos máximos de inhibición fueron 21.5% y 26.98% para CM21 y CM24 respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de compuestos no volátiles producidos por cuatro aislados de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

| Concentración filtrados | <i>Fusarium verticillioides</i> | | | | <i>Fusarium proliferatum</i> | | | |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| | Antagonistas % inhibición | | | | Antagonistas % inhibición | | | |
| | CM3 | CM14 | CM21 | CM24 | CM3 | CM14 | CM21 | CM24 |
| 15% | 4.74 ^{ab} | 0 ^c | 7.89 ^c | 9.83 ^c | -2.69 ^d | -9.26 ^b | 20.78 ^c | 16.09 ^c |
| 30% | 2.61 ^b | 0 ^c | 14.98 ^b | 15.21 ^b | 2.98 ^c | -6.56 ^b | 30.14 ^b | 27.69 ^b |
| 45% | 6.96 ^a | 0.64 ^b | 20.24 ^a | 17.61 ^b | 13.64 ^b | -2.46 ^b | 35.85 ^a | 34.36 ^b |
| 60% | 8.84 ^a | 5.47 ^a | 21.50 ^a | 26.98 ^a | 23.66 ^a | 20.87 ^a | 39.65 ^a | 53.01^a |

*El experimento se repitió dos veces con tres repeticiones cada una. Dentro de las columnas, los promedios seguidos por una letra común no difieren significativamente ($P>0.01$) de acuerdo con la diferencia menos significativa (LSD) test

Los compuestos difusibles de ambas bacterias fueron capaces de inhibir el crecimiento de ambos patógenos. En el caso de *F. verticillioides* CMB10 fue la que inhibió en mayor proporción al patógeno con un 35%, mientras que para *F. proliferatum* no hubo diferencias significativas en la inhibición de ambas bacterias (Cuadro 6)

Cuadro 6. Efecto de compuestos no volátiles producidos por dos bacterias sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

| | <i>F. verticillioides</i> | | <i>F. proliferatum</i> | |
|-------|---------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | Crecimiento radial (mm) | % de inhibición | Crecimiento radial (mm) | % de inhibición |
| CMB10 | 22.52 | 35 ^a | 22.92 | 24.22 ^a |
| CMB13 | 26.20 | 24.48 ^b | 23.21 | 23.53 ^a |

*El experimento se repitió dos veces con tres repeticiones cada una. Dentro de las columnas, los promedios seguidos por una letra común no difieren significativamente ($P>0.01$) de acuerdo con la diferencia menos significativa (LSD) test

3.4 Caracterización morfológica y molecular de los antagonistas

Las colonias de CM3, CM21 y CM24 crecen rápidamente, inicialmente blancas y luego verde pálido, pueden producir pigmento amarillo en el medio, las hifas y conidióforos son hialinos en forma piramidal, con ramificaciones largas en la base en ángulo recto y más cortas en la punta, las fiálides crecen en forma de botella individuales o en grupos de 3-4, conidios verde pálido subglobosos u ovoides, clamidosporas terminales, intercalares o solitarias globosas a subglobosas (Cuadro 7)

De acuerdo a el color de la colonia, medidas de sus estructuras y crecimiento, los aislados CM3, CM21 y CM24 concuerdan con la descripción de *Trichoderma harzianum*, realizadas por Bissette, 1991 y Gams y Meyer 1998

Los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias de CM3, CM21, y CM24 con la base de datos del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) muestran una similitud del 99% con *Trichoderma harzianum* tanto con el ITS como con el factor de elongación TEF 1 α .

Cuadro 7. Medidas de las diferentes estructuras de CM3, CM21 y CM24

| | Conidios (LxA) μm | Fialides (LxA) μm | Conidioforos (LxA) μm | Clamidosporas (diámetro μm) |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| CM3 | (2.1-3.1) x (2.1-3.0) | (5.3-7.5) x (2.5-3.3) | (8.7-10.6) x (2.6-3.5) | 4.3-8.4 |
| CM21 | (2.3-3.5) x (2.0-2.7) | (4.8-7.4) x (2.5-3.3) | (6.4-10) x (2.1-3.1) | 5.8-10 |
| CM24 | (2.3-3.5) x (2.1-2.9) | (3.6-7.4) x (2.5-3.3) | (4.8-10) x (2.5-3.4) | 5.9-10.8 |

La colonia de CM14 crece formando círculos concéntricos, producción densa de conidios verde oscuro, no produce pigmentos difusibles ni micelio aéreo, conidióforo hialino, ramificado 2.6-4.0 μm de ancho, fiálides individuales

o en grupos de 2-4, rectas ampuliformes de 2-3 μm de ancho en la base, 2.8-3.8 μm de ancho en el medio y 6-11.4 μm de largo. Conidios globosos a subglobosos u ovoides color verde olivo 3.5-4.8 x 3-3.8 μm . Clamidosporas terminales o intercalares ovoides o subglobosas 8.1-12 μm de diámetro. El aislado CM14 concuerda con la descripción de *Trichoderma asperellum* hecha por Samuels *et al*, 1999.

De igual manera los resultados obtenidos de la comparación de la secuencia CM14 con la base de datos del CNBI muestran un 99% de similitud con *Trichoderma asperellum* tanto para el ITS como para el factor de elongación TEF 1 α

El cuadro 8 muestra la caracterización de las bacterias y unido a la identificación molecular de las secuencias con respecto a las secuencias del NCBI ya reportadas dan un 99% de similitud con *Bacillus subtilis* para CMB10 y un 99% similitud con *Bacillus amyloliquefaciens* para CMB13.

Cuadro 8. Caracterización morfológica y bioquímica de CMB10 y CMB13

| Caracterización morfológica | CMB10 | CMB13 |
|---|---|---|
| Forma y arreglo | Varilla corta en cadenas | Varilla corta en cadenas |
| Tinción de Gram | Positiva | Positiva |
| Tinción de esporas | Positiva | Positiva |
| Caracterización del cultivo en | | |
| Colonia | Blanca a crema | Transparente y mucoide |
| Crecimiento | Abundante | Abundante |
| Forma | Irregular | Redonda |
| Márgenes | Ondulados | Enteros |
| Elevación | Plana | Elevado |
| Test bioquímico API 20E | Negativo excepto hidrólisis de gelatina | Negativo excepto hidrólisis de gelatina |
| Caracterización Bioquímica | | |
| Hidrólisis de Almidón | + | +++ |
| Reducción de nitratos | + | + |
| <i>Producción de ácido a partir de:</i> | | |
| Lactosa | - | + |
| Inusitol | - | - |
| Crecimiento a 50° C | + | - |
| Crecimiento en NaCl al 10% | - | + |

3.6 Evaluación del micoparasitismo

El análisis microscópico ente los antagonista y ambos patógenos revela micoparasitismo en donde se observa enrollamiento como en el caso de *Trichoderma asperellum* (CM14) o la formación de estructuras parecidas a apresorios por parte de *Trichoderma harzianum* (CM3, CM21 y CM 24) (Figura 3).

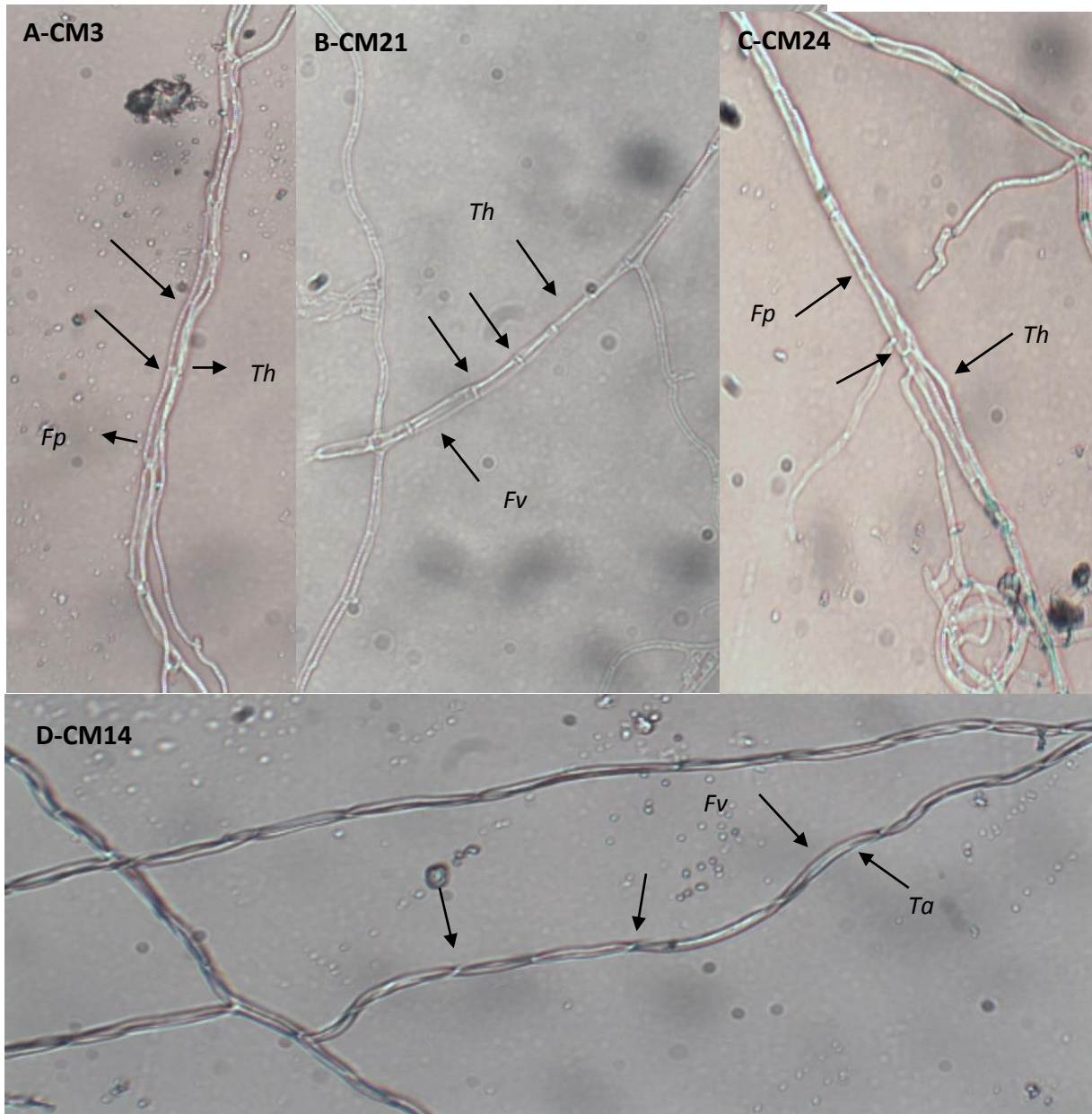


Figura 3. Interacción de los aislamientos de *Trichoderma* con *F. verticillioides* y *F. proliferatum* **A-CM3.** Adhesión del micelio de *Trichoderma harzianum* (Th) con la estructura en forma de apesorio al micelio de de *F. proliferatum* (Fp), las flechas indican el lugar donde se formó la estructura. **B-CM21.** Adhesión del de Th con la estructura como apesorio al micelio de *F. verticillioides* (Fv), las flechas indican el lugar donde se formó la estructura. **C-CM24.** Adhesión del de Th con la estructura como apesorio al micelio de *F. proliferatum* (Fp) las flechas indican el lugar donde se formó la estructura **D-CM14.** Enrollamiento de *Trichoderma asperellum* (Ta) alrededor del micelio de *F. verticillioides* (Fv) las flechas indican el lugar donde se está enrollando.

4. Discusión

De un total de 86 organismos aislados, 4 *Trichoderma*, tres identificados como *Trichoderma harzianum* (CM3, CM21 y CM24) y uno como *Trichoderma asperellum* (CM14) así como dos bacterias identificadas como *Bacillus subtilis* (CMB10) y *Bacillus amyloliquefaciens* (CMB13) fueron capaces de inhibir a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* de forma significativa. Dichos organismos tienen gran capacidad para inhibir un amplio rango de patógenos lo cual ha sido extensamente documentado (Dubey *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2009; Gajbhiye *et al.*, 2010; Joshi y Misra, 2013; Singh *et al.*, 2014).

En el ensayo de cultivos duales tanto los 3 *Trichoderma harzianum* como *T. asperellum* crecieron en PDA considerablemente más rápido que los aislados de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* bajo las mismas condiciones. Su rápido crecimiento le da a *Trichoderma* una ventaja importante en la competencia por espacio y nutrientes sobre el patógeno (Kucuk *et al.*, 2007). Cuando el antagonista es muy efectivo la concentración de nutrientes decrece (Benítez, *et al.*, 2004), por lo tanto la inhibición del crecimiento de ambos patógenos pudo ser causado por el agotamiento de nutrientes, el cual es uno de los mecanismo utilizado por muchos agentes de control biológico (Heydari y Pessarakli, 2010).

Diferentes estudios asocian la producción de metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* en el control de hongos patógenos de plantas (Whang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013;), en esta investigación, la reducción del crecimiento de los patógeno en los cultivos duales por parte de dos cepas de *Bacillus*, y la formación de halos de inhibición se debió presumiblemente a los metabolitos liberados por las bacterias en el medio.

Otro mecanismo que utilizan los antagonistas para el control de hongos patógenos es la producción de antibióticos (Harman, 2000) como metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles. *Trichoderma* es capaz de producir isonitrilos, pirones, sesquiterpenos, peptaibols y esteroides (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998) y *Bacillus subtilis* produce compuestos volátiles como 2-etil-hexanol, 2,4-bis (metyipropil)-fenol, 4-hidroxibenzaldehído entre otros (Almenar *et al.*, 2007).

En el presente estudio tanto las cepas de *Trichoderma* como las de *Bacillus* fueron capaces de producir compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento de ambos patógenos lo que concuerda con otros estudios en donde *T. harzianum* y *T. asperellum* han demostrado la capacidad de inhibir patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, y *Rhizoctonia solani* por medio de la producción de compuestos volátiles (Rini y Sulochana, 2006; Reza Ojaghian, 2011; Fernandes Qualhato *et al.*, 2013).

Del mismo modo se ha reportado que para patógenos en postcosecha *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* son capaces de inhibir varias especies de *Penicillium in vitro*, en donde el efecto antifúngico de los compuestos volátiles incrementa con los días (Leelasuphakul *et al.*, 2008; Arrebola *et al.*, 2010). Así mismo inhiben el crecimiento de otros patógenos como *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Chen *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012).

Filtrados de los antagonistas fueron evaluados para la producción de compuestos no volátiles, conforme se aumentó la concentración de los filtrados mayor fue la inhibición de ambos *Fusarium*, esto coincide con lo reportado por Prasad y Kumar, (2011) y Bandopadhyay *et al.*, (2008) en donde aislados de *Trichoderma*, *Gliocadium* y *Aspergillus* inhibieron en mayor proporción al patógeno conforme se aumentó la concentración de los filtrados

Los 3 *Trichodermas harzianum* encontrados en este estudio inhibieron a ambos patógenos, sin embargo el aislado CM3 tuvo un desempeño bajo comparado con CM21 y CM24 así mismo estos dos aislados inhibieron en mayor proporción a *Fusarium proliferatum* que a *Fusarium verticillioides*. Del presente estudio, es claro que diferentes cepas de la misma especie pueden mostrar diferente actividad contra los patógenos, la diferencia en la eficacia puede deberse a la calidad y cantidad de sustancias producidas por cada antagonista, lo que concuerda con Sivasithamparam y Ghisalberti, (1998), que indican que diferentes especies de la misma familia o diferentes cepas de la misma especie a menudo pueden producir compuestos significativamente diferentes lo que sugiere que los metabolitos secundarios se expresan individualmente en las especies en términos químicos.

El aislado CM14 que corresponde a *Trichoderma asperellum* (CM14) tuvo un pobre desempeño con un máximo de inhibición de 5.47% para *F verticillioides* con la concentración más alta y en el caso de *F proliferatum* la única concentración que inhibió fue la de 60% con un 20.87% de inhibición. Widmer, (2014) reporta que de 6 cepas de *Trichoderma asperellum* ninguna tuvo la capacidad de producir compuesto no volátiles, mientras que en un ensayo hecho por Reza Ojaghian, (2011) reporto que *Trichoderma asperellum* mostro los porcentajes más bajos de inhibición con respecto a las otras especies de *Trichoderma* y Raut *et al.*, (2014), indico que filtrados de diferentes cepas de *Trichoderma asperellum* tuvieron diferentes grados de inhibición dependiendo del patógeno y que la actividad anti fúngica es dependiente de la dosis, en algunos casos la inhibición fue nula y solo en las concentraciones más altas se consiguió inhibir el crecimiento del patógeno con mayor eficacia.

En el presente ensayo tanto *Bacillus subtilis* como *Bacillus amyloliquefaciens* producen compuestos difusibles con la capacidad de inhibir ambos patógenos, en otros ensayos filtrados de estas mismas bacterias son capaces de inhibir a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Fusarium udum*, *Alternaria alternata* y *Phytium afertile* entre otros (Chaurasia et al., 2005; Sood et al., 2007; Prashar et al., 2013).

Esta actividad antagonista del género *Bacillus* sp, contra un extenso rango de patógenos ha sido ampliamente documentada ya que la producción de metabolitos secundarios tales como compuestos volátiles, no volátiles o antibióticos es uno de los mecanismos más comunes, por ejemplo Phae y Shoda, (1991), reportan que *B. subtilis* sintetiza alrededor de 60 tipos de antibióticos con capacidad antifúngica los cuales pertenecen a la familia Iturin en su mayoría, por otro lado Wulff et al., (2002) reportan que filtrados de *B. amyloliquefaciens* producen surfactinas, iturin, bacillomicin y azalomycin.

El micoparasitismo es uno de los mecanismos más característico del género *Trichoderma* (Harman, 2000) es un proceso complejo que involucra enrollamiento, formación de estructuras como apresorios, producción de enzimas que degradan la pared y penetración del patógeno (Howell, 2003; Benitez et al., 2004)

Las observaciones hechas de la interacción de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* con las cuatro cepas de *Trichoderma* que inhibieron a estos patógenos mostraron que *Trichoderma harzianum* (CM3, CM21 y CM24) desarrollaron estructuras como apresorios que se unen a la hifa del patógeno. Sin embargo no se observó enrollamiento, mientras que *Trichoderma asperellum*

(CM14) muestra enrollamiento y estructuras como apresorios alrededor del patógeno.

Estos resultados llevan a concluir que aunque estas cepas tienen la habilidad de parasitar al patógeno y por ende producir enzimas que degradan la pared celular no todas se enrollan alrededor del mismo por lo tanto el enrollamiento no es un indicador de que sea buen inhibidor, esto concuerda con lo reportado por Ainees *et al.*, (2010), donde cepas que no tenían una gran habilidad para inhibir se enrollaban mientras que cepas con gran capacidad de inhibir el patógeno no presentaban enrollamiento. Así mismo Almeida *et al.*, (2007), indica que no hay una correlación entre la producción de enzimas degradadoras de la pared celular y el enrollamiento.

De acuerdo al resultado de esta investigación es claro que los agentes antagonistas utilizan una serie de mecanismos de acción para la inhibir al patógeno, tales como micoparasitismo, competencia, producción de compuestos volátiles y no volátiles así como producción de enzimas que degradan la pared celular, y que estos modos de acción actúan de forma sinérgica para el control del patógeno.

Futuras investigaciones para probar estos antagonistas en vivero y en campo son necesarias para poder obtener un antagonista capaz de inhibir ambos patógenos en el cultivo de caña de azúcar.

5. Literatura citada

Almenar, E., Valle, V.D., Catala, R., Gavara, R., 2007. Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 55: 2240-2245

- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L.G., Heraud, C., Steinberg, C., 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*. 114: 691-701
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological control*. 53: 122-128
- Bandopadhyay, A., Bandopandhy, A.K., Samajpati, N., 2008. In vitro antifungal activity of some biocontrol fungi against jute pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Indian Phytopath.* 61 (2): 204-211
- Bell, D.K., Wells, H.D., Matkham, C.R., 1982. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species against six Fungal Plant Pathogens. *Ecology and Epidemiology*. 72 (4): 379-382
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260
- Bissett, J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69: 2373-2417
- Carbone, I., Kohn, L.M., 1999. A method for designing primers sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91(3): 553-556

- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N., 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research*. 160: 75-81
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu L., Zheng, Z., Yu, Z., 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis*, on spore germination and hyphal growth of plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol Lett*. 30: 919-923
- Compant, S., Duffy, B., Clement, C., Barka, E.A., 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol*. 71 (9):4951-4959
- Comstock, J.C. 2013. Sugarcane Diseases: Futuristic Management Strategies. *Sugar Tech* 15(1):1–2
- Correa, O.S., Montecchia, M.S., Berti, M.F., Fernandez Ferrari, M.C., Puecheu, N.L., Keber, N.L., García, A.F., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 41: 185-194.
- Dennis, C., Webster, J., 1971a. Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*. III Hyphal Interaction. *Trans, Br. Mycol. Soc*. 57 (3): 363-369

- Dennis, C., Webster, J., 1971b. Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*. II Production of Volatile Antibiotics. Trans, Br. Mycol. Soc. 57 (1): 41-48
- Dennis, C., Webster, J., 1971c. Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*. I Production of Non-Volatile Antibiotics. Trans, Br. Mycol. Soc. 57 (1): 25-39
- Dubey, S.C., Suresh, M., Singh, B., 2007. Evaluation of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control 40: 118-127
- Fernades Qualhato, T., Cardoso Lopes, F.A., Stecca Steindorff, A., Silva Brandao, R., Amorim Jesuino, R. S., Ulhoa, C.J., 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnol Lett. 35: 1461-1468.
- Gajbhiye, A., Rai, A.R., Meshram, S.U., Dongre, A.B., 2010. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. World J Microbiol Biotechnol. 26: 1187-1194.

- Gams, W., Meyer, W., 1998. What Exactly is *Trichoderma harzianum*?
Mycologia. 90 (5): 904-915
- Hajieghrari, B., Tobari-Giglou, M., Reza Mohammadi, M., Davari, M., 2008.
Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of
soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology. 7 (8):
967-972.
- Harman, G. E., 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perceptions
Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84
(4): 377-393
- Harman, G. E., 2006. The Nature Application of Biocontrol Microbes:
Trichoderma spp. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp.
Phytopathology 96 (2): 190-194
- Heydari, A., Pessarakli, M., 2010. A Review on Biological Control of Fungal
Planta Pathogens Using Microbial Antagonists. Journal of Biological
Sciences. 10 (4): 273-290.
- Howel, C.R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the
Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current
Concepts. Plant Disease. 87 (1): 4-

Huang H.N., Xu, Y.N., 1994. Preliminary discussion on sugarcane breeding for disease-resistance in mainland China..*Sugarcane and Canesugar*, 4 : 5-10

Huang S.L. 2004. Progress of sugarcane disease research in China: Recent Developments. *Sugar Tech* 6(4):261–265.

Joshi, D., Misra, S.C., 2013. Characterization of *Trichoderma* Isolates from Sugarcane Agro-Ecosystem and their Efficacy Against *Colletotrichum falcatum* Causing Red Rot of Sugarcane. *Sugar Tech*. 15(2): 192-196.

Kaclock R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, C., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives* 104 (4): 715-740

Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S., 2004. The Nature Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 (11): 1259-1266

Kucuk, C., Kivank, M., Kinaci, E., Kinaci, G., 2007. Efficacy of *Trichoderma harzianum* (Rifaii) on inhibition of ascochyta blight disease of chickpea. *Annals of Microbiology*. 57 (4): 665-668

- Kullning-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P., 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. 106 (7): 757-767
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S., 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 48: 113-121
- Lin, Y., Du, D., Si, C., Zhao, Q., Li, Z., Li, P., 2014. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumber. Biological Control. 71: 7-15.
- McFarlane, G.P., Rutherford R.S., 2010. *Fusarium* species causing Pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (lepidoptera: pyralidae). Proc S Afr Sug Technol Ass. 83: 267 – 270.
- Mohammadi, A., Nejad, R.F., Mofrad, N.N., 2012. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. Plant Protect. Sci. 48 (2): 80-84.

- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I., 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 465–493.
- Phae, C., Shoda, M., 1991. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. *J Ferment Bioeng* 71:118–121
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S., 2013. Isolation and Characterization of *Bacillus* sp with In-vitro Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of Tomato. *J. Agr. Sci. Tech.* 15: 1501-1512
- Prasad, B.N., Kumar, M.R., 2011 Effect of Non-Volatile Compounds Produced by *Trichoderma* spp. On Growth Sclerotial Viability of *Rhizoctonia solani*, incitant of Sheath Blight of Rice. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences.* 1(2): 37-42
- Raut, I., Calin, M., Vasilescu, G., Badea Doni, M., Sesan, T., Jecu, L., 2014 Effect of non volátil compounds of *Trichoderma* spp. against *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Scientific Bulletin. Series F Biotechnologies.* 18: 178-181
- Recep, K., Fikrettin, S., Erkol, D., Cafer, E., 2009. Biological control of potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. *Biological control.* 50:194-198

- Reza Ojaghian, M., 2011. Potential of *Trichoderma* spp. And *Talaromyces flavus* for biological control of potato steam rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica*. 39: 185-193
- Rini, C.R., Sulochana, K.K., 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. *Journal of Tropical Agriculture*. 45 (1-2): 21-28.
- Saidi, N., Kouki, S., M'Hiri, F., Hajlaoui, M.R., Mahrouk, M., Ouzari, H., Jedidi, N., Hassen, A., 2009. Characterization and selection of *Bacillus* sp. strains, effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopeersici* the causal agent of *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Annals of Microbiology*. 59 (2): 197-198
- Samuels, G.J., Lieckfeldt, E., Nirenberg, H.I., 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 5 (1): 71-881
- Singh, A., Chauhan, S.S., Singh, A., Singh, S.B., 2006. Deterioration in sugarcane due to Pokkah Boeng disease. *Sugar Tech* (2-3): 187-190
- Singh, R.K., Kumar, P., Tiwari, N.N., Singh, S.P., Tiwari, A.K., Vishwakarma, S.K., Singh, A., Kumar, A., 2014. Role of Endochitinase Gene and Efficacy

of *Trichoderma* Against *Colletotrichum falcatum* Went. Causing Red Rod Disease in Sugarcane. Sugar Tech 16 (2): 180-188

Sing, S. N., and G. P. Goswami., 2002. An estimation of damage to sugarcane by wilt disease due to *Fusarium moniliforme*. Indian Phytopath, 55 (4): 494-496.

Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocadium*. 139-191. In: *Trichoderma and Gliocadium*. Vol. I. C.P.Kubicek and G.E. Harman, eds. Taylor and Francis, London.

Sood, A., Sharma, S., Kumar, V., 2007. Comparative efficacy of diffusible and volatile compounds of tea rhizospheric isolates and their use in biocontrol. Int. J. Biolo. Chem. Sci. 1 (1): 28-34

Van der Werf H.M.G. 1996. Assessing the impact of pesticides on environment. Agriculture. Ecosystems & Environment 60: 81-96

Vishwakarma S.K., Kumar, P., Nigam, A., Singh, A., Kumar, A., 2013. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. J Plant Pathol Microb 4: 170.

Viswanathan R., and G. P. Rao. 2011. Disease scenario and management of major sugarcane diseases in India. Sugar Tech 13(4):336–353.

- Viswanathan R., Poongothai, M., Malathi, P., 2011. Pathogenic and molecular confirmation of *Fusarium sacchari* causing wilt in sugarcane. Sugar Tech 13 (1): 68-76.
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, Y., Shen, Q., 2013. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of Fusarium wilt of banana. Biol. Fertil Soils. 49: 435-446.
- Waraitch, K.S. 1981. Wilt disease in Co 1148 in Punjab and assessment of losses caused by it. Indian Sugar 31: 37–40.
- Widmer, T., 2014. Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil. Biological Control. 79: 43-48
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., Hockehull, J., 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv . *campestris*. Plant Pathol 51:574–584
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., 2012. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. Appl. Environ. Microbiol. 78 (16): 5942-5944

Zhao, Q., Ran, W., Wang, H., Li, X., Shen, Q., Shen, S., Xu, Y., 2013. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IV1. BioControl. 58: 283-292

Conclusiones

Tanto *Fusarium verticillioides* como *Fusarium proliferatum* aislados de plantas con síntomas con Pokkah boeng son capaces de reproducir los síntomas de la enfermedad en tallos de cañas inoculadas artificialmente.

Cepas nativas de *Tichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* así como de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, son capaces de inhibir a ambos patógenos

Tanto *Trichoderma* como *Bacillus* utilizan diferentes mecanismos de acción para inhibir el crecimiento de ambas especies de *Fusarium*, entre ellos la producción de compuestos volátiles y no volátiles, micoparasitismo así como competencia por nutrientes y espacio.

Recomendaciones

Se recomienda realizar pruebas en invernadero y campo para evaluar el verdadero potencial antagónico e inhibidor de las mejores cepas determinadas en este estudio, para que se constituya en una alternativa viable y ecológica para los productores de caña de azúcar.

Profundizar en la capacidad de producción de sideróforos y solubilización de nitratos para evaluar la capacidad de inducir resistencia sistémica adquirida en planas de caña