



EFFECTO DE ESPECIES DE *Trichoderma* SOBRE LA INCIDENCIA DE *F. verticillioides* EN CUATRO GENOTIPOS DE MAÍZ †

[*Trichoderma* SPECIES EFFECT ON THE INCIDENCE BY *F. verticillioides* IN FOUR MAIZE GENOTYPES]

Epifanio Castro-del Ángel, Abiel Sánchez-Arizpe*,
Ma. Elizabeth Galindo-Cepeda and Mario Ernesto-Vázquez Badillo

Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México. E-mails:
epifaniocastrodelangel@hotmail.com, *abielsanchez@hotmail.com,
liz16gace@hotmail.com, marioe.vazquez@hotmail.com

* Corresponding author

SUMMARY

Background. *Fusarium verticillioides* is a fungus most frequently isolated from corn cobs and the most widely distributed in the world; affecting a wide range of hosts and contaminated products with mycotoxins. **Objective.** The present study aimed to determine the incidence of *F. verticillioides* in four maize genotypes treated with *Trichoderma* strains as biocontrol under field conditions. **Methodology.** Three *Trichoderma* strains were inoculated by three inoculation methods to test their effectiveness in controlling the fungus *F. verticillioides*. Four maize genotypes were used to determine this effect. The antagonist strains were inoculated at sowing time as seed inoculation and foliar spray applied in stage R2 and R3. **Results.** *Fusarium verticillioides* was identified morphologically and molecularly. The three strains significantly reduced the incidence of the fungus, however *T. harzianum* T1-4 was the one that presented the best control. The evaluated methods, seed inoculation and foliar spraying evaluated simultaneously significantly reduced the incidence of the phytopathogen. The Mestizo Diamante genotype presented a better response to the invasion by *F. verticillioides* in interaction with the antagonist strains. **Implications.** Due to the limited field work for the biological control of *F. verticillioides*, the present results contribute to this scarce information. **Conclusion.** *Trichoderma* species reduced the incidence of *F. verticillioides* in maize genotypes from the state of Veracruz. **Key words:** Detection; biocontrol; seed health; antagonists.

RESUMEN

Antecedentes. *Fusarium verticillioides* es el hongo más frecuentemente aislado en mazorcas de maíz y el más ampliamente distribuido en el mundo; afectando un amplio rango de hospederos y contaminando los productos con micotoxinas. **Objetivo.** El presente estudio tuvo como objetivo determinar la incidencia de *F. verticillioides* en cuatro genotipos de maíz tratados con cepas de *Trichoderma* como biocontrol bajo condiciones de campo. **Metodología.** Tres cepas de *Trichoderma* fueron inoculadas mediante tres métodos de inoculación para probar su efectividad en el control del hongo *F. verticillioides*. Se utilizaron cuatro genotipos de maíz para conocer tal efecto. Las cepas de los antagonistas fueron inoculadas al momento de la siembra como inoculación de semilla y aspersión foliar aplicada en etapa R2 y R3. **Resultados.** Se identificó a *F. verticillioides* morfológica y molecularmente. Las tres cepas redujeron significativamente la incidencia del hongo, sin embargo *T. harzianum* T1-4 fue la que presentó el mejor control. De los métodos evaluados la inoculación a la semilla y la aspersión foliar evaluadas simultáneamente redujeron significativamente la incidencia del fitopatógeno. El genotipo Mestizo Diamante presentó mejor respuesta a la invasión de *F. verticillioides* en interacción con las cepas de los antagonistas. **Implicaciones.** Debido a los escasos trabajos de campo para el control biológico de *F. verticillioides* los presentes resultados contribuyen a esa escasa información. **Conclusión.** Las especies de *Trichoderma* redujeron la incidencia de *F. verticillioides* en los genotipos de maíz del estado de Veracruz.

Palabras clave: Detección; biocontrol; sanidad de semilla; antagonistas.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales con mayor superficie sembrada a nivel mundial, debido a su importancia en la alimentación humana y animal. En este cultivo son muchos los agentes etiológicos que

inducen enfermedades, sin embargo, en el mundo *Fusarium verticillioides* (teleomorfo *Gibberella moniliformis*) es el principal agente fúngico de la pudrición de la mazorca y del grano del maíz (Wang *et al.*, 2016; Baghbani *et al.*, 2019); es un fitopatógeno altamente toxigénico, capaz de producir micotoxinas

† Submitted December 23, 2020 – Accepted March 1, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

cancerígenas como las fumonisinas (Covarelli *et al.*, 2012; Chavarri *et al.*, 2017; Brito *et al.*, 2019). Las micotoxinas son metabolitos secundarios que pueden acumularse en alimentos y piensos, causan daño a los animales y, potencialmente, a los humanos por su carcinogenicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. Aunque muchos cultivos son susceptibles a la infección por estas especies de hongos, los cereales son motivo de especial preocupación debido a sus niveles de contaminación por micotoxinas y su uso en alimentos crudos o procesados (Blacutt *et al.*, 2018; Caglayan y Üstündağ 2020). La fumonisina B1 (FB1) es una micotoxina producida por *F. verticillioides* que se encuentra en varios cultivos, particularmente maíz. Además de la carcinogenicidad, se han registrado otras manifestaciones en diferentes animales y en humanos. En el caso de humanos, los estudios epidemiológicos han reportado una alta prevalencia de cáncer de esófago en poblaciones expuestas a fumonisinas (Andrzejewski *et al.*, 2020). Estudios previos demostraron que la FB1 tiene efectos sobre el hígado y los riñones, también se vieron afectados de forma adversa una amplia variedad de parámetros, incluidos el colesterol y la creatina quinasa (Gelderblom *et al.*, 2001). Varios parámetros sanguíneos, incluidos los glóbulos blancos y rojos, también disminuyeron significativamente en los animales tratados. El nivel de esfingánina sérica y la proporción de esfingosina / esfingánina, monitoreados hacia el final del experimento, aumentaron significativamente tanto en los animales de dosis baja como en los de dosis alta. Estos autores aportan información importante sobre la diversidad de lesiones inducidas por el material de cultivo de *F. verticillioides* en monos vervet y los niveles de dosis de fumonisinas que se utilizaron en estudios a largo plazo en primates no humanos. Actualmente, las buenas prácticas agrícolas representan (BPA) la mejor línea de defensa para controlar la contaminación del maíz por toxinas. Las fluctuaciones anuales en las condiciones climáticas pueden reducir considerablemente las ventajas conferidas por las BPA y, por lo tanto, la integración con las estrategias de control biológico puede ser una forma sostenible de lograr un control confiable de la colonización por *Fusarium* y la contaminación por toxinas. *Trichoderma harzianum* es un agente de control biológico contra una amplia gama de fitopatógenos, estudios han informado de su capacidad para reducir la colonización de *F. verticillioides* en condiciones de invernadero (Ferrigo *et al.*, 2014). Al respecto otros métodos preventivos contra la contaminación de fumonisinas fueron estudiados por Tran *et al.* (2021) al implementar la eliminación de mazorcas dañadas, el transporte del maíz a casa después de la cosecha, el descascarado del maíz lejos de los campos y secado del maíz en patios de cemento. Estas prácticas redujeron la contaminación del maíz después de la cosecha con *F. verticillioides* y fumonisina B1 (FB1), FB2 y FB3. Sin embargo,

todavía hay margen de mejora con respecto al método inadecuado de secado al aire libre, la infraestructura de almacenamiento y manejo deficiente del contenido de humedad, ya que se correlacionan con la proliferación de *F. verticillioides*. Por su parte Nguyen *et al.* (2018) reportan resultados favorables como potencial de biocontrol de la microflora de actinomicetos de enmiendas orgánicas frente a *F. verticillioides*. El efecto inhibidor fue demostrado sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas (fumonisinas FB1 y FB2) en presencia de suelos modificados y agentes antagonistas seleccionados de las modificaciones. La producción de fumonisinas se redujo por los metabolitos producidos por la microbiota de los suelos modificados, hasta un 68.7 % y un 92.5 % para FB1 y FB2 respectivamente. Otros estudios realizados por Shawki *et al.* 2020 reportaron alternativas al control químico de *F. verticillioides* como lo fue el uso de silicato de potasio, el ácido nicotínico, los antagonistas *T. harzianum*, *T. hamatum* y *Bacillus subtilis*, en condiciones *in vitro*, invernadero y en campo. Los resultados aseguraron que el ácido nicotínico, *T. harzianum* y *T. hamatum* y el silicato de potasio fueron los mejores tratamientos en comparación con el fungicida químico. Por lo anterior ésta investigación tuvo como objetivo determinar la incidencia de *F. verticillioides* en cuatro genotipos de maíz tratados con cepas de *Trichoderma* como biocontrol bajo condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de los antagonistas

Las cepas utilizadas en la investigación fueron *Trichoderma longibrachiatum* T1-40, *T. asperellum* T11 y *T. harzianum* T1-4, proporcionadas por la M.C. Angélica María Berlanga Padilla.

Reproducción masiva de *Trichoderma* spp. sobre granos de arroz

La producción en laboratorio se llevó a cabo siguiendo la metodología de Gómez *et al.* (2014) con modificaciones. Se utilizaron granos de arroz de segunda calidad, se lavó tres veces con agua corriente de la llave, se dejó en hidratación por 30 min en agua destilada, posteriormente se extrajo el exceso de agua, se secó por 20 min. Una vez que se eliminó el exceso de agua, se depositaron 300 gr en bolsas de polipropileno, la boca de la bolsa se ató con una liga, una vez listas todas las bolsas se esterizaron durante 20 min a 18 psi (120 Kg/cm²), se retiraron las bolsas de la autoclave y se dejaron reposar durante 24 h. Después de 24 h se inocularon con 10 mL de suspensión conidial de *Trichoderma* spp. con una concentración de 1×10^9 conidios/mL, la inoculación se realizó con una micropipeta de 1000 µL y el orificio que dejó la puntilla después de la inoculación se selló

con cinta masking tape, finalmente se homogenizó el arroz con los conidios de los antagonistas y se incubó a 28 ± 2 °C por dos semanas, moviendo las bolsas cada tres días, para obtener una buena esporulación. Al observar esporulación homogénea, las bolsas fueron abiertas y se dejaron en un cuarto oscuro para el secado. Los conidios que se produjeron fueron cosechados con la ayuda de un tamiz y guardados en bolsas de papel estériles, bajo refrigeración a 4 °C.

Efecto de biocontrol de *Trichoderma* spp. sobre *F. verticillioides*

Se utilizaron semillas de maíz libres de cualquier tratamiento químico de los genotipos Mestizo Diamante, H-520 fl, Criollo Blanco y UAAAN-ISP-173, con adaptaciones a zonas tropicales; los dos primeros de naturaleza híbrida y los dos últimos

criollos. La siembra se realizó de forma manual, el experimento se estableció en un diseño de bloques al azar con arreglo factorial de 3 factores e infección natural por *F. verticillioides*. La investigación fue desarrollada en la zona norte del estado de Veracruz, en la región Huasteca Veracruzana. Los tratamientos se designaron como se reporta en la tabla 1. El experimento se realizó con cuatro repeticiones por cada tratamiento, cada repetición consistió de cinco surcos más un testigo sin inocular de cada genotipo. Las especies de *Trichoderma* fueron inoculadas en dos etapas: la primera inoculación al momento de la siembra (10g/kg de semilla) y la segunda en etapa R2 y R3 (1×10^9 conidios/mL). La densidad de población fue de 55,555 plantas/hectárea.

Antes de establecer los genotipos se realizaron pruebas de sanidad de la semilla para estimar los niveles de *F. verticillioides* previamente a sembrarlos.

Tabla 1. Tratamientos con tres especies de *Trichoderma* y tres métodos de inoculación en cuatro genotipos de maíz para el control de *F. verticillioides* bajo condiciones de campo.

Código	Tratamiento	Código	Tratamiento	Código	Tratamiento
IS-H-Tl	Inoculación a semilla; H-520; <i>T. longibrachiatum</i>	IS-H-Ta	Inoculación a semilla; H-520; <i>T. asperellum</i>	IS-H-Th	Inoculación a semilla; H-520; <i>T. harzianum</i>
IS-MD-Tl	Inoculación a semilla; Mestizo Diamante; <i>T. longibrachiatum</i>	IS-MD-Ta	Inoculación a semilla; Mestizo Diamante; <i>T. asperellum</i>	IS-MD-Th	Inoculación a semilla; Mestizo Diamante; <i>T. harzianum</i>
IS-CB-Tl	Inoculación a semilla; Criollo Blanco; <i>T. longibrachiatum</i>	IS-CB-Ta	Inoculación a semilla; Criollo Blanco; <i>T. asperellum</i>	IS-CB-Th	Inoculación a semilla; Criollo Blanco; <i>T. harzianum</i>
IS-UI1-Tl	Inoculación a semilla; UAAAN-ISP-173; <i>T. longibrachiatum</i>	IS-UI1-Ta	Inoculación a semilla; UAAAN-ISP-173; <i>T. asperellum</i>	IS-UI1-Th	Inoculación a semilla; UAAAN-ISP-173; <i>T. harzianum</i>
AF-H-Tl	Aspersión Foliar; H-520; <i>T. longibrachiatum</i>	AF-H-Ta	Aspersión Foliar; H-520; <i>T. asperellum</i>	AF-H-Th	Aspersión Foliar; H-520; <i>T. harzianum</i>
AF-MD-Tl	Aspersión Foliar; Mestizo Diamante; <i>T. longibrachiatum</i>	AF-MD-Ta	Aspersión Foliar; Mestizo Diamante; <i>T. asperellum</i>	AF-MD-Th	Aspersión Foliar; Mestizo Diamante; <i>T. harzianum</i>
AF-CB-Tl	Aspersión Foliar; Criollo Blanco; <i>T. longibrachiatum</i>	AF-CB-Ta	Aspersión Foliar; Criollo Blanco; <i>T. asperellum</i>	AF-CB-Th	Aspersión Foliar; Criollo Blanco; <i>T. harzianum</i>

Código	Tratamiento	Código	Tratamiento	Código	Tratamiento
AF-UI1-Tl	Aspersión Foliar; UAAAN-ISP- 173; <i>T.</i> <i>longibrachiatum</i>	AF-UI1-Ta	Aspersión Foliar; UAAAN-ISP- 173; <i>T.</i> <i>asperellum</i>	AF-UI1-Th	Aspersión Foliar; UAAAN-ISP- 173; <i>T.</i> <i>harzianum</i>
IS+AF-H-Tl	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; H-520; <i>T.</i> <i>longibrachiatum</i>	IS+AF-H-Ta	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; H-520; <i>T.</i> <i>asperellum</i>	IS+AF-H-Th	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; H-520; <i>T.</i> <i>harzianum</i>
IS+AF-MD-Tl	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; Mestizo Dimante; <i>T.</i> <i>longibrachiatum</i>	IS+AF-MD-Ta	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; Mestizo Dimante; <i>T.</i> <i>asperellum</i>	IS+AF-MD-Th	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; Mestizo Dimante; <i>T.</i> <i>harzianum</i>
IS+AF-CB-Tl	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; Criollo Blanco; <i>T.</i> <i>longibrachiatum</i>	IS+AF-CB-Ta	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; Criollo Blanco; <i>T. asperellum</i>	IS+AF-CB-Th	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; Criollo Blanco; <i>T. harzianum</i>
IS+AF-UI1-Tl	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; UAAAN-ISP- 173; <i>T.</i> <i>longibrachiatum</i>	IS+AF-UI1-Ta	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; UAAAN-ISP- 173; <i>T.</i> <i>asperellum</i>	IS+AF-UI1-Th	Inoculación a semilla + Aspersión Foliar; UAAAN-ISP- 173; <i>T.</i> <i>harzianum</i>

Detección, cuantificación e identificación de *F. verticillioides*

La cosecha se realizó 150 días después de la siembra, se seleccionaron las mazorcas de los tres surcos centrales de cada tratamiento (cuatro muestras; una por cada repetición) y se desgranaron para tomar 1000g de muestra, cada muestra se depositó en bolsas de papel y se rotuló para facilitar su identificación, posteriormente se determinó la sanidad de la semilla. Las muestras fueron procesadas por la metodología propuesta por Singh *et al.* (1974) con modificaciones, se seleccionaron 100 semillas asintomáticas de cada tratamiento de los genotipos en estudio y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1%, se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril y se secaron bajo campana de flujo laminar. Se realizó la siembra directa en medio de cultivo verde de malaquita agar. Las siembras fueron incubadas durante ocho días a 28°C. Para la detección de *F. verticillioides* se examinaron visualmente las semillas colonizadas por el fitopatógeno bajo un microscopio estereoscópico, donde se consideró el crecimiento característico de *F. verticillioides*.

Para la confirmación de la identidad de los aislamientos de *F. verticillioides* se realizó la caracterización macroscópica de las colonias y el estudio morfológico de las estructuras características del hongo (Nelson, 1992; Leslie y Summerell, 2006). Se realizaron preparaciones de laminillas con lactofenol azul de algodón para la identificación del fitopatógeno en estudio. Se determinó la incidencia de *F. verticillioides* considerando el número de semillas colonizadas por el hongo, en relación al total de semillas procesadas para cada tratamiento.

Análisis estadístico

Para detectar diferencias significativas en el biocontrol por parte de los antagonistas, los resultados de incidencia fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de separación de medias por Tukey (P=0.05), se utilizó el programa SAS versión 9.0 para Windows.

Confirmación molecular de *F. verticillioides*

Extracción de ADN genómico

Se procedió de un cultivo puro de *F. verticillioides* de 10 días de edad. Primero se molió en un mortero el tejido fúngico. Posteriormente en un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 0.1 mL de tejido macerado, más un volumen igual de perlas de vidrio, se agregaron 500 µL de solución amortiguadora de extracción (EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.5%) y se mezcló en vortex por 15 minutos. Subsecuentemente se adicionaron 500 µL de la solución Fenol-Cloroformo (1:1) y se mezcló en vortex por 15 minutos. Durante 4 horas se dejó en reposo hasta que se separaron dos fases, se tomó la muestra de 500 µL de la fase inferior. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos. En un tubo nuevo se recuperó la fase acuosa y se agregaron 2.0 µL de RNAsa (10 mg/mL) a la fase acuosa e incubándose por 30 minutos a 37°C en el termomix. Se adicionaron 0.33 volúmenes de Isopropanol a -20°C y se mezcló suavemente. Después se incubó a -20°C para que el DNA precipitara por 30 minutos, centrifugándose a 12,000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se lavó con 500 µL de Etanol al 70% a -20°C, agitando hasta despegar la pastilla y centrifugando a 12,000 rpm por 5 minutos. El líquido se decantó y posteriormente los tubos se invirtieron para secar la pastilla en campana de flujo laminar por aproximadamente 15 minutos. Después se resuspendió la pastilla de ADN en 25 µL de TE 1X, para la electroforesis se cargaron 3 µL de ADN, con 3 µL de gel red y por último la calidad del ADN se cuantificó en NanoDrop (Nicholson *et al.*, 2001).

Amplificación por ITS's (PCR)

El ADN genómico se amplificó a partir de las regiones transcritas internas de ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (ADNr) 18S-5.8S y 5.8S-28S, utilizando pares de oligonucleótidos ITS1 (KIO Fw 5'-TAGAGGAAGTAAAAGTCGTA-3') e ITS4 (KIO Rv 5'-TCCTCCGCTTWTGTGWT-3'). Cada muestra contenía solución amortiguadora 10x + MgCl₂ 2.5 µL; dNTP 10 mM 1 µL; ITS1 a 10 µM, 1 µL; ITS4 10 µM, 1 µL; Taq polimerasa 1U 0.2 µL. El ADN problema se ajustó a 40 ng/µL, 1.5 µL; y se añadieron 17.8 µL de agua esterilizada ultrapura para ajustar un volumen final a 25 µL. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos; 35 ciclos de alineación a 48°C durante 15 segundos; 35 ciclos de extensión a 72°C durante 45 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min. La amplificación se observó en gel de agarosa al 1% mediante electroforesis a 60 V. Los productos de PCR fueron enviados al laboratorio MacroGen (Rockville, USA) para la secuenciación.

Las secuencias obtenidas se compararon con las registradas en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección e identificación de *F. verticillioides*

El hongo *F. verticillioides* fue detectado en semillas de maíz de diferentes genotipos del estado de Veracruz. La identificación del fitopatógeno se hizo en 480 aislamientos (10 por cada tratamiento) por observación de macroconidios en forma de hoz a casi rectos con la superficie dorsal y ventral casi paralelos, de pared delgada con una célula basal en forma de pie y una célula apical alargada. Con macro-conidióforos no ramificados y con monofiálides ramificados. Los microconidios fueron unicelulares y de ovoides a obovoides con base truncada agrupados en cadenas y cabezas falsas y con base truncada (Nelson, 1992). No se observó formación de clamidosporas en el micelio (Leslie y Summerell, 2006). La corroboración molecular detectó 100% de similitud con la cepa CBS 576.78 depositada en la base de datos del GenBank, la identificación molecular se determinó a cuatro aislamientos del hongo (uno por cada genotipo).

Efecto de biocontrol de *Trichoderma* spp. sobre *F. verticillioides*

La incidencia de *F. verticillioides* frente al testigo, a través de la inoculación de cepas de *Trichoderma* spp. el valor medio más bajo se obtuvo con la cepa *T. harzianum* T1-4, seguida de *T. longibrachiatum* T1-40 y en último lugar *T. asperellum* T11. De acuerdo a la figura 1, hubo diferencia significativa con respecto a la capacidad de las cepas de *Trichoderma* de suprimir el desarrollo de *F. verticillioides* en el ensayo de campo. El tratamiento que recibió a *T. asperellum* T11 presentó mayor incidencia (66.6%). Por lo tanto, el tratamiento con *T. longibrachiatum* T1-40 redujo la incidencia en 58.7%. La menor incidencia se logró con la cepa *T. harzianum* T1-4 (66.6%) ($P < 0.0001$). El hongo *Trichoderma* es cosmopolita, su importancia radica en la capacidad de adaptación y producción de metabolitos, como enzimas, compuestos promotores de crecimiento vegetal y compuestos volátiles, entre otros. Este género es utilizado como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos debido a sus múltiples mecanismos de acción, destaca la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por el espacio y nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). El éxito de *Trichoderma* se basa en su capacidad de sintetizar compuestos antagónicos como proteínas, enzimas, antibióticos y sustancias promotoras de crecimiento vegetal como son vitaminas y hormonas (Navaneetha *et al.*, 2015). La cepas *T. pseudokoningii* y *T.*

harzianum presentan ventaja competitiva endofítica sobre el desarrollo de *F. verticillioides* en plantas de maíz (Sobowale *et al.*, 2007). Además, estas especies inoculadas en el tallo del maíz tienen un efecto en la reducción del contenido de fumonisinas y la presencia de *Fusarium verticillioides* en semillas, dependiendo del patrón de presencia de *Trichoderma* dentro del tallo del maíz (Sobowale, 2019). Por otra parte, *T. harzianum* tiene la capacidad de controlar a *F. verticillioides* y *F. graminearum* reduciendo la incidencia y severidad de la enfermedad en plantas de maíz en condiciones de invernadero y campo, induciendo resistencia sistémica por la vía ISR y SAR (Ferrigo *et al.*, 2020).

En el híbrido Mestizo Diamante, los aislamientos *T. longibrachiatum* cepa T1-40 y *T. asperellum* T11 redujeron significativamente la incidencia de *F. verticillioides* (63.3%) ($P < 0.0292$) comparados con el testigo (97%). En cambio, el aislamiento *T. harzianum* T1-4 redujo la incidencia en el genotipo UAAAN-ISP-173. La incidencia de *F. verticillioides* en el híbrido H-520 fue de 69.30% cercana al Criollo Blanco (70.40%). En la figura 2 se muestran los valores promedio de incidencia de *F. verticillioides* en los cuatro genotipos mediante la acción de las cepas en los tres métodos de inoculación utilizados. Esto confirma que los aislamientos de *Trichoderma* son una opción al manejo del patógeno *F. verticillioides*. Resultados prometedores se reportan con *T. harzianum* en tres

diferentes genotipos de maíz (pioneer, kanchan y sweet corn), con cualidades de resistente, moderadamente resistente y susceptible, respectivamente, a la invasión de *F. verticillioides*, los rangos de incidencia fueron diferentes en cada cultivar, encontrándose la más alta en el susceptible (Chandra *et al.*, 2008). La mayoría de las especies de *Fusarium* son parásitos facultativos y pueden permanecer en forma saprófita en el suelo o rastrojo, pero cuando las condiciones ambientales son favorables se constituyen en fuente de inóculo, iniciándose una interacción con el hospedero durante el ciclo de cultivo y ocasionar síntomas severos en genotipos susceptibles (Cisneros *et al.*, 2007).

La aplicación combinada de *Trichoderma* spp. reduce significativamente la incidencia de *F. verticillioides* en genotipos de maíz. El patógeno se redujo 59% en los tratamientos de inoculación a semilla y aspersión foliar (IS+AF) ($P < 0.0001$) evaluadas simultáneamente, seguido por la aspersión foliar (AF) (65.30%) y 77.6% en la inoculación de semilla (IS). El uso de *T. harzianum* como formulación de polvo y líquida, en condiciones de campo, como tratamiento de semilla y aspersión foliar, sola y en combinación redujeron la infección de *F. verticillioides* en tres genotipos de maíz y así mismo los niveles de fumonisinas (Chandra *et al.*, 2008). La entrada de *F. verticillioides* a la planta de maíz, es por los estigmas y por conductos vasculares

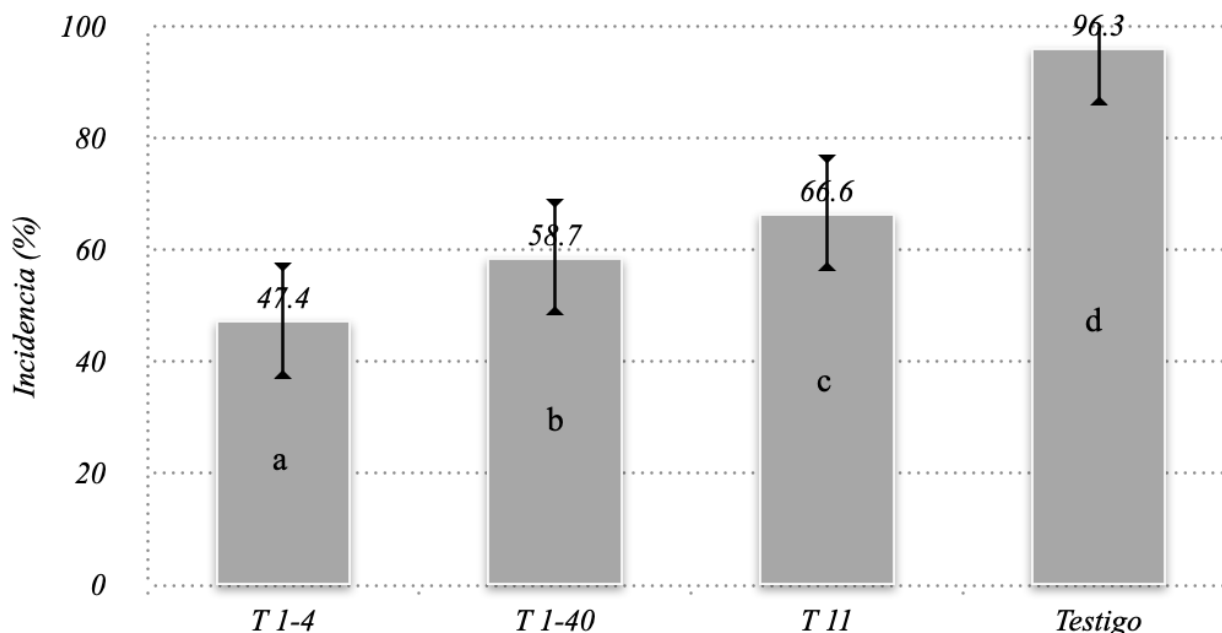


Figura 1. Efecto de cepas de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de *F. verticillioides* en cuatro genotipos de maíz y tres métodos evaluados. Medias con misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey en $p=0.05$. Las barras muestran el error estándar.

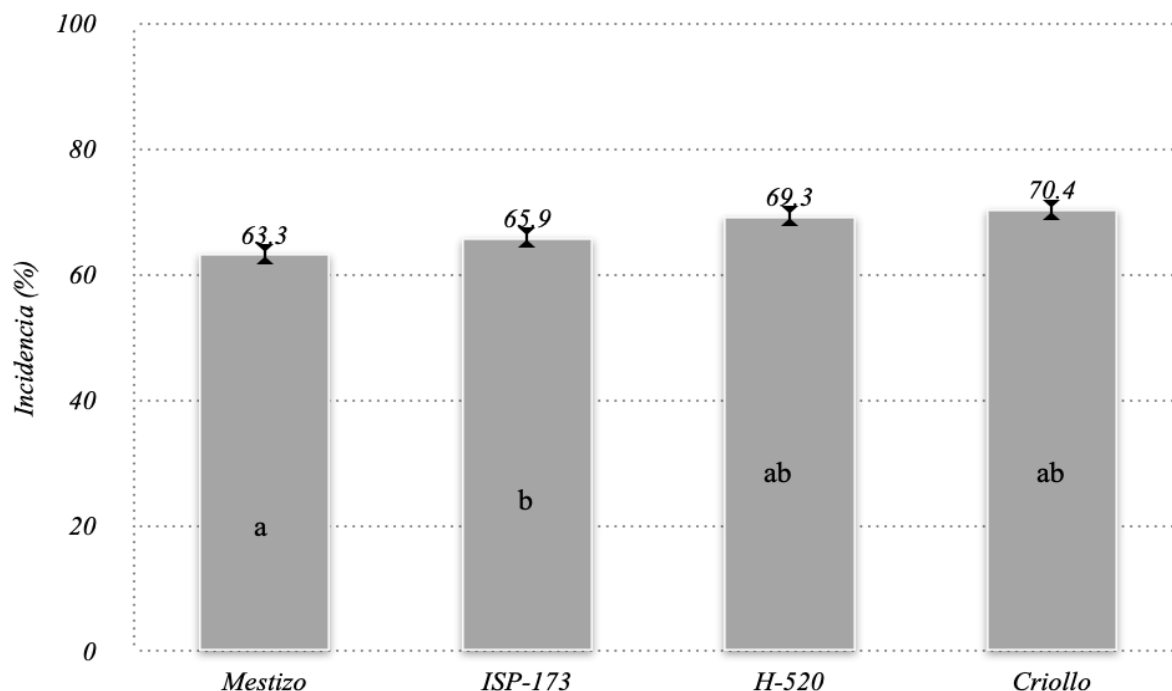


Figura 2. Efecto de *Trichoderma* spp. en la incidencia de *F. verticillioides* en cuatro genotipos de maíz y tres métodos evaluados. Medias con misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey en $p=0.05$. Las barras muestran el error estándar.

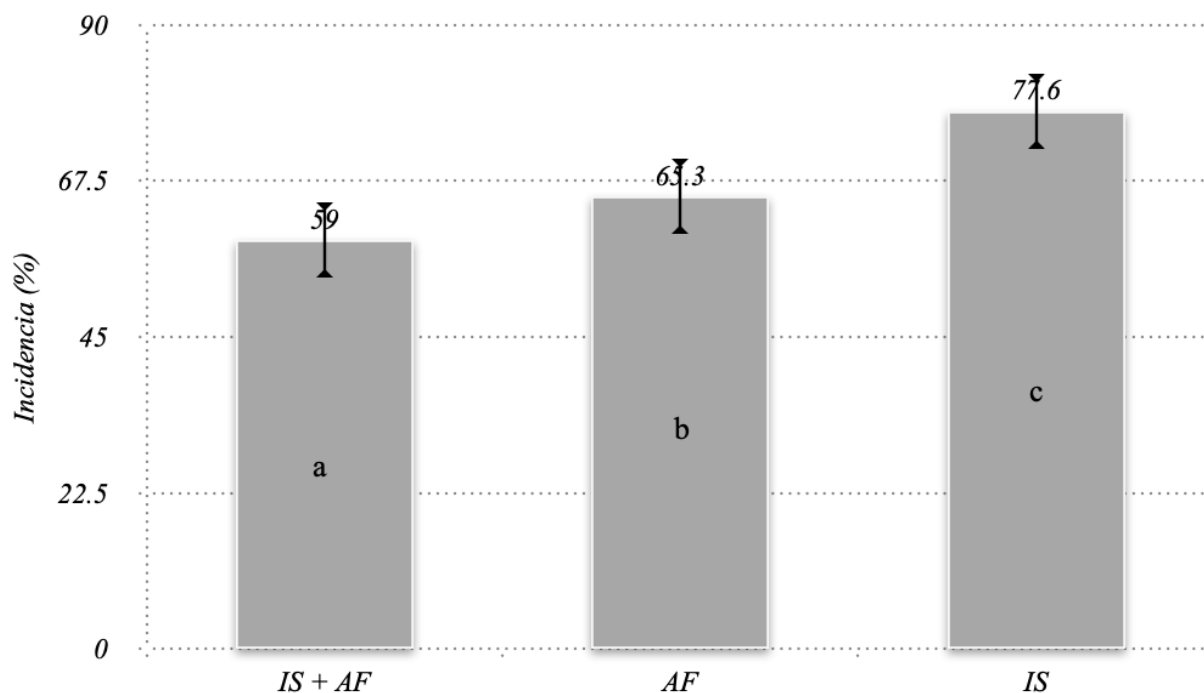


Figura 3. Efecto de *Trichoderma* spp. en la incidencia de *F. verticillioides* con tres tratamientos diferentes. Medias con misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey en $p=0.05$. Las barras muestran el error estándar.

por la vía de meristemas, siendo el más efectivo por los estigmas (Duncan y Howard 2010; Ju *et al.*, 2017); en ésta investigación se observó que en los tratamientos de inoculación de la semilla la incidencia fue mayor que en las plantas inoculadas por aspersión foliar (figura 3), esto demuestra que la entrada eficiente del fitopatógeno a la planta de maíz es por los estigmas. Otra forma de infección y colonización de las partes superiores de la planta de maíz por *F. verticillioides* se produce a través de heridas provocadas por insectos, aves u otros y, sobre todo, a través de los estigmas expuestos; el hecho de que no estén protegidos por las brácteas como sí lo están los granos, los dispone como un primer punto de contacto, considerándose una vía principal de entrada para hongos e insectos (Miller *et al.*, 2007). Nuestros resultados demuestran la reducción de colonización del fitopatógeno al proteger las principales vías de entrada de este.

La presencia de *F. verticillioides* en granos de maíz claramente disminuyó por el efecto de *Trichoderma* spp., y el hecho de tratar simultáneamente las

principales vías de entrada del fitopatógeno el control pudo ser apreciado (tabla 2). La incidencia del fitopatógeno en el híbrido H-520 fue de 8.0% con el tratamiento IS+AF por la acción de *T. harzianum* T1-4, mientras que con *T. longibrachiatum* T1-40 y *T. asperellum* T11 fue de 50% y 81%, respectivamente. Las plantas sin inocular mostraron la más alta incidencia (95%). En cambio, en el genotipo Mestizo Diamante, sobresalieron *T. longibrachiatum* T1-40 y *T. asperellum* T11 con 33% y 26%, respectivamente en comparación al testigo (97%), mientras que en los genotipos UAAAN-ISP-173 y Criollo Blanco, nuevamente figura *T. harzianum* T1-4 con 17% y 48%, respectivamente. Como se observa, el aislamiento *T. harzianum* T1-4 destaca con frecuencia de 66.67% en los genotipos y en los tres métodos de inoculación utilizados. El efecto de *T. asperellum* cepa GDFS1009 redujo la incidencia de *F. graminearum* y *F. verticillioides*, así como el contenido de deoxynivalenol y fumonisina B1 en tallos de maíz (He *et al.*, 2019). Por otra parte, *T. viride* tuvo efecto sobre la esporulación de *F. verticillioides* en rastrojo de trigo (Luongo *et al.*, 2005).

Tabla 2. Incidencia promedio de *F. verticillioides* con tres métodos de inoculación de tres cepas de *Trichoderma* spp. en cuatro genotipos de maíz.

Genotipos	Tratamientos	Cepas			
		T1-40	T11	T1-4	Testigo
H-520	IS	76±3.56 ^{C,a}	81±7.79 ^{A,b}	74±5.66 ^{C,a}	97±3.56 ^c
H-520	AF	63±4.97 ^{B,b}	89±4.32 ^{B,c}	20±4.08 ^{B,a}	98±1.63 ^d
H-520	IS+AF	50±8.16 ^{A,b}	81±12.27 ^{A,c}	08±5.42 ^{A,a}	95±5.77 ^d
Mestizo Diamante	IS	73±4.97 ^{C,a}	70±14.72 ^{C,a}	72±14.98 ^{C,a}	95±3.74 ^b
Mestizo Diamante	AF	41±4.55 ^{B,ab}	39±6.98 ^{B,a}	61±4.24 ^{B,b}	97±4.24 ^c
Mestizo Diamante	IS+AF	33±17.29 ^{A,b}	26±11.43 ^{A,a}	55±20.81 ^{A,c}	97±4.76 ^d
Criollo Blanco	IS	72±1.63 ^{C,b}	71±15.12 ^{C,ab}	68±8.04 ^{C,a}	99±1.41 ^c
Criollo Blanco	AF	57±17.77 ^{B,a}	66±15.40 ^{B,b}	56±25.24 ^{B,a}	96±5.66 ^c
Criollo Blanco	IS+AF	52±10.46 ^{A,ab}	62±9.09 ^{A,b}	48±17.20 ^{A,a}	98±4.00 ^c
UAAAN-ISP-173	IS	72±2.45 ^{C,a}	72±3.26 ^{A,a}	59±6.48 ^{C,a}	90±2.16 ^b
UAAAN-ISP-173	AF	61±4.97 ^{B,b}	72±6.68 ^{A,c}	31±8.41 ^{B,a}	98±4.00 ^d
UAAAN-ISP-173	IS+AF	54±25.77 ^{A,b}	70±18.26 ^{A,c}	17±9.45 ^{A,a}	95±10.00 ^d

Medias con misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey en $p=0.05$. Letras mayúsculas representan comparación entre métodos de aplicación*genotipo; letras minúsculas indican comparación entre cepas en cada método evaluado en interacción con cada genotipo. ± es la desviación estándar.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de *Fusarium verticillioides* en los genotipos de maíz utilizados en ésta investigación, el manejo del fitopatógeno resultó favorable con las especies de *Trichoderma* implementando el método de inoculación de la semilla y la aspersión foliar evaluadas simultáneamente. La cepa sobresaliente en la reducción de la incidencia del hongo fue la especie *T. harzianum* T1-4.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca para realizar los estudios de postgrado de Epifanio Castro del Ángel, así mismo agradecemos a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el financiamiento de la investigación y a la M.C. Angélica María Berlanga Padilla por el otorgamiento de las cepas de los antagonistas.

Financiamiento. La investigación fue financiada por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con beca para el estudiante de maestría Epifanio Castro del Ángel, y por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Conflicto de intereses. Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses en la presente investigación.

Cumplimiento de estándares de ética. Por la naturaleza del trabajo, no requirió de aprobación por comité de bioética.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con Epifanio Castro del Ángel, epifanio.castro@uaan.edu.mx, con previa solicitud.

REFERENCIAS

- Andrzejewski K. T. F., Dalla, L. D. F., Dias, Q. L., Gomes, S. E., Kaminski, T. A., Favero, R. P., Meneghello, F. A., Mansur, M. M., and Souza de, O.L.F. 2020. Fumonisin B1 induces toxicity in human leukocytes at low concentrations: Are computational studies effective to determine biosafety?. *Toxicon*. 182:7-12. doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.100.
- Baghbani, F., Lotfi, R., Moharramnejad, S., Bandehagh, A., Roostaei, M., Rastogi, A., and Kalaji, H. M. 2019. Impact of *Fusarium verticillioides* on chlorophyll fluorescence parameters of two maize lines. *European Journal of Plant Pathology*. 154:337-346. doi.org/10.1007/s10658-018-01659-x.
- Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M., and Glenn, A. E. 2018. *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity, Virulence, and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*. 108:312-326. doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW.
- Brito, V. D., Achimóna, F., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P., y Zygadlo, J. A. 2019. Trans-2-hexen-1-ol as a tool for the control of *Fusarium verticillioides* in stored maize grains. *Journal of Stored Products Research*. 82:123-130. doi.org/10.1016/j.jspr.2019.05.002.
- Caglayan, M. O., and Üstündağ, Z. 2020. Detection of zearalenone in an aptamer assay using attenuated internal reflection ellipsometry and its cereal sample applications. *Food and Chemical Toxicology*, 136: 111081. doi:10.1016/j.fct.2019.111081.
- Chandra, N. S., Udaya, S. A. C., Reddy, M. S., Niranjana, S. R., Prakash, H. S., Shetty, H. S., and Paulino, M. C. A. N. 2008. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 43(3): 264-282. doi.org/10.1080/03235400701803879.
- Chavarri, M., Barroyeta, J., Ochoa, Y., Rumbos, N., y Alezones, J. 2017. Detección de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados Yaracuy y Guárico, Venezuela. *Nova Scientia*. 9(19):171-184. doi.org/10.21640/ns.v9i19.1035.
- Cisneros, L. Ma. E., Mendoza, O. L. E., Mora, A. G. 2007. Cold tolerant sorghum hybrids and parental lines. III: Quality of seeds harvested from plants infected with *Fusarium verticillioides* (sacc.) Nirenberg. Disponible en: Agrociencia. 41:405-415. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-31952007000400405&lng=es&nrm=iso&tlng=en.
- Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L., Lattanzio, V.M., and Albertini, E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*. 31(1):17-24. doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.002.
- Duncan, K. E., and Howard, R. J. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium*

- verticillioides*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 23(1): 6-16. doi.org/10.1094/mpmi-23-1-0006.
- Ferrigo, D., Raiola, A., Rasera, R., and Causin, R. 2014. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. Crop Protection. 65:51-56. doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.018.
- Ferrigo, D., Mondin, M., Edith, L., Fabio, F., Causin, R., and Raiola, A. 2020. Effect of seed biopriming with *Trichoderma harzianum* strain INAT11 on *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot diseases. Biological Control: 104286. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104286
- Gelderblom, W. C., Seier, J. V., Snijman, P. W., Van Schalkwyk, D. J., Shephard, G. S., and Marasas, W. F. 2001. Toxicity of culture material of *Fusarium verticillioides* strain MRC 826 to nonhuman primates. Environmental Health Perspectives. 109(2):267-276. doi.org/10.1289/ehp.01109s2267.
- Gómez, R. H., Zpata, G. A., Torres, Del A. E., y Tenorio, M. E. 2014. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Laboratorio de Entomopatógenos. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 37p. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargas/archivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>.
- He, A., Jianan, Sun, J., Wang, X., Zou, L., Fu, B., and Chen, J. 2019. Reprogrammed endophytic microbial community in maize stalk induced by *Trichoderma asperellum* biocontrol agent against *Fusarium* diseases and mycotoxin accumulation. Fungal Biology. 123:448-455. doi:10.1016/j.funbio.2019.03.003.
- Hernández-Melchor, D.J., Ferrera-Cerrato, R., y Alejandro, A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal Of Agricultural and Animal Sciences. 35(1):98-112. doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205.
- Ju, M., Zhou, Z., Mu, C., Zhang, X., Gao, J., Liang, Y., Chen, J., Wu, Y., Li, X., Wang, S., Wen, J., Yang, L., and Wu, J. 2017. Dissecting the genetic architecture of *Fusarium verticillioides* seed rot resistance in maize by combining QTL mapping and genome-wide association analysis. Scientific Reports. 7(1): 1-11. doi.org/10.1038/srep46446.
- Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA. Vol. 8. 388p.
- Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meekes, E., Haas, L. D., Van Der Plas, C. L., and Köhl, J. 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. Biocontrol Science and Technology, 15(3): 229-242. doi.org/10.1080/09583150400016852.
- Miller, S. S., Reid, L. M., and Harris, L. J. 2007. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. Canadian Journal of Botany. 85(4): 369-376. doi.org/10.1139/B07-027.
- Navaneetha, T., Prasad, R. D., and Venkateswara, R. L. 2015. Liquid formulation of *Trichoderma* species for management of gray mold in castor (*Ricinus communis* L.) and *Alternaria* leaf blight in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Journal of Biofertilizers and Biopesticides. 6(1):149. doi.org/10.4172/2155-6202.1000149.
- Nelson, P. E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia. 117:29-36.
- Nguyen, P.A., Strub, C., Durand, N., Alter, P., Fontana, A., and Schorr-Galindo, S. 2018. Biocontrol of *Fusarium verticillioides* using organic amendments and their actinomycete isolates. Biological Control. 118:55-56. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.12.006.
- Nicholson, T. P., Rudd, B. A. M., Dawson, M., Lazarus, C. M., Simpson, T. J. and Cox, R. X. 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. Chemistry and Biology. 8: 157-178. doi.org/10.1016/s1074-5521(00)90064-4.
- Shawki, K. F. M., Elsayed, A. B. B., Abido, W. A. E., and Shabana, Y. M. 2020. Using green chemicals and biological control agents for controlling the seed-borne pathogen *Fusarium moniliforme* in sugar beet. Journal of Plant Protection and Pathology. 11(2): 63-72. doi.org/10.21608/jppp.2020.78905.
- Singh, D. V., Mathur, S. B. and Neergaard, P. 1974. Seed health testing of maize. Evaluation of testing techniques with particular reference to *Drechslera maydis*. Seed Science Technology. 2:349-365. <https://seedhealth.org/mz7-1/>.

- Sobowale, A. A., Cardwell, K. F., Odebode, A. C., Bandyopadhyay, R., and Jonathan, S. G. 2007. Persistence of *Trichoderma* species within maize stem against *Fusarium verticillioides*. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 40(3):215-231. doi.org/10.1080/03235400500424596.
- Sobowale, A.A. 2019. Probable effects of dual inoculation of maize (*Zea mays*) stem with *Fusarium verticillioides* and certain *Trichoderma* species on fumonisin content of maize seeds. American Journal of Plant Sciences. 10:752-759. doi.org/10.4236/ajps.2019.105055.
- Tran, M. T., Ameye, M., Thi-Kim P. L., Devlieghere, F., De Saeger, S., Eeckhout, M., Audenaert, K. 2021. Post-harvest contamination of maize by *Fusarium verticillioides* and fumonisins linked to traditional harvest and post-harvest practices: A case study of small-holder farms in Vietnam. International Journal of Food Microbiology. 339. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109022.
- Wang, Y., Zhou, Z., Gao, J., Wu, Y., Xia, Z., Zhang, H., and Wu, J. 2016. The mechanisms of maize resistance to *Fusarium verticillioides* by comprehensive analysis of RNA-seq data. Frontiers in Plant Science. 7(1654):1-14. doi.org/10.3389/fpls.2016.01654