



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHIAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**



**CONTROL BIOLÓGICO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi)
Goid, AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE
LA SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.]**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA:

MARTA ALICIA FERNÁNDEZ GAMARRA



BAJO LA SUPEVSIÓN DE:

DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2016

La presente Tesis, titulada: **CONTROL BIOLÓGICO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.]**, fue realizada y presentada por la alumna Marta Alicia Fernández Gamarra bajo la dirección del comité asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: _____

Dr. Samuel Ramírez Alarcón

ASESOR: _____

Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR: _____

M.C. Lidia Quintana de Viedma

ASESOR: _____

M.C. Marco Maidana Ojeda

Chapingo, Edo. De México, Diciembre 2016

DATOS BIOGRÁFICOS

Marta Alicia Fernández Gamarra, es originaria de San Juan Bautista, Misiones, Paraguay. Nació el 31 de enero de 1988. Realizo sus estudios de nivel medio superior en Ingeniería Agropecuaria, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Universidad Nacional de Pilar, Paraguay durante los años 2006-2012 graduándose como Ingeniera Agropecuaria. Técnico en Administración de Establecimientos Agropecuarios, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Universidad Nacional de Pilar, Paraguay. Habilitación Pedagógica para egresados Universitarios. Egreso 2013. Instituto de Formación Docente. Paraguay. Profesorado en Educación Agraria. Egreso 2015. Universidad Internacional “Tres Fronteras”, Paraguay.

Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Egreso 2016. Universidad Autónoma Chapingo, México.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme la oportunidad de crecer tanto personal, profesional, científica y culturalmente.

A la Universidad Autónoma Chapingo, Maestría en Ciencias en protección Vegetal por abrirme las puertas hacia un futuro mejor y darme la oportunidad de ser parte de ella.

Al Dr. Samuel Ramírez Alarcón, Dr. Marcelo Acosta Ramos, M.C. Lidia Quintana de Viedma y M.C. Marco Maidana Ojeda, por su apoyo constante, consejos, enseñanzas y aportación en el desarrollo del trabajo de investigación.

A los profesores de esta casa de estudio, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo constante durante este tiempo.

A mis compañeros y amigos de la Generación 56, por demostrarme el verdadero significado de la amistad, por el apoyo, acompañamiento y los momentos compartidos que perduraran por siempre en mi memoria.

DEDICATORIAS

A Dios, por llenarme de bendiciones, por ser mi luz en los momentos de oscuridad, mi camino en momentos en que me sentía pérdida y mi fortaleza en aquellos momentos de debilidad.

A mi padre, que desde el cielo me guía para alcanzar mis sueños, por sus enseñanzas que me acompañaran hasta el final de mis días.

A mi madre, por estar conmigo en cada etapa de mi vida, por ser mi fuente de inspiración y mi fortaleza.

A mi segunda mamá (Ana), por llenarme de comprensión, consejos y cariño.

A mis hermanos, por su acompañamiento constante en esta gran aventura del aprendizaje.

A mis tías/os, por brindarme su apoyo incondicional durante estos 2 años de estudios.

A mis amigos, por todo el cariño y acompañamiento de siempre.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, AGENTE CAUSAL DE
LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.]

BIOLOGICAL CONTROL OF *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, CAUSAL AGENT OF
CHARCOAL ROT OF SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.]

Fernández-Gamarra, MA¹; Ramírez-Alarcón, S¹; Acosta-Ramos, M¹; Quintana-de Viedma, L²;
Maidana-Ojeda, M²; Fuentes-Aragón, D¹

¹Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo, ²Profesor-
Investigador Fitopatología, Universidad Nacional de Itapúa.

RESUMEN

La soya es un cultivo susceptible a un gran número de patógenos que causan graves daños a plántulas y raíces, la mayoría de las veces causados por un complejo de hongos, entre ellos *Macrophomina phaseolina*, un hongo habitante natural del suelo, presente en todas las zonas productoras del mundo, causante de la enfermedad conocida comúnmente como Pudrición carbonosa de la soya. El objetivo de este trabajo fue obtener e identificar cepas nativas de *Trichoderma* spp., para luego determinar su capacidad antagónica *in vitro* e *in vivo* ante aislados de *M. phaseolina*. En un primer ensayo se evaluó la tasa de crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. *in vitro* contra *M. phaseolina* mediante el método de cultivos duales, metabolitos volátiles y difusibles. Cuatro cepas de *Trichoderma*, *T. koningiopsis* (TB2 y CH1), *T. asperellum* (MS19 y MS15) de las catorce evaluadas mostraron mayor capacidad antagónica y fueron seleccionadas para un segundo ensayo. Semillas de soya tratadas con las cuatro cepas de *Trichoderma* (TB2, CH1, MS15 y MS19), 1 producto biológico comercial (*Trichoderma* spp.) y 1 producto químico (metil tiofanato + pyraclostrobin). Se sembraron en macetas con suelo inoculado con *M. phaseolina* y se evaluó el porcentaje de emergencia de las semillas a los 7, 14 y 21 DDI, incidencia de la enfermedad, longitud de tallo y raíz, peso seco y severidad a los 45 DDI. Los tratamientos de semilla con metil tiofanato + pyraclostrobin y *Trichoderma* spp. mostraron tener un efecto mayor sobre todas las variables evaluadas.

Palabras claves: *T. yunnanense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. erinaceum*, *Macrophomina phaseolina*

ABSTRACT

The soybean crop is susceptible to a large number of pathogens that cause serious damage to seedlings and roots, most often caused by a complex of fungi, including *Macrophomina phaseolina*, a fungus that is a natural inhabitant of the soil. This fungus is present in all producing areas of the world, which causes the disease commonly known as Charcoal rot of soybean. The aim of this work was to obtain and identify native strains of *Trichoderma* spp., then determine their antagonistic capacity *in vitro* and *in vivo* against isolates of *M. phaseolina*. In a first test the growth rate and antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. *in vitro* against *M. phaseolina* was evaluated by the dual culture method and volatile and diffusible metabolites. Four strains of *Trichoderma*, *T. koningiopsis* (TB2 and CH1) and *T. asperellum* (MS19 and MS15), of fourteen tested, showed increased antagonistic capacity and were selected for a second trial. Soybean seeds treated with the four strains of *Trichoderma* (TB2, CH1, MS15 and MS19), one commercial biological product (*Trichoderma* spp.) and one chemical product (methyl thiophanate + pyraclostrobin) were planted in pots with soil inoculated with *M. phaseolina*. The percentage of seed emergence at 7, 14 and 21 DAI, disease incidence, length of stem and root, dry weight and severity at 45 DAI was evaluated. The seed treatment with thiophanate methyl + Pyraclostrobin and *Trichoderma* spp. proved to have a greater effect on all variables.

Keywords: *T. yunnanense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. erinaceum*, *Macrophomina phaseolina*

ÍNDICE

Contenidos	Página (s)
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	
1.1. Importancia del cultivo de soya	1
1.2. Producción Mundial	2
1.3. Producción Nacional	3
1.4. Enfermedades de la soya: Tizón de plántulas o damping off	3
1.5. <i>Macrophomina phaseolina</i>	4
1.5.1. Clasificación taxonómica	4
1.5.2. Distribución e Importancia económica	5
1.5.3. Descripción morfológica	5
1.5.4. Desarrollo de la enfermedad	6
1.5.5. Sintomatología	7
1.6. Métodos de control de <i>M. phaseolina</i>	8
1.7. Control biológico de <i>M. phaseolina</i>	11
1.8. Mecanismo de control biológico (<i>Trichoderma</i> spp.)	14
1.8.1. Antibiosis	14
1.8.2. Competencia	15
1.8.3. Mico parasitismo	15
1.8.4. Inducción de resistencia sistémica	16
1.8.5. Colonización de la raíz de las plantas	17
1.9. LITERATURA CITADA	19
 CAPÍTULO II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid], AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA SOYA y CEPAS NATIVAS DE <i>Trichoderma</i> spp.	
Resumen	xii
1. INTRODUCCIÓN	33
2. OBJETIVOS	35

3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1.Obtención de <i>Macrophomina phaseolina</i>	36
3.1.1. Colecta del material vegetal	36
3.1.2. Aislamiento, Purificación y conservación	37
3.1.3. Identificación morfológica y molecular	38
3.1.3.1.Obtención de biomasa de <i>Macrophomina phaseolina</i>	38
3.1.3.2.Identificación morfológica	38
3.1.3.3.Extracción de DNA genómico	38
3.1.3.4.PCR y Secuenciación	39
3.2. Obtención de aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	39
3.2.1. Colecta de suelo	39
3.2.2. Aislamiento, Purificación y conservación	40
3.2.3. Identificación molecular	41
3.2.3.1.Obtención de biomasa de <i>Trichoderma</i> spp.	41
3.2.3.2.Extracción de DNA genómico	41
3.2.3.3.PCR y Secuenciación	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
4.1. Identificación morfológica y molecular de <i>M. phaseolina</i> .	42
4.1.1. Identificación morfológica	42
4.1.2. Identificación molecular	43
4.2. Identificación molecular de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	44
5. CONCLUSIONES	47
6. LITERATURA CITADA	48

**CAPÍTULO III. CAPACIDAD ANTAGÓNICA *in vitro* DE
DIFERENTES AISLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL
DE *Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goidanich, CAUSANTE DE LA
PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.]**

Resumen	xiv
1. INTRODUCCIÓN	54
2. OBJETIVOS	56

3. HIPÓTESIS	56
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1. Localización del área de estudio	57
4.2. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y de <i>M. phaseolina</i>	57
4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. phaseolina</i>	58
4.3.1. Caracterización de la tasa de crecimiento diario	58
4.3.2. Técnica de Cultivos duales	58
4.3.3. Efecto de metabolitos volátiles	59
4.3.4. Efecto de metabolitos difusibles	59
4.4. Análisis y diseño Experimental	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1. Evaluación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. phaseolina</i>	61
5.1.1. Caracterización de la tasa de crecimiento diario	61
5.1.2. Técnica de Cultivos duales	62
5.1.3. Efecto de Metabolitos volátiles	65
5.1.4. Efecto de Metabolitos difusibles	67
6. CONCLUSIONES	69
7. LITERATURA CITADA	70

CAPÍTULO IV. TRATAMIENTO DE SEMILLA CON AISLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE DAMPING OFF CAUSADA POR *Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goidanich, EN SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.]

Resumen	xvi
1. INTRODUCCIÓN	77
2. OBJETIVOS	79
3. HIPÓTESIS	79
4. MATERIALES Y MÉTODOS	80
4.1. Localización del área de estudio	80
4.2. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Macrophomina phaseolina</i>	80
4.3. Preparación de inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.	80

4.4. Preparación del inóculo de <i>M. phaseolina</i> en arroz	80
4.5. Tratamiento de semilla	81
4.6. Inoculación al suelo con el patógeno	81
4.7. Tratamiento y Diseño experimental	82
4.8. Análisis estadístico	83
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
5.1. Porcentaje de emergencia a partir de semillas de soya tratadas y sembradas en suelo inoculado con <i>M. phaseolina</i>	84
5.2. Efecto de los tratamientos sobre la incidencia, longitud de tallo y raíz, peso seco y severidad de la pudrición carbonosa de la soya.	86
6. CONCLUSIONES	92
7. LITERATURA CITADA	93

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CAPÍTULO I

Contenidos	Página
Cuadro 1. Superficie sembrada, producción y rendimiento de soya en los principales países productores del mundo.	2
Cuadro 2. Superficie sembrada, cosechada y siniestrada, producción y rendimiento de soya en los principales estados productores de México.	3

CAPÍTULO II

Contenidos	Página
Cuadro 1. Localidades muestreadas para el estudio de la distribución geográfica de los aislados de <i>M. phaseolina</i> y <i>Trichoderma</i> spp. en México.	36
Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de aislamientos de <i>M. phaseolina</i> .	43
Cuadro 3. Identificación molecular de las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	45
Figura 1. Parcela de soya con síntomas de la enfermedad.	36
Figura 2. Cultivos de <i>M. phaseolina</i>	37
Figura 3. Cultivo puro de <i>Trichoderma</i> spp. y conservación en tubos inclinados.	41
Figura 4. Crecimiento de <i>M. phaseolina</i> en medio de cultivo papa-dextrosa-agar.	42
Figura 5. Crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en cajas Petri con PDA identificadas molecularmente.	44

CAPÍTULO III

Contenidos	Página
Cuadro 1. Tasa de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo papa-dextrosa-agar.	61
Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>M. phaseolina</i> , por el efecto de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. proveniente de México en cultivo dual.	63
Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>M. phaseolina</i> , por el efecto de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. provenientes de Paraguay en cultivo dual.	63

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>M. phaseolina</i> , por el efecto de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. provenientes de México y Paraguay en cultivo dual, metabolitos volátiles y difusibles.	68
Figura 1. Tasa de crecimiento de los aislados de <i>M. phaseolina</i> en medio de cultivo papa-dextrosa-agar.	62
Figura 2. Potencial antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre los aislados <i>M. phaseolina</i> en cultivo dual.	64
Figura 3. Efecto de los metabolitos volátiles producido por las cepas de <i>Trichoderma</i> contra los aislados <i>M. phaseolina</i> mediante el método de las cajas superpuestas.	66
Figura 4. Efecto de los metabolitos difusibles producido por las cepas de <i>Trichoderma</i> contra los aislados <i>M. phaseolina</i> mediante el método del papel celofan.	67

CAPÍTULO IV

Contenidos	Página
Cuadro 1. Tratamientos utilizados para el control de los aislados <i>M. phaseolina</i> .	82
Cuadro 2. Efecto del tratamiento de semilla en el porcentaje de emergencia en suelo infestado con <i>M. phaseolina</i>	85
Cuadro 3. Efecto del tratamiento de semilla y sobre algunas variables de la enfermedad en el cultivo de soya bajo cámara de vegetación	90
Figura 1. Escala visual para evaluar la severidad en raíz y tallo de la pudrición carbonosa causada por <i>M. phaseolina</i> .	83
Figura 2. Efectividad del tratamiento de semilla para el control de <i>M. phaseolina</i> , agente causal de la pudrición carbonosa en el cultivo de soya	
Figura 3. Evaluación del grado de severidad de la pudrición carbonosa de la soya causada por <i>M. phaseolina</i> .	86 91

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Importancia del cultivo de soya

La soya [*Glycine max* (L.) Merr.], es considerada la oleaginosa de mayor importancia a nivel mundial por su gran cantidad de usos, derivado de su alto contenido de proteína y calidad de aceite. En promedio, el grano seco contiene 20% de aceite, 40% de proteína, 18% de grasa y 20% de carbohidratos (FAO, 2002; Ochoa *et al.*, 2011).

La soya evolucionó en los climas templados del norte de la República Popular de China, mientras que las variedades anteriores (no adaptada a los climas tropicales) han florecido prematuramente en las regiones tropicales de días cortos. Estas variedades se han cultivado sobre todo en las regiones templadas de China y de América del Norte y del Sur. La aceptación del cultivo por parte de los agricultores de la zona tropical está ahora muy extendida (EMBRAPA, 1995).

Es una especie con elevada capacidad de adaptación, se cultiva en casi todas las latitudes, encuentra sus mejores condiciones de crecimiento en los suelos de textura media, bien drenados, profundos, planos, con pH ligeramente ácido a neutro, ricos en fósforo, potasio y nutrientes menores, sin embargo, con un adecuado manejo es capaz de adaptarse a muy diversas condiciones de suelo y clima manteniendo un elevado potencial de rendimiento (Lattanzi, 1992; EMBRAPA, 1995).

La soya, consumida directa o indirectamente, juega un papel importante en la búsqueda continua para alimentar a la gente (Hartman y Herman, 2011).

La producción de este cultivo en el mundo ha experimentado uno de los crecimientos más fuertes y sostenidos de los últimos tiempos. Es utilizada como un alimento intermedio, como ración para animales, aceite para alimentación humana, otros usos en la industria alimenticia y más recientemente como biocombustible. Solamente el 2% de la proteína de soya es utilizada directamente para el consumo humano, en forma de poroto directamente, o en forma de productos alimenticios (tofu, las hamburguesas o la leche de soya). El 98% restante de soya se procesa y se producen aceites, harinas y

pellets, estos últimos utilizados en la formulación de alimentos balanceados para ganado vacuno, lechero, porcinos y avicultura (Adreani, 2008).

1.2. Producción Mundial

El cultivo representa aproximadamente el 6% de las tierras cultivable del mundo, sin embargo, se encuentra todavía por debajo del trigo, arroz y el maíz en el área de producción mundial (Hartman *et al*, 2011).

Durante el ciclo agrícola 2014/2015, la superficie sembrada a nivel mundial fue de 118.39 millones de hectárea, 319.72 millones de toneladas métricas de producción y un rendimiento 2.70 toneladas métricas por hectárea, sin embargo, para el año 2015/2016 se estima una superficie sembrada de 119.73 millones de hectárea, 312.36 millones de toneladas métricas de producción y un rendimiento de 2.61 toneladas métricas por hectárea, así mismo para el 2016/2017 se proyecta una superficie sembrada a nivel mundial de 122.77 millones de hectárea, 325.95 millones de toneladas métricas de producción y un rendimiento 2.66 toneladas métricas por hectárea. Los principales países productores de soya son Estados Unidos seguido por Brasil, Argentina, India, China, Paraguay y Canadá (Cuadra 1) (USDA, 2016).

Cuadro 1. Superficie sembrada, producción y rendimiento de soya en los principales países productores del mundo.

País	Sup. Sembrada (millones de hectáreas)		Producción (Millones de toneladas métricas)		Rendimiento (toneladas métricas por hectárea)	
	Prel. (2015/2016)	Proyec. (2016/2017)	Prel. (2015/2016)	Proyec. (2016/2017)	Prel. (2015/2016)	Proyec. (2016/2017)
Estados Unidos	33.11	33.60	106.93	105.60	3.23	3.14
Brasil	32.10	34.20	96.50	103.00	2.92	3.01
Argentina	19.40	19.45	56.50	57.00	2.91	2.93
India	11.40	12.00	7.00	11.70	0.61	0.98
China	6.44	6.80	11.60	12.20	1.80	1.79
Paraguay	3.40	3.46	8.80	9.00	2.59	2.60
Canadá	2.24	2.20	6.24	6.25	2.83	2.84

Fuente: USDA, 2016

Se espera que la producción futura de soya aumente más que otros cultivos, debido a la expansión del área de producción y los altos rendimientos (Hartman *et al*, 2011).

1.3. Producción Nacional

México es un país deficitario en la producción de cultivos de oleaginosas y es considerado el cuarto importador más importante de soya a nivel mundial, después de China, la Unión Europea y Japón (Garza *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 2011).

Durante el año agrícola 2015, incluyendo los ciclos agrícolas otoño – invierno y primavera – verano, modalidad riego + temporal, se registró una superficie sembrada de soya de 253.846,48 ha de las cuales fueron cosechadas 249.979,28 ha (siendo las siniestradas de 3.867,20 ha), con una producción de 341.088,19 Ton y un rendimiento de 1.36 Ton.ha⁻¹. Los estados con mayor superficie sembrada de soya son Tamaulipas, San Luis Potosí, Campeche, Veracruz y Chiapas (Cuadro 2) (SIAP, 2016).

Cuadro 2. Superficie sembrada, cosechada y siniestrada, producción y rendimiento de soya en los principales estados productores de México.

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Sup. Siniestrada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)
Tamaulipas	124.716,79	121.495,39	3.221,40	99.178,05	0.82
San Luis Potosí	37.971,00	37.971,00	0.00	62.256,96	1.64
Campeche	31.002,17	31.002,17	0.00	55.123,00	1.78
Sonora	25.159,00	25.159,00	0.00	64.178,60	2.55
Chiapas	13.323,00	13.323,00	0.00	23.461,06	1.76
Veracruz	10.056,00	10.056,00	0.00	18.074,40	1.80
Yucatán	4.960,00	4.910,00	50.00	9.769,40	1.99
Quintana Roo	3.604,50	3.576,50	28.00	5,238.00	1.46

Fuente: SIAP, 2016

1.4. Enfermedades de la soya: Tizón de plántulas o damping off

La soya [*Glycine max* (L) Merr.], es un cultivo susceptible a un gran número de patógenos que causan daños graves a plántulas y raíces (Vasebi *et al.*, 2013).

Esta enfermedad puede causar la reducción del stand de plantas. Existen costos económicos por la reducción del stand debido a la mano de obra adicional y materiales para la replantación. La correcta identificación del agente causal es esencial para lograr un control eficaz (ISU, 1997).

El tizón de plántulas es causada por un complejo de hongos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Pythium*, *Phytophthora sojae*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* (Kmetz *et al.*, 1978; Rizvi y Yang, 1996; Wegulo *et al.*, 1998; Singh y Thapliyal, 1999; Yang y Sanogo, 1999; Begum *et al.*, 2010).

Estos hongos pueden afectar en pre y pos emergencia. Las semillas infectadas antes o durante la germinación muestran una podredumbre húmeda o seca dependiendo del patógeno; aquellas que llegan a germinar, muestran raíces poco desarrolladas y decoloradas. Las plántulas afectadas que llegan a emerger muestran el hipocotíleo en forma de gancho amarronado, éste amarronamiento también puede verse en los cotiledones (INIA, 2013).

1.5. *Macrophomina phaseolina*

Este hongo es considerado un habitante natural del suelo (Gupta *et al.*, 2012). Es el agente causal de la enfermedad conocida comúnmente como Pudrición carbonosa de la soya [*Glycine max* (L.) Merr.] (Ma *et al.*, 2010), enfermedad de importancia económica, debido a que infecta a un gran número de especies de plantas pudiendo sobrevivir en el suelo como un saprófito durante un máximo de 15 años (Kaur *et al.*, 2012).

1.5.1. Clasificación taxonómica

Macrophomina es un género monotípico, compuesto por una sola especie *phaseolina* (Sutton, 1980; Jana *et al.*, 2003), es un ascomiceto anamórfico de la familia Botryosphaeriaceae (Crous *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2009). El nombre binominal de *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby fue propuesto por Ashby en 1927 (Ashby, 1927), sin embargo, Goidanich (1947) cambió el nombre binominal de *Macrophomina phaseoli* a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

Actualmente no se conoce la fase teleomorfa (sexual), lo que ha dificultado su taxonomía a través de los años (Crous *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2009).

Es un hongo imperfecto que presenta dos fases asexuales, una fase saprófita denominada *Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butler (Sinónimo de *S. bataticola* Taub) donde forma microesclerocios y micelio y la otra patogénica denominada *Macrophomina phaseolina* donde desarrolla microesclerocios, micelio y picnidios en los tejidos del huésped (Dhingra y Sinclair, 1972; Beas-Fernández *et al.*, 2006; Abdel-Kader *et al.*, 2010).

1.5.2. Distribución e Importancia económica

Macrophomina phaseolina es un patógeno que ataca a más de 500 especies de plantas en todo el mundo (Singh *et al.*, 1990; Su *et al.*, 2001) que incluyen cultivos de importancia económica tales como soya [*Glycine max* (L.) Merr.], el maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum* Moench), algodón (*Gossypium* L.), tabaco (*Nicotiana*) (Cloud y Rupe, 1991; Su *et al.*, 2001), girasol (*Helianthus annuus*) (Weems *et al.*, 2011; Mahmoud y Budak, 2011), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Leyva-Mir *et al.*, 2015), canola (*Brassica napus*) (Khangura y Abera, 2009).

El hongo tiene una amplia distribución geográfica, y se encuentra sobre todo en los países tropicales y subtropicales con climas árido a semiáridos de África, Asia, Europa y América del Norte y del Sur (Wrather *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Mahmoud y Budak, 2011; Kaur *et al.*, 2012; Abdel-Kader *et al.*, 2010).

La pérdida de rendimiento estimado en los 10 países (Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá, China, India, Indonesia, Italia, Paraguay y Estados Unidos) de mayor producción de soya durante el año 1994 fue de 1.234 millones de toneladas métricas (Wrather *et al.*, 1997). En los Estados Unidos durante el año 2003, 2004 y 2005 causo pérdidas de rendimiento significativas con una estimación de 1.98, 0.28 y 0.49 millones de toneladas (Wrather y Koenning, 2006). En el año 2006 ocupó el sexto lugar entre las enfermedades de mayor importancia económica para los ocho primeros países productores de soya (Wrather *et al.*, 2010).

1.5.3. Descripción morfológica

El color de las colonias de *M. phaseolina* en medio de cultivo varía de negro a marrón o gris y se vuelve de color oscuro con la edad. Micelio aéreo abundante con esclerocios incrustados dentro de las hifas o impregnados en el agar o en la superficie del agar. Las hifas son septadas, inicialmente hialinas cambiando luego a color miel o negro (Kaur *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2012).

Los microesclerocios se forman a partir de la agregación de hifas unidas mediante un pigmento de melanina con 50 a 200 células individuales, son de color negro, esféricos y su tamaño varía (50 - 175 µm de diámetro) con el hospedante y los medios utilizados (Short y Wyllie, 1978; Gaetán *et al.*, 2006; Weems *et al.*, 2011; Pavlovic *et al.*, 2015).

Las picnidiosporas de *Macrophomina* son elipsoidales a ovoide y puede llegar a medir de 20 - 24 x 7 - 9 µm (Gupta *et al.*, 2012), de 14 - 30 x 5 - 10 µm, hialinas, unicelulares, fiálides hialinas, corto, piriforme para cilíndrica y 5 - 13 x 4 - 6 µm de tamaño (Sharma, 2013), generalmente producen picnidios globosos o aplanados que van de 100 a 200 µm de diámetro, se encuentran incrustados inicialmente en el tejido del huésped, son de color oscuro a grisáceo, pero se convierten en negro y errumpentes con la madurez. Los picnidios son membranosos a subcarbonaceos con un fino y definido ostiolo truncado, solitario o gregario y conidióforos simples en forma de vara normalmente, de 10 - 15 µm de largo, teniendo conidios unicelulares con ostiolo central, circular y rodeado de células de paredes gruesas de color marrón oscuro (Kaur *et al.*, 2012).

1.5.4. Desarrollo de la enfermedad

M. phaseolina sobrevive como microesclerocios en el suelo y en los restos vegetales infectados (Short *et al.*, 1980), los microesclerocios actúan como fuente de inóculo primario y puede persistir en el suelo durante unos 15 años (Short *et al.*, 1980; Kendig *et al.*, 2000), también puede ser transmitido por semillas (Fakir *et al.*, 1976; Raut, 1983; Pratt *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2012). La germinación de microesclerocios ocurre con frecuencia en un rango de temperatura de 28 - 35 °C (Mihail, 1989).

Numerosos tubos germinales se forman, que dan lugar a apresorios en las paredes anticlinales de las células epidérmicas (Grupta *et al.*, 2012). Los apresorios penetran la

pared celular de la epidermis por acción mecánica, enzimática o a través de heridas y aberturas naturales (Mayek-Pérez *et al.*, 2002).

Las hifas crecen primero intercelularmente en la corteza y luego intracelularmente en el xilema colonizando el tejido vascular dando lugar a la formación de microesclerocios que bloquean los vasos (Mayek-Pérez *et al.*, 2002) provocando hojas marchitas, senescencia prematura y muerte de las plantas (Gaetán *et al.*, 2006).

Después de la muerte de la planta, la colonización por micelios y la formación de microesclerocios en el tejido del huésped continúa hasta que los tejidos se secan. Después de la decadencia de la raíz y restos vegetales, los microesclerocios se libera en el suelo y el ciclo continúa (Gupta *et al.*, 2012).

1.5.5. Sintomatología

Macrophomina phaseolina es un organismo habitante natural del suelo, capaz de infectar a la soya en cualquier etapa de crecimiento, pero por lo general, infecta después de la floración. El hongo es también transmitido por semillas en muchos cultivos como la soya (Gupta *et al.*, 2012).

Las plántulas pueden ser infectadas en años en que los suelos son excepcionalmente secos y la temperatura se encuentra por encima de los 35 °C durante 2 - 3 semanas. Después de la emergencia, los síntomas pueden ser visibles en cotiledones con manchas marrón oscuro. A veces, los márgenes de los cotiledones se vuelven marrón a negro en una etapa temprana. Desde la etapa de hojas unifoliadas en adelante, los síntomas aparecen en hipocotilos infectados de plántulas recién emergidas de circular a oblongas, de color marrón rojizo, las lesiones pueden ponerse oscuras, marrón a negro después de varios días. Estas lesiones pueden extenderse hasta el tallo. Las plántulas infectadas pueden morir si las condiciones secas persisten (Gupta *et al.*, 2012).

En plantas adultas los tejidos del tallo muestran el crecimiento de numerosos microesclerocios y picnidios (Abdel-Kader *et al.*, 2010), estas pueden marchitarse y morir prematuramente ocasionando el desprendimiento de los tejidos de la corteza inferior del tallo de coloración gris moteado (Smith y Carvil, 1997).

En plantas de girasol se observó lesiones gris plateado que rodea la parte inferior del tallo y muerte prematura (Weems *et al.*, 2011; Mahmoud y Budak, 2011; Zhang *et al.*, 2016), en caña de azúcar mostraron síntomas de pudrición en tallo y raíz, el tallo mostró una coloración marrón oscuro a negro, presencia de microesclerocios y picnidios se observan en la base, además de follaje clorótico y muerte prematura (Leyva-Mir *et al.*, 2015), en plantas descoloridas de soya, se presenta microesclerocios comúnmente en los tejidos epidérmicos y sub epidérmicos en el interior de la raíz principal y parte inferior del tallo de las plantas marchitas (Yang y Navi, 2005; Wrather *et al.*, 2008).

Normalmente, en plantas muy infectadas, las hojas muertas permanecen adjuntas al pecíolo durante varios días después de la muerte debido probablemente a la producción de toxinas como por ejemplo phaseolinone o botryodiplodin (Ramezani *et al.*, 2007; Wrather *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2012).

1.6. Métodos de control de *M. phaseolina*

Kumar *et al.*, (2005) manifestaron que los principales métodos de control se pueden agrupar en tres categorías: 1) control físico, 2) control químico y 3) control biológico. Otros método de control mencionados son las prácticas culturales y resistencia del huésped (Mengistu *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2012).

La población del patógeno en el suelo fue mayor en campos de soya bajo labranza cero que en cualquiera de los laboreos con discos o arados de vertedera (Wrather *et al.*, 1998). Por otra parte, Mengistu *et al.*, (2009) demostraron que el sistema de siembra directa tenía menos unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. phaseolina* en tejidos de la raíz y el tallo que la labranza convencional, lo que indica que el sistema de siembra directa puede proporcionar un entorno menos propicio para mantener la población de *M. phaseolina*.

Una reducción significativa en la incidencia de la marchitez, podredumbre seca de la raíz, las poblaciones de malezas y las mejoras en el rendimiento se registraron en parcelas solarizadas; pero solo no es eficaz requiere de la combinación de varios métodos de control como el riego de verano con la enmienda del suelo (Mihail y Alcorn, 1984; Lodha, 1995; Lodha *et al.*, 1997).

Ilyas *et al.*, (1976), evaluaron en condiciones de laboratorio el efecto de los fungicidas de suelo: benomil, metil tiofanato, tiram, tiabendazol, triforina y captan sobre la viabilidad de esclerocios de *Macrophomina phaseolina* en suelo y en trozos de tallos de soya. La reducción de la viabilidad fue mayor cuando se utilizaron los esclerocios libres, menor cuando esclerocios estaban en trozos de tallos frescos y el intermedio cuando esclerocios estaban en trozos de tallos parcialmente descompuesto. Fumigación de suelo con metil ditioicarbamato de sodio logro reducir las poblaciones de *Macrophomina phaseolina* sobre los residuos de soya y en las raíces de las plantas (Kittle y Gray, 1982). Suelo fumigado con metam sodio ($730 \text{ litros.ha}^{-1}$) causó la mortalidad del patógeno de 90 y 95 % en experimentos de campo, lo que indica que la fumigación puede ser un método de control eficaz de este patógeno en suelos infestados (Zveibil *et al.*, 2012).

Semillas tratadas con captafol y mancozeb fue eficaz en el control de la infección por la semilla (*Macrophomina phaseolina*) de la soya mejorando la emergencia de plántulas, la nodulación, rendimiento de grano y porcentaje de semillas sanas (Singh *et al.*, 1990). El tratamiento de semillas con metil tiofanato (1.0 g.kg^{-1} de semilla), carbendazim 50 %, mancozeb 75 % y jkstein (2.0 g.kg^{-1} semilla) fue eficaz en la eliminación del patógeno a partir de semillas infectadas de soya con *M. phaseolina* (Singh y Kumar, 2002). Aplicación de lactofen en la etapa de crecimiento R1 y azoxystrobin ya sea en la siembra, R3, R6 no tuvo un impacto significativo sobre la severidad de la pudrición carbonosa (Cross *et al.*, 2012). Shumaila y Khan (2016) llevaron a cabo un experimento para determinar el efecto del tratamiento de semillas con carbendazim, captan, tiram, mancozeb y carboxim + thiram contra la pudrición de la raíz del frijol mungo (*Vigna radiata*) causada por *Macrophomina phaseolina* en macetas, los resultados demostraron que todos los fungicidas redujeron la severidad de la enfermedad además de mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas infectadas en mayor o menor medida. Semillas de garbanzo C.V. JG-62 tratadas con carbendazim registró la mayor germinación de la semilla (90.0 %) menos incidencia de la enfermedad (14.0 %) y el máximo control de la enfermedad (86.0 %) en comparación con los demás tratamientos (Sayyad *et al.*, 2015).

Una alternativa a estos productos químicos es el uso de ciertos agentes de control biológico, que son ecológicos, económicos y no tienen efectos nocivos sobre la

población humana (Kumar *et al.*, 2005), se han realizados varios estudios para evaluar el potencial antagónico de *Trichoderma* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium meliloti*, *Bacillus subtilis*, entre otros, sobre *Macrophomina phaseolina* en varios cultivos (Arora *et al.*, 2001; Larralde-Corona *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010).

Una de las pocas opciones para controlar la enfermedad es mediante la rotación con cultivos no hospedantes de 2-3 años que pueden disminuir el inóculo del suelo por debajo del nivel de daño en campos severamente infectados (Ndiaye *et al.*, 2008). Kendig *et al.*, (2000) indicaron que el manejo del agua puede tener un efecto significativo sobre la colonización de las raíces por *M. phaseolina*, considerando que el stress hídrico influye en la colonización temprana, lo que puede ser mucho más importante.

Lodha *et al.*, (2002) en un estudio de campo realizado por dos años, observaron que los suelos enmendados con compost mijo perla (*Pennisetum glaucum*) y compost de residuos de la hoja de la coliflor (*Brassica oleracea*) redujeron significativamente la mortalidad de plantas debido a la pudrición seca de la raíz aumentando el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Dubey *et al.*, (2009) concluyeron que la aplicación de extracto de torta de neem y aceite de neem plantearon altos efectos fungí-tóxicos sobre el crecimiento radial *in vitro* y la supervivencia de los esclerocios de *M. phaseolina*.

Sin embargo, la utilización de todos estos métodos en forma aislada no podrá controlar la enfermedad, solo con la utilización combinada de ellas como: rotaciones de cultivo, fertilidad del suelo, densidad de siembra e irrigación (Gupta *et al.*, 2012).

Se han llevado a cabo varias intentos para identificar genotipos de soya resistente a la pudrición carbonosa llegando solo a unos pocos, con resistencia moderada o tolerantes en la fase de tallo y raíz, sin embargo, resistencia a la infección de semillas no ha sido descrita (Smith y Carvil, 1997; Mengistu *et al.*, 2011, Mengistu *et al.*, 2012), por otra parte, genotipos de soya con alto niveles de resistencia no ha sido identificado y/o no

están disponibles comercialmente (Mengistu *et al.*, 2007; Twizeyimana *et al.*, 2012; Radwan *et al.*, 2014).

Las plantas de soya cuando están infectadas por *M. phaseolina* y otros patógenos de semilla producen fitoalexina (gliceolin), uno de los compuestos que podrían restringir el desarrollo del hongo, dando así, resistencia a las plantas (Lygin *et al.*, 2010).

Identificación de marcadores moleculares ligada al gen de resistencia a la pudrición carbonosa facilitaría en gran medida la proyección de materiales de mejoramiento y por lo tanto acelerara el desarrollo de nuevos cultivares resistentes (Gupta *et al.*, 2012), sin embargo, en la actualidad genes específicos de resistencia no se han reportado en ninguno de sus hospedantes (Radwan *et al.*, 2014).

1.7. Control biológico de *M. phaseolina*

El control biológico ofrece una alternativa ecológica al uso de pesticidas para el control de enfermedades de las plantas (Emmert y Handelsman, 1999). Varios microorganismos tales como bacterias, hongos y actinomicetos han sido evaluados y reportados por diferentes grupos de investigadores como agentes de control biológico contra *M. phaseolina* (Kumar *et al.*, 2005).

Singh *et al.*, (2010) demostraron que *Pseudomonas aeruginosa* PN1 exhibió fuertes propiedades antagonistas frente a *M. phaseolina*, suprimiendo el crecimiento de la enfermedad y mejorando el crecimiento vegetal de las plantas de semillero de *Pinus roxburghii* demostrando el potencial del agente de biocontrol. Por otra parte, Ehteshamul-Haque *et al.*, (2007) en un trabajo realizado concluyeron que el tratamiento de semillas con *Pseudomonas aeruginosa* redujo la infección de *M. phaseolina* de 14 a 100 %, dependiendo de la cepa de bacteria y la variedad de soya utilizado. Por su parte, Gupta *et al.*, (2002) mencionaron que la inhibición del crecimiento en condiciones *in vitro* de *M. phaseolina* con *Pseudomonas aeruginosa* (GRC2) fue de 74 %, después de 5 días de incubación, además encontró que hubo un aumento en la germinación de semillas, el crecimiento temprano de las plántulas, el peso fresco de nódulos, el rendimiento de grano y la reducción de la enfermedad (99 %) por bacterización de semillas de maní.

Singh *et al.*, (2008) registraron un aumento de la biomasa y reducción de la enfermedad en plántulas de *Pinus roxburghii*, el tratamiento con BN1 resultó en un incremento en las raíces y pesos secos de brotes de 43.6 y 93.54 %, respectivamente, una viabilidad de semillas del 80 - 85 % en los tratamientos con *B. subtilis* BN1 solo o en presencia de *M. phaseolina*, en comparación con 54.5 % solo con *M. phaseolina*. Dawar *et al.*, (2010) mencionaron que el tratamiento de semilla y del suelo con especies de *Bacillus* *saber*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus* en plantas de caupí (*Vigna unguiculata*) y haba (*Vicia faba*) mostraron un aumento en la longitud y peso tanto del tallo como de la raíz; resultando ser un método eficaz para el control de hongos del suelo como *M. phaseolina*, *R. solani* y *Fusarium* spp.

En India, la bacterización de semillas o raíces de soya con *Rhizobium japonicum* redujo significativamente la enfermedad causada por *Macrophomina phaseolina*, debido a la acción fungi-tóxica de una sustancia identificado como rhizobitoxine (Chakraborty y Purkayastha, 1984). Además, Arora *et al.*, (2001) concluyeron que hubo una disminución considerable de la incidencia de la enfermedad en la germinación de la semilla, mejora la biomasa de las plántulas y el peso fresco de nódulos por bacterización de las semilla con las cepas *Sinorhizobium meliloti* (RMP₃ y RMP₅) en el cultivo de maní. Aumento de la germinación de las semillas en un 46.7 y 52.8 %, la biomasa de las plántulas en un 16.5 y 22 %, y el peso fresco de nódulos en un 36 y 56.6 %. En otro estudio, Deshwal *et al.*, (2003) demostraron el poder antagónico de cepas de *Bradyrhizobium*, así como sus propiedades como promotor de crecimiento de las plantas de maní. Las semillas recubiertas con cepas de *Bradyrhizobium* aumentaron la germinación de la semilla, mejoraron la biomasa de las plántulas, el número, peso fresco y peso medio de nódulos en comparación con los controles no inoculados y no infectados.

Ullah *et al.*, (2011) evaluaron el poder antagónico *in vitro* e *in vivo* de diversos hongos tales como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium capsulatum*, los cuales redujeron significativamente el crecimiento de la colonia de *M. phaseolina* y la incidencia de la enfermedad en 4 cultivares de girasol, siendo el más efectivo *A. flavus* También se informó por

Bhattacharyya *et al.*, (1985) que *A. versicolor* es capaz de reducir la incidencia de la enfermedad en un 56 % en yute (*Corchorus capsularis*).

Larralde-Corona *et al.*, (2008) evaluaron el potencial antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *Macrophomina phaseolina*, aislados de suelos cultivados con sorgo y frijol en el noreste de México. Los resultados mostraron que las cepas TCBG - 2 (*Trichoderma* sp.), TCBG - 3 (*T. atroviride*), TCBG - 8 (*T. koningiopsis*) y la cepa control IMI206040 (*T. harzianum*) inhibieron satisfactoriamente el crecimiento micelial de ambas cepas de *M. phaseolina* (< 50 %). Adekunle *et al.*, (2001) mencionaron que, el mayor porcentaje de emergencia de caupí se observó a los 21 días después de la siembra (DDS) con un 66 % para *T. koningii* y *T. harzianum*, y el 51 % para *Trichoderma* sp. Por otra parte, Gajera *et al.*, (2013) concluyeron que la máxima inhibición de crecimiento de *M. phaseolina in vitro* se observó con *T. koningi* (74.3 %) seguido de *T. harzianum* (61.4 %) a los 7 días después de la inoculación (DDI). Elad *et al.*, (1986) evaluaron cuatro cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai, los cuales inhibieron el crecimiento lineal y la producción de microesclerocios de *Macrophomina phaseolina* en condiciones *in vitro*. Aplicación a base de salvado de trigo de *T. harzianum* inoculado en invernadero redujo la incidencia de la enfermedad en un 37 - 74 %, el recubrimiento de semillas de melón con conidios *T. harzianum* reducen la incidencia de enfermedades en un 37.5 a 46.3 %. En el campo, la pudrición carbonosa de melón y maíz se redujo en un 22 y 28 %, respectivamente.

Maheshwari *et al.*, (2001) evaluaron el efecto de *T. virens* (*Gliocladium virens*) en *Macrophomina phaseolina* en condiciones *in vivo* e *in vitro*, observándose el mayor porcentaje de inhibición (70 %) en el crecimiento de colonias de *Macrophomina phaseolina* después de 24 horas debido a la producción de metabolitos volátiles, con respecto al tratamiento de semillas de maní con el antagonista, se observó un incremento en la germinación del 80 a 86 %, y una emergencia de plántulas de 60 - 68 % a los 7 DDS.

Tratamiento de semillas con *Trichoderma* y *Gliocladium* para el control biológico de *Macrophomina phaseolina* en sésamo también fueron evaluadas por Sankar y Jeyarajan, (1996).

Un estudio realizado por [Khan y Gupta, \(1998\)](#) se llevó a cabo para evaluar la eficacia por mico parasitismo de cinco especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. polysporum*) para el controlar de la pudrición seca de la raíz de la berenjena. El Crecimiento radial del patógeno en PDA fue suprimida en gran medida por las especies de *Trichoderma*.

Algunos otros hongos tales como *Cephalosporium* spp. y *Penicillium* spp. también se ha reportado por la inhibición *in vitro* de *M. phaseolina* ([Kumar et al., 2005](#)).

1.8. Mecanismo de control biológico (*Trichoderma* spp.)

Los hongos del género *Trichoderma* se han conocido aproximadamente desde el año 1920 por su capacidad para actuar como agente de control biológico contra patógenos de las plantas ([Harman, 2006](#)).

Son hongos filamentosos, de vida libre comunes en los ecosistemas de suelo y raíces, simbiontes de plantas, hongos oportunistas no virulentas, parásitos de otros hongos ([Harman et al., 2004](#)), comprende un gran número de cepas que actúan como agentes de control biológico, y sus propiedades antagonistas se basan en la activación de múltiples mecanismos de acción que incluyen la competencia, antibiosis, parasitismo e inducción de resistencia sistémica en las plantas ([Benítez et al., 2004](#); [Kumar et al., 2005](#); [Djonović et al., 2006](#)).

Este hongo se ha estudiado por muchos años por su capacidad como agente de control biológico en muchas patógenos como: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Rhizopus oryzae*, *Pythium* spp., entre otros ([Elad et al., 1980](#); [Chet y Baker, 1981](#); [Sivan et al., 1987](#); [Howell, 2002](#)).

1.8.1. Antibiosis

Los antibióticos se producen durante las interacciones que implican bajo peso molecular de compuestos difusibles o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* los cuales

inhiben el crecimiento de otros microorganismos. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátil y no volátil que impiden la colonización por microorganismos antagonizados (Benítez *et al.*, 2004).

Se han reportan diferentes especies del género *Trichoderma* para la inhibición de *M. phaseolina* los cuales producen diferentes tipos de metabolitos secundarios que pueden conducir a la inhibición del patógeno (Kumar *et al.*, 2005).

El efecto de los antibióticos volátiles producidos por *T. virens* fue evaluado por Maheshwari *et al.*, (2001) bajo condiciones *in vitro*, el cual fue capaz de inhibir el crecimiento de las colonias de *M. phaseolina*, sin embargo, el efecto inhibitor de los compuestos volátiles disminuyó con el aumento de la incubación observándose la máxima inhibición (70 %) en el crecimiento de colonias de *M. phaseolina* después de 24 horas.

M. phaseolina y *R. solani* (AG4) mostraron un mínimo porcentaje de inhibición del crecimiento por compuestos no volátil de *T. hamatum* (T614) y *Trichoderma* sp., respectivamente (Hajieghrari *et al.*, 2008).

1.8.2. Competencia

La competencia se produce entre los microorganismos cuando el espacio o nutrientes son limitantes. Un importante atributo de un agente exitoso de biocontrol es que debe tener la capacidad de permanecer en alta densidad poblacional en la superficie de la raíz, proporcionando protección completa (Kumar *et al.*, 2005).

Trichoderma es capaz de competir por la rizosfera, el cual consiste en la sustitución de hongos endógenos sobre la superficie de la raíz. Se ha reportado que raíz muy infestada con propágulos de *Macrophomina phaseolina* tratada con segmentos de *T. virens*; cuando éstos se colocan en medio de agar a temperatura ambiente, sólo *T. virens* crece de la raíz. Sin embargo, si estos mismos cultivos se incuban a 40 °C, una temperatura en la que *T. virens* no crecerá, el patógeno crece fácilmente de muchas partes del sistema radicular (Howell, 2003).

1.8.3. Mico parasitismo

El ataque directo de un hongo en otro, es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluyendo el reconocimiento, el ataque y la posterior penetración y muerte del huésped. Se cree que los hongos secretan exochitinases constitutivamente a niveles bajos. Cuando quitinasas degradan las paredes celulares de los hongos, liberan oligómeros que inducen exochitinases, y comienza el ataque (Benítez *et al.*, 2004).

Los estudios de mico parasitismo han demostrado que estos hongos producen una rica mezcla de enzimas anti fúngicas incluyendo, quitinasas y β - 1,3 glucanasas. Estas enzimas son sinérgicas entre sí, con otras enzimas anti fúngicas, y con otros materiales siendo beneficiosos para el control biológico (Harman, 2006).

Gajera *et al.*, (2012) mencionaron que *Trichoderma* spp. ataca directamente al patógeno de la planta mediante la secreción de enzimas líticas tales como quitinasas, β -1,3 glucanasas y proteasas. Actividades específicas de las cuatro enzimas de *Trichoderma* spp. se evaluaron usando la pared celular de *M. phaseolina* como sustrato en diferentes períodos de incubación (24 y 96 h). Todas las especies mostraron una variación significativa en las actividades de la quitinasa, β -1,3 - glucanasa y proteasa cuando se cultiva en la pared celular de *M. phaseolina* excepto celulosa. Observaron mico parasitismo de los antagonistas hasta los 14 DDI.

Trichoderma harzianum ALL42 fue capaz de sobre crecer y degradar los micelios de *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*, enrollándose alrededor de la hifas con la formación de apresorios y estructuras en forma de gancho. El antagonista puede producir CWDEs (enzimas que degradan la pared celular del patógeno) cuando se cultiva en las paredes celulares que contienen medio como la fuente de carbono. En este estudio, se utilizó un análisis secretoma para identificar algunas proteínas extracelulares secretadas por *T. harzianum* ALL42 después de crecer en la pared celular de *M. phaseolina*, *Fusarium* sp. y *R. solani*, mostrando una actividad intermedia para todas las enzimas (β - 1,3- glucanasa, quitinasa, carboxipeptidasa alcalina, β -glucosidasa, ácido fosfatasa y α -manosidasa) cuando crece en la CWMP (paredes celulares purificados de *M. phaseolina*) (Monteiro *et al.*, 2010).

1.8.4. Inducción de resistencia sistémica

Estudios recientes han sugerido que *Trichoderma* afecta el mecanismo de resistencia sistémica inducida (RSI) en las plantas (Shoresh *et al.*, 2005).

Sreedevi *et al.*, (2011) evaluaron el potencial de *T. harzianum* para inducir resistencia sistémica contra *Macrophomina phaseolina* en maní, el agente de biocontrol provocó un aumento en la producción de enzimas de defensa tales como la peroxidasa (PO) y polifenol oxidasa (PPO) y los compuestos de defensa como los fenoles totales y fenol orto – dihidrico en las diferentes etapas de infección. La actividad de peroxidasa y polifenol oxidasa aumento de 28.2 % y 95.5 % en las raíces en la fase 2 en comparación con las plantas no tratadas.

Tres agentes de control biológico tales como *Trichoderma harizianum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* fueron evaluados para determinar su eficacia en el control de la podredumbre de la raíz en cártamo (*Carthamus tinctorius*). Entre los bioagentes, *P. fluorescens* y *T. harzianum* (10 g.kg⁻¹) demostraron ser eficaz en el control de la enfermedad tanto en condiciones de laboratorio como de invernadero y de campo. Estos agentes de control biológico provocaron la producción de enzimas relacionadas con la defensa implicada en las vías fenil propanoide y fenoles. La mayor actividad de la peroxidasa, la fenilalanina amoníaco-lias, quitinasa, polifenol oxidasa y β -1,3-glucanasa se observó en plantas de cártamo tratadas con *P. fluorescens* y *T. harzianum* después de la inoculación con *M. phaseolina* (Govindappa *et al.*, 2010).

1.8.5. Colonización de la raíz de las plantas

La colonización de la raíz por *Trichoderma* implica la capacidad de adherirse y reconocer las raíces de las plantas, penetrar en la planta, y soportar metabolitos tóxicos producidos por las plantas en respuesta a la invasión por un organismo extraño, ya sea patógeno o no (Benítez *et al.*, 2004). Aumenta la frecuencia de crecimiento y desarrollo de tallos y raíces, la productividad de los cultivos, la resistencia al estrés abiótico y la absorción y utilización de nutrientes (Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004).

Algunos primeros trabajos demostraron que *Trichoderma* también promueve respuestas de crecimiento en algunos otros cultivos como frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), el rábano (*Raphanus sativus*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Sharma *et al.*, 2012), otros estudios han informado que *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* y *T. asperelloides* son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de las raíces que ayudan en la absorción de nutrientes y la defensa inmune de las plantas (Harman *et al.*, 2004).

1.9. LITERATURA CITADA

Abdel-Kader, MM; El-Mougy, NS; Aly, DEH; Lashin, SM. 2010. First Report of Ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina* on *Aeonium canariense* in Egypt. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 1, 101.

Adekunle, AT; Cardwell, KF; Florini, DA; Ikotun, T. 2001. Seed treatment with *Trichoderma* species for control of damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biocontrol Science and Technology*, 11(4), 449-457.

Adreani, P. 2008. Mercado del complejo soja y análisis de la competitividad de los países exportadores (en línea). Buenos Aires, Sociedad Rural Argentina (SRA), p.169. Consultado 19 julio 2016. Disponible en [http://www.fce.austral.edu.ar/aplic/webSIA/webSIA2004.nsf/6905fd7e3ce10eca03256e0b0056c5b9/6414831ab0f8030f032578b9005c1c50/\\$FILE/informe_final_competitividad_complejo_soja_Adreani.pdf](http://www.fce.austral.edu.ar/aplic/webSIA/webSIA2004.nsf/6905fd7e3ce10eca03256e0b0056c5b9/6414831ab0f8030f032578b9005c1c50/$FILE/informe_final_competitividad_complejo_soja_Adreani.pdf)

Arora, NK; Kang, SC; Maheshwari, DK. 2001. Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 81(6), 673-677.

Ashby, SF. 1927. *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) comb. nov. the pycnidial stage of *Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butl. *Transactions of the British Mycological Society*, 12(2), 141-147.

Bhattacharyya, D; Basu, S; Chattopadhyay, JP; Bose, SK. 1985. Biocontrol of *Macrophomina* root-rot disease of jute by an antagonistic organism, *Aspergillus versicolor*. *Plant and soil*, 87(3), 435-438.

Beas-Fernández, R; De Santiago-De Santiago, A; Hernandez-Delgado, S; Mayek-Perez, N. 2006. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 53-60.

Begum, MM; Sariah, M; Puteh, AB; Abidin, MZ; Rahman, MA; Siddiqui, Y. 2010. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. *Biological Control*, 53(1), 18-23.

Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

Chakraborty, U; Purkayastha, RP. 1984. Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Canadian journal of microbiology*, 30(3), 285-289.

Chet, H; Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 71(3), 286-290.

Cloud, GL; Rupe, JC. 1991. Morphological instability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. *Phytopathology*, 81(8), 892-895.

Cross, C; Wrather, A; Fothergill, K; Shannon, G; Li, S; Shumway, C; Rupe, J. 2012. Effect of lactofen, azoxystrobin, and genotypes on charcoal rot, *Phomopsis* seed decay, and pod and stem blight in soybean. *Plant Disease*, 96(8), 1154-1158.

Crous, PW; Slippers, B; Wingfield, MJ; Rheeder, J; Marasas, WF; Philips, AJ; Groenewald, JZ. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235-253.

Dawar, S; Wahab, S; Tariq, M; Zaki, MJ. 2010. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants. *Archives of Phytopathology and plant protection*, 43(4), 412-418.

Deshwal, VK; Dubey, RC; Maheshwari, DK. 2003. Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis* sp.) with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Current science*, 84(3), 443-448.

Dhingra, OD; Sinclair, JB. 1972. Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from the same soybean plant. *Phytopathology*, 62, 1108-1115.

Djonovic, S; Pozo, MJ; Kenerley, CM. 2006. Tvbg3, a β -1, 6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7661-7670.

Dubey, RC; Kumar, H; Pandey, RR. 2009. Fungitoxic effect of neem extracts on growth and sclerotial survival of *Macrophomina phaseolina* *in vitro*. *Journal of American Science*, 5(5), 17-24.

Elad, Y; Chet, I; Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70(2), 119-121.

Elad, Y; Zvieli, Y; Chet, I. 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. *Crop protection*, 5(4), 288-292.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria, Centro Nacional de Investigación sobre la Soja). 1995. El cultivo de la soja en los trópicos: mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal, 27, 241 p.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2003. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003. Sistema de Produção, 1. Versão eletrônica. Consulted 20 feber 2016. Available em <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/importancia.htm>

Emmert, EA; Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.

Ehteshamul-Haque, S; Sultana, V; Ara, J; Athar, M. 2007. Cultivar response against root-infecting fungi and efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* in controlling soybean root rot. *Plant Biosystems*, 141(1), 51-55.

Fakir, GA; Rao, MH; Thirumalachar, MJ. 1976. Seed transmission of *Macrophomina phaseolina* [charcoal rot] in sunflower [Fungal diseases]. *Plant Disease Reporter*, 0032-0811.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Nutrición humana en el mundo en desarrollo - Legumbres, nueces y semillas oleaginosas. Consultado 20 febrero 2016. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0v.htm#bm31>

Gaetán, SA; Fernández, L; Madia, M. 2006. Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on canola in Argentina. *Plant Disease*, 90(4), 524-524.

Gajera, HP; Bambharolia, RP; Patel, SV; Khatrani, TJ; Goalkiya, BA. 2012. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3(149), 2.

Garza, UE; Céspedes, TE; Aguirre, AE; González, JA; Del Ángel, SR. 2001. Guía para cultivar soya en la Planicie Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Ébano. Folleto para productores Núm. 3. San Luís Potosí, México, 23 p.

Goidanich, G. 1947. A revision of the genus *Macrophomina* Petrak. Type species: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Macrophomina phaseolina* (Mauubl.) Ashby. *Ann. Sper. Agr. (NS)*, 3, 449-461.

Govindappa, M; Lokesh, S; Rai, VR; Naik, VR; Raju, SG. 2010. Induction of systemic resistance and management of safflower *Macrophomina phaseolina* root-rot disease by biocontrol agents. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(1), 26-40.

Gupta, C; Dubey, R; Maheshwari, D. 2002. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 399-405.

Gupta, GK; Sharma, SK; Ramteke, R. 2012. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of phytopathology*, 160(4), 167-180.

Hajieghrari, B; Torabi-Giglou, M; Mohammadi, MR; 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, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Harman, GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.

Hartman, GL; West, ED; Herman, TK. 2011. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5-17.

Howell, CR. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 92(2), 177-180.

Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Ilyas, MB; Ellis, MA; Sinclair, JB. 1976. Effect of soil fungicides on *Macrophomina phaseolina* sclerotium viability in soil and in soybean stem pieces. *Phytopathology*, 66(3), 355-359.

INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria). 2013. Manual de identificación de enfermedades de la soja (en línea). Boletín de divulgación N° 104. Salto-Uruguay.

ISU (Iowa State University). 1997. Soybean Damping off (Online). Ames, Iowa. Consulted March 15, 2016. Available in <https://store.extension.iastate.edu/Product/pm936-pdf>

ISU (Iowa State University). 2010. Soybean Diseases (Online). Ames, Iowa. Consulted March 15, 2016. Available in <http://www.extension.iastate.edu/sites/www.extension.iastate.edu/files/davis/CSI4.pdf>

Jana, T; Sharma, TR; Prasad, RD; Arora, DK. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological research*, 158(3), 249-257.

Kaur, S; Dhillon, GS; Brar, SK; Vallad, GE; Chand, R; Chauhan, VB. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical reviews in microbiology*, 38(2), 136-151.

Kendig, SR; Rupe, JC; Scott, HD. 2000. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plant Disease*, 84(8), 895-900.

Khangura, R; Aberra, M. 2009. First report of charcoal rot on canola caused by *Macrophomina phaseolina* in Western Australia. *Plant Disease*, 93(6), 666-666.

Khan, MR; Gupta, J. 1998. Antagonistic efficacy of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina* on eggplant/Antagonistische Wirksamkeit von *Trichoderma*-Arten gegen *Macrophomina phaseolina* an Auberginen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection*, 105 (4), 387-393.

Kittle, DR; Gray, LE. 1982. Response of soybeans and soybean pathogens to soil fumigation and foliar fungicide sprays. *Plant disease*, 66(3), 213-215.

Kmetz, KT; Schmitthenner, AF; Ellett, CW. 1978. Soybean seed decay: prevalence of infection and symptom expression caused by *Phomopsis* sp., *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, and *D. phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*, 68(6), 836-841.

Kumar, B; Dubey, RC; Maheshwari, DK. 2005. Biocontrol of *Macrophomina phaseolina*: prospects and constraints. Microbial diversity: current perspectives and potential applications. *IK International Pvt Ltd, New Delhi*, 471-492.

Lattanzi, AR. 1992. Manejo de suelos para el cultivo de soja: Producción de soja (Vol. 34, Pág 25-30). Bib. Orton IICA/CATIE.

Larralde-Corona, CP; Santiago-Mena, MR; Sifuentes-Rincón, AM; Rodríguez-Luna, IC; Rodríguez-Perez, MA; Shirai, K; Narvaez-Zapata, JA. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 167-177.

Leyva-Mir, SG; Velázquez-Martinez, GC; Tlapal-Bolaños, B; Alvarado-Gómez, OG; Tovar-Pedraza, JM; Hernandez-Arenas, M. 2015. First report of charcoal rot of sugarcane caused by *Macrophomina phaseolina* in Mexico. *Plant Disease*, 99(4), 553.

Lygin, AV; Hill, CB; Zernova, OV; Crull, L; Widholm, JM; Hartman, GL; Lozovaya, VV. 2010. Response of soybean pathogens to glyceollin. *Phytopathology*, 100(9), 897-903.

Lodha, S. 1995. Soil solarization, summer irrigation and amendments for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* and *Macrophomina phaseolina* in arid soils. *Crop protection*, 14(3), 215-219.

Lodha, S; Sharma, SK; Aggarwal, RK. 1997. Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Pathology*, 46(2), 186-190.

Lodha, S; Sharma, SK; Aggarwal, RK. 2002. Inactivation of *Macrophomina phaseolina* propagules during composting and effect of composts on dry root rot severity and on seed yield of clusterbean. *European Journal of Plant Pathology*, 108(3), 253-261.

Ma, J; Hill, CB; Hartman, GL. 2010. Production of *Macrophomina phaseolina* conidia by multiple soybean isolates in culture. *Plant disease*, 94(9), 1088-1092.

Maheshwari, DR; Dubey, RC; Sharma, VK. 2001. Biocontrol Effects of *Trichoderma virens* on *Macrophomina phaseolina* Causing Charcoal Rot of Peanut. *Indian Journal of Microbiology*, 41(4), 251-256.

Mahmoud, A; Budak, H. 2011. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in sunflower in Turkey. *Plant Disease*, 95(2), 223-223.

Mayek-Pérez, N; García-Espinosa, R; López-Castañeda, C; Acosta-Gallegos, JA; Simpson, J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(4), 185-195.

Mengistu, A; Ray, JD; Smith, JR; Paris, RL. 2007. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science*, 47(6), 2453-2461.

Mengistu, A; Reddy, KN; Zablotowicz, RM; Wrather, AJ. 2009. Propagule densities of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissue and soil as affected by tillage, cover crop, and herbicide (Online). *Plant Health Progress*, doi: 10.

Mengistu, A; Arelli, PA; Bond, JP; Shannon, GJ; Wrather, AJ; Rupe, JB; Pantalone, VR. 2011. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot (Online). *Plant Health Progress*, doi: 10.

Mengistu, A; Arelli, PA; Bellaloui, N; Bond, JP; Shannon, GJ; Wrather, AJ; Rupe, JC; Chen, P; Little, CR; Canaday, CH; Newman, MA; Pantalone, VR. 2012. Evaluation of soybean genotypes for resistance to three seed-borne diseases (Online). *Plant Health Progress*, doi: 10.

Mihail, JD; Alcorn, SM. 1984. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease*, 68(2), 156-159.

Mihail, JD. 1989. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. *Phytopathology*, 79(8), 848-855.

Monteiro, VN; Do Nascimento Silva, R; Steindorff, AS; Costa, FT; Noronha, EF; Ricart, CAO; Ulhoa, CJ. 2010. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current microbiology*, 61(4), 298-305.

Ndiaye, M; Termorshuizen, AJ; Van Bruggen, AH. 2008. Effect of rotation of cowpea (*Vigna unguiculata*) with fonio (*Digitaria exilis*) and millet (*Pennisetum glaucum*) on *Macrophomina phaseolina* densities and cowpea yield. *African Journal of Agricultural Research*, 3(1), 037-043.

Ochoa, XM; Cantúa, JA; Montoya, L; Aguilera, NA. 2011. Guía para producir soya en el sur de Sonora. CENEB-CIRNO-INIFAP. Campo Experimental Norman Borlaug. Folleto para Productores Núm. 41. Cd. Obregón, Sonora, México. 32 p.

Pavlovic, S; Ristic, D; Aleksic, G; Milosevic, D; Stevic, T; Starovic, M. 2015. The First Report of *Macrophomina phaseolina* of Immortelle (*Helichrysum italicum*) in Serbia. *Plant Disease*, 99(9), 1279.

Pratt, RG; McLaughlin, MR; Pederson, GA; Rowe, DE. 1998. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* to mature plant tissues of alfalfa and white clover. *Plant Disease*, 82(9), 1033-1038.

Radwan, O; Rouhana, LV; Hartman, GL; Korban, SS. 2014. Genetic mechanisms of host-pathogen interactions for charcoal rot in soybean. *Plant molecular biology reporter*, 32(3), 617-629.

Ramezani, M; Shier, WT; Abbas, HK; Tonos, JL; Baird, RE; Sciumbato, GL. 2007. Soybean charcoal rot disease fungus *Macrophomina phaseolina* in Mississippi produces

the phytotoxin (-)-botryodiplodin but no detectable phaseolinone. *Journal of natural products*, 70(1), 128-129.

Raut, JG. 1983. Transmission of seed-borne *Macrophomina phaseolina* in sunflower. *Seed Science and Technology*, 11, 807–814.

Rizvi, SSA; Yang, XB. 1996. Fungi associated with soybean seedling disease in Iowa. *Plant Disease*, 80(1), 57-60.

Sankar, P; Jeyarajan, R. 1996. Seed treatment formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* for biological control of *Macrophomina phaseolina* in sesamum. *Indian phytopathology*, 49(2), 148-151.

Sayyad, SI; Mogle, TR; Sonkamble, MM. 2015. Effect of fungicides, bio-agents and organic amendments against *Macrophomina phaseolina* in Chick pea. *Annals of Plant Protection Sciences*, 23(2), 355-357.

Sharma, P; Patel, AN; Saini, MK; Deep, S. 2012. Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal of Agricultural Science*, 4(8), 65.

Sharma, PD. 2013. Plant Pathology (Online). *Rastogi Publications*, 468 pag.

Shoresh, M; Yedidia, I; Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95(1), 76-84.

Short, GE; Wyllie, TD. 1978. Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 68(5), 742-746.

Short, GE; Wyllie, TD; Bristow, PR. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology*, 70(1), 13-17.

Shumaila, S; Khan, MR. 2016. Management of root-rot of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* through seed treatment with fungicides. *Indian Phytopathology*, 69(2), 128-136.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Producción Agrícola. Ciclo: Año Agrícola (OI+PV) 2015. Modalidad: Riego + Temporal (en línea). Consultado 19 Jul 2016. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

Singh, SK; Nene, YL; Reddy, MV. 1990. Influence of cropping systems on *Macrophomina phaseolina* populations in soil. *Plant Disease*, 74(10), 812-814.

Singh, SN; Srivastava, SK; Bhargava, PK; Khare, MN. 1990. Chemical control of seedling mortality in cv. JS 72-44 and bacterial pustule in cv. Punjab-1 of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Legume research*, 13(1), 17-20.

Singh, U; Thapliyal, PN. 1999. Fungi responsible for seedling emergence problem indifferent soybean cultivars in Tarai region. *Indian Phytopathology*, 52(1), 79-81.

Singh, J; Kumar, K. 2002. Location, Survival, Transmission and Control of Seedborne, *Macrophomina phaseolina* Causing Dry Root Rot and Leaf Blight in Urdbean. *Annals of Plant Protection Sciences*, 10(1), 111-113.

Singh, N; Pandey, P; Dubey, RC; Maheshwari, DK. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679.

Singh, N; Kumar, S; Bajpai, VK; Dubey, RC; Maheshwari, DK; Kang, SC. 2010. Biological control of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* PN1 and its plant growth promotory activity in chir-pine. *Crop Protection*, 29(10), 1142-1147.

Sivan, A; Ucko, O; Chet, I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*, 71(7), 587-592.

Smith, GS; Carvil, ON. 1997. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 81(4), 363-368.

Sreedevi, B; Devi, MC; Saigopal, DVR. 2011. Induction of defense enzymes in *Trichoderma harzianum* treated groundnut plants against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Biological Control*, 25(1), 33-39.

Srinivasan, AL; Wickes, BL; Romanelli, AM; Debelenko, L; Rubnitz, JE; Sutton, DA; Thompson, EH; Fothergill, AW; Rinaldi, MG; Hayden, RT; Shenep, JL. 2009. Cutaneous infection caused by *Macrophomina phaseolina* in a child with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical microbiology*, 47(6):1969-1972.

Su, G; Suh, SO; Schneider, RW; Russin, JS. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91:120-126.

Sutton, B. 1980. The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. *Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK*, p. 696.

Todd, TC; Pearson, CAS; Schwenk, FW. 1987. Effect of *Heterodera glycines* on charcoal rot severity in soybean cultivars resistant and susceptible to soybean cyst nematode. *Journal of nematology*, 19(1), 35-40.

Twizeyimana, M; Hill, CB; Pawlowski, M; Paul, C; Hartman, GL. 2012. A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 96(8), 1210-1215.

Ullah, MH; Khan, MA; Sahi, ST; Habib, A. 2011. Evaluation of antagonistic fungi against charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5(8), 616-621.

USDA (United States Department of Agriculture). 2016. World Agricultural Production (Online). Consulted July 19, 2016. Available in <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>

Vasebi, Y; Safaie, N; Alizadeh, A. 2013. Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists *in vitro* and greenhouse condition. *Journal of Crop Protection*, 2(2), 139-150.

Weems, JD; Ebelhar, SA; Chapara, V; Pedersen, DK; Zhang, GR; Bradley, CA. 2011. First Report of Charcoal Rot Caused by *Macrophomina phaseolina* on Sunflower in Illinois. *Plant Disease*, 95(10), 1318-1318.

Wegulo, SN; Yang, XB; Martinson, CA. 1998. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. *Plant Disease*, 82(11), 1264-1270.

Wrather, JA; Anderson, TR; Arsyad, DM; Gai, J; Ploper, LD; Porta-Puglia, A; Yorinori, JT. 1997. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Disease*, 81(1), 107-110.

Wrather, JA; Kendig, SR; Tyler, DD. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. *Plant Disease*, 82(2), 247-250.

Wrather, JA; Koenning, SR. 2006. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of nematology*, 38(2), 173.

Wrather, JA; Shannon, JG; Carter, TE; Bond, JP; Rupe, JC; Almeida, AMR. 2008. Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina* (Online). *Plant Health Progress*, doi: 10.

Wrather, A; Shannon, G; Balardin, R; Carregal, L; Escobar, R; Gupta, GK; Ma, Z; Morel, W; Ploper, D; Tenuta, A. 2010. Diseases effects on soybean yields in the top eight soybean-producing countries in 2006 (Online). *Plant Health Progress*, doi: 10.

Yang, XB; Sanogo, S. 1999. Seedling damping-off by *Phomopsis/Diaporthe*. *Integrated Crop Management News*. Paper 2162.

Yang, XB; Navi, SS. 2005. First report of charcoal rot epidemics caused by *Macrophomina phaseolina* in soybean in Iowa. *Plant Disease*, 89(5), 526-526.

Zhang, JQ; Zhu, ZD; Duan, CX; Wang, XM; Li, HJ. 2011. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on mungbean in China. *Plant Disease*, 95(7), 872-872.

Zhang, YY; Yu, Y; Wang, K; Li, M; Xu, DS; Zhao, J. 2016. First Report of Sunflower Charcoal Rot Caused by *Macrophomina phaseolina* in Jilin and Inner Mongolia, China. *Plant Disease*, 100(7), 1494.

Zveibil, A; Mor, N; Gnayem, N; Freeman, S. 2012. Survival, host-pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. *Plant Disease*, 96(2), 265-272.

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA SOYA y CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp.

Fernández-Gamarra, MA¹; Ramírez-Alarcón, S¹; Acosta-Ramos, M¹; Quintana-de Viedma, L²; Maidana-Ojeda, M²; Fuentes-Aragón, D¹

¹Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo,

²Profesor-Investigador Fitopatología, Universidad Nacional de Itapúa.

Resumen

La soya [*Glycine max* (L.) Merr.] es un cultivo susceptible a un gran número de patógenos que causan graves daños a plántulas y raíces, la mayoría de las veces causados por un complejo de hongos, entre ellos *Macrophomina phaseolina*, agente causal de la pudrición carbonosa de la soya, presente en todas las zonas productoras del mundo. De muestras de raíces y tallos de soya con síntomas de la enfermedad provenientes de San Luís Potosí, Chiapas y Campeche, México y de Choré, Paraguay; se obtuvieron aislados monoesclerociales del hongo, los cuales se sembraron en PDA para su identificación morfológica y molecular. Nueve cepas de *Trichoderma* spp. se identificaron a nivel especie por técnicas moleculares a partir de la amplificación de la región ITS del DNA ribosomal con los primers ITS5-ITS4. Morfológicamente aislados de *M. phaseolina* desarrollaron colonias con micelio denso, de color gris a negro, microesclerocios esféricos e irregulares, negros formados por agregación de hifas hialinas a negras y septadas, los cuales fueron confirmados molecularmente mediante el análisis de sus secuencias por BLASTn con una identidad del 100 %. Con base en el análisis molecular, seis cepas de *Trichoderma* (MS9, MS10, MS12, MS15, MS16 y MS19) se identificaron con la especie *T. asperellum*, una cepa (TT) con *T. harzianum*, otra (TS) con *T. yunnanense* y la restante (MS28) con *T. erinaceum*, todas con una identidad del 100 % (GenBank).

Palabras claves: *Macrophomina phaseolina*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. yunnanense*, *T. erinaceum*, *Glycine max*, Identificación molecular

I. INTRODUCCIÓN

La rizosfera es un punto caliente de las interacciones microbianas como los exudados liberado por las raíces de las plantas son una fuente de alimento para los microorganismos y una fuerza motriz de su densidad y actividad poblacional, y puede albergar a muchos organismos que tienen un efecto neutro sobre la plantas, y también atrae a los organismos que ejercen efectos nocivos o beneficiosos sobre la planta (Raaijmakers *et al.*, 2009).

La podredumbre carbonosa [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid] de la soya [*Glycine max* (L.) Merr.], es una enfermedad de importancia económica en todo el mundo (Mengistu *et al.*, 2007), es un organismo habitante natural del suelo capaz de infectar la soya en cualquier etapa de crecimiento del cultivo (Gupta *et al.*, 2012), produce microesclerocios de color negro (fuente de inóculo principal) o picnidios (Purkayastha *et al.*, 2006).

Varias cepas del género *Trichoderma* se han reportado por ser eficaz en el control de enfermedades de las plantas (Szekeres *et al.*, 2004), son hongos de vida libre comunes en los ecosistemas de suelo y raíces. Descubrimientos recientes demuestran que son simbiontes de plantas, oportunistas no virulentas, así como que son parásitos de otros hongos (Harman *et al.*, 2004).

Muchos estudios se han destinado para caracterizar especies de *Trichoderma* sobre la base de su actividad anti fúngica (Haran *et al.*, 1996; Küçük y Kivanç, 2003), fisiológicas y morfológicas (Castle *et al.*, 1998), bioquímicas (Grondona *et al.*, 1997; Küçük y Kivanç, 2003) o características moleculares (Castle *et al.*, 1998; Hermosa *et al.*, 2000).

Por otra parte, para la identificación de los aislamientos de *M. phaseolina* generalmente se basa en criterios morfológicos, variabilidad patogénica entre los aislamientos, sensibilidad al clorato y características moleculares (Pearson *et al.*, 1987; Cloud y Rupe, 1991; Mayék-Pérez, 2001; Jana *et al.*, 2003).

La mayoría de los estudios se basan en la caracterización morfológica, que permite una fácil identificación a nivel de género, pero llegar a nivel de especie es difícil de determinar, en especial para los aislamientos de interés como son los agentes de control biológico (Grondona *et al.*, 1997).

Babu *et al.*, (2007) y Srinivasan *et al.*, (2009), por su parte, mencionaron que la presencia de esclerocios, la falta de formación de conidios en los cultivos aislados y la identificación por características morfológicas y/o fisiológicas es imposible debido a la amplia variación en el fenotipo de los aislados, por lo que resalta la importancia de los métodos moleculares en la identificación de patógenos fúngicos.

Los métodos moleculares implican el uso de PCR, los cuales se han descrito para diagnosticar, identificar, caracterizar y resolver la diversidad genética entre diferentes aislados de *M. phaseolina* y *Trichoderma* spp. siendo altamente sensibles y específicos (Almeida *et al.*, 2003; Jana *et al.*, 2003; Hermosa *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2012; Mahdizadeh *et al.*, 2011). Datos de secuenciación obtenidos particularmente en la región del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal, son utilizados en los análisis filogenéticos de hongos, utilizando cebadores específicos con el objeto de detectar a nivel de especie varios géneros fúngicos (Ospina-Giraldo *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Babu *et al.*, 2007; Cummings y Bergstrom, 2013).

El diagnóstico temprano y la detección precisa de patógenos es un paso esencial en el manejo de enfermedades de las plantas (Kaur *et al.*, 2012).

II. OBJETIVOS

- Obtener aislados de *Macrophomina phaseolina* de plantas de soya que presenten síntomas de pudrición carbonosa.
- Aislar cepas nativas de *Trichoderma* de suelos cultivados con soya.
- Identificar morfológica y molecularmente las cepas aisladas de *Macrophomina phaseolina* y de *Trichoderma* spp.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de *Macrophomina phaseolina*

3.1.1. Colecta del material vegetal

Para la obtención de aislados de *M. phaseolina* se consideró como puntos de referencia a los tres Estados de México con mayor superficie sembrada del cultivo de soya (Cuadro 1); dentro de cada Estado se tomaron muestras de 5 parcelas productivas, dando un total de 150 muestras (10 plantas por parcela productiva). La colecta se realizó durante los meses de septiembre a octubre del año 2015 y consistió en recolectar plantas con los síntomas característicos de la pudrición carbonosa (Figura 1). Las muestras obtenidas en campo fueron envueltas en toallas de papel estéril, depositadas en bolsas de papel y transportadas en una hielera hasta el Laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo; situado en el Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, para su procesamiento.

Cada conjunto de plantas enfermas fueron documentadas con los siguientes datos: variedad de soya, lugar de colecta (Estado y municipio), coordenadas geográficas y fecha de recolección.

Cuadro 1. Localidades muestreadas para el estudio de la distribución geográfica de los aislados de *M. phaseolina* y *Trichoderma* spp. en México.

ESTADOS	MUNICIPIOS	Nº de muestras
San Luis Potosí	Tamuín	50
Chiapas	Tapachula	50
Campeche	Hopelchen	50



Figura 1. Parcela de soya con síntomas de la enfermedad.

Además, otro aislado denominado MpPy fue obtenido del Distrito de Choré, Paraguay y proporcionada por la Ing. Agr. Gabriela Morel, técnico investigador del Centro Experimental Capitán Miranda, perteneciente al IPTA, situada en Capitán Miranda, Paraguay, para su identificación y uso en ensayos posteriores (Capítulo III y IV).

3.1.2. Aislamiento, purificación y conservación

Para obtener cultivos puros de *M. phaseolina* se realizó una adaptación de la metodología descrita por Leyva *et al.*, (2015), la cual consiste en tomar cada muestra en forma individual e ir cortando fragmentos de tallo (100) y de raíz (100) de aproximadamente 5 mm, los fragmentos fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 1 minuto; posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel filtro estéril hasta secarse completamente. Finalmente todas las muestras desinfectadas fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) con antibiótico ($1\mu\text{L.mL}^{-1}$ de amikacina). Las cajas se incubaron durante 6 días a 28°C en oscuridad continua tal como lo sugiere Singh *et al.*, (2008).

Las colonias que presentaban características morfológicas y crecimiento típico de *M. phaseolina* fueron transferidas a un nuevo medio PDA (Mayék-Pérez *et al.*, 2001), para posteriormente ser purificadas a partir de un solo microesclerocio y vueltas a sembrar en medio de cultivo PDA (Beas-Fernández *et al.*, 2006).

Los cultivos puros de *M. phaseolina* fueron conservados en palillos de dientes estériles a temperatura ambiente para su posterior uso (Edmunds, 1964 citado por Mahdizadeh *et al.*, 2011).

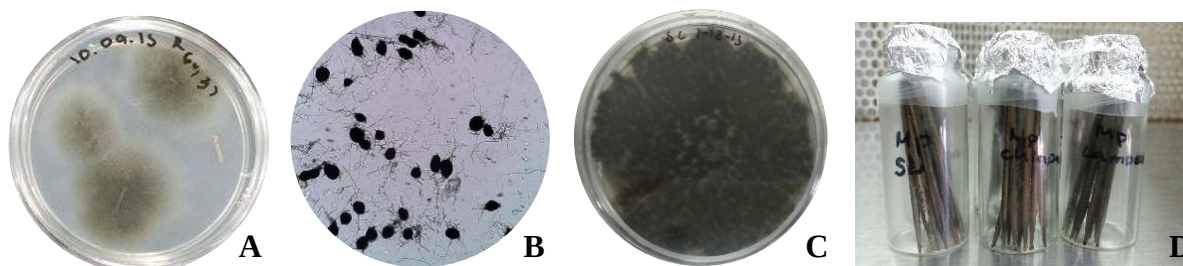


Figura 2. Cultivos de *M. phaseolina*. A: obtención del hongo a partir de fragmentos de raíz; B: microesclerios observados en el microscopio compuesto; C: cultivo puro creciendo en medio de cultivo PDA y D: conservación del patógeno.

3.1.3. Identificación morfológica y molecular

3.1.3.1. Obtención de biomasa de *Macrophomina phaseolina*

Los aislados de *M. phaseolina* se multiplicaron en placas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), incubados a 30 °C por 6 días en completa oscuridad para la obtención de la biomasa (Leyva *et al.*, 2015).

3.1.3.2. Identificación morfológica

La identificación macroscópica y microscópica se realizó mediante lo descrito por Kaur *et al.*, (2012), registrando la coloración y el tipo de crecimiento micelial de la colonia desarrollado en medio de cultivo PDA, así como, la forma y el color de los microesclerocios usando un microscopio compuesto a una magnificación de 40X. Para la confirmación de la identidad del hongo se realizó mediante la amplificación de la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal.

3.1.3.3. Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA se realizó con el kit comercial DNeasy Plant Mini siguiendo el protocolo del fabricante. Aproximadamente 50 a 100 mg de micelio fresco fueron transferidos a un tubo de microcentrifuga de 1.5 µL (tubos Eppendorf), se adicionaron 400 µL de Buffer AP1 Y 4 µL de RNasa. Posteriormente fueron agitados en vortex e incubados por 10 minutos a 65°C en baño María, agitando por inversión 2 ó 3 veces. Se adicionaron 130 µL de Buffer P3, se mezcló por inversión y se incubaron por 5 minutos en hielo. La mezcla fue colada en una columna de QIAshredder Mini spin y se centrifugó por 2 minutos a 14,000 rpm. El líquido que paso por la columna fue transferido a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 µL adicionando 1,5 volúmenes de del buffer AP3/E; se colocó en una columna DNeasy Mini spin y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm. Se transfirió en un nuevo tubo de 2 µL, se adiciono 500 µL de Buffer AW2 y centrifugó por 1 minuto a 8,000 rpm. Se adiciono otros 500 µL de Buffer AW2,

y centrifugar por 2 minutos a 14,000 rpm, transfiriendo la columna DNeasy Mini spin a un tubo nuevo. Finalmente se adiciono 100 µL de Buffer AE para la elución, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) posteriormente se centrifugo por 1 minuto a 8,000 rpm (QUIAGEN, 2012).

La calidad del DNA extraído fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 0.4 % utilizando el Buffer de corrida 1 x TAE y Gel Red. Las muestras de DNA analizada fueron mezcladas con 1/1 de volumen de Loading 6x (Azul de bromofenol, xilen-cianol, glicerol y EDTA) y depositadas en el pozo, se corrió en una cámara de electroforesis horizontal (Biosciences Amersham) a 120 v por 15 min. Se observó el gel mediante el transiluminador de UV visualizando así las bandas de DNA.

Las muestras de ADN se almacenaron a 4° C hasta su uso (Badu *et al.*, 2007).

3.1.3.4.PCR y Secuenciación

Para las reacciones de PCR las muestras de DNA obtenidos a partir de micelio de *M. phaseolina* fueron enviadas al laboratorio Macrogen Korea situada en 10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-qu, Seoul. Rep. of Korea. Para la amplificación de la región ITS del DNA ribosomal se utilizó el primer ITS-5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990), los cuales amplifican una región del espaciador interno transcripto (ITS) generando un producto de talla variable de 577 - 620 pares de bases (pb) aproximadamente (Almeida *et al.*, 2003; De Souza *et al.*, 2006).

Las secuencias enviadas por el Laboratorio fueron comparadas con las secuencias de referencia de la base de datos del GenBank utilizando BLASTn del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) sitio web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), asignando la especie de acuerdo a los niveles de concordancia. Finalmente, las secuencias ITS de los aislados fueron depositados en la base de datos GenBank (Leyva *et al.*, 2015; Cummings y Bergstrom, 2013; Da Silva y Clark, 2013; Harrington *et al.*, 2000).

3.2.Obtención de aislados nativos de *Trichoderma* spp.

3.2.1. Colecta de suelo

Para la obtención de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. se realizaron muestreos de suelo en las parcelas de soja de los Estados mencionadas anteriormente (Cuadro 1). El suelo se colectó de las raíces de las plantas con síntomas característicos de la pudrición carbonosa producida por *M. phaseolina*. Se consideraron cinco puntos de muestreo para totalizar 5 Kg de suelo de cada parcela. Las cinco submuestras de cada parcela fueron mezcladas y homogenizadas, para finalmente recoger 1 Kg de suelo como muestra representativa. Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad de 20 cm, muy cercanas al sistema radicular de las plantas de soja. Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno y trasladadas en conservadoras con hielo hasta el laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Universidad Autónoma Chapingo para su procesamiento. Además, otras 7 cepas nativas fueron aisladas de San Pedro, Paraguay y proporcionadas por el Ing. Agr. Andrés Sanabria, técnico investigador del Campo Experimental “Hernando Bertoni”, perteneciente al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), situada en Caacupé, Paraguay, para su identificación y uso en ensayos posteriores (Capítulo III y IV).

3.2.2. Aislamiento, purificación y conservación

Las muestras de suelo fueron procesadas por la técnica de dilución seriada, descrita por [Guigón y González, \(2014\)](#). De cada muestra se pesaron 10 g de suelo y en cámara de flujo laminar se mezclaron con 90 mL de agua destilada estéril produciendo la solución madre y agitando durante 20 a 30 min. Posteriormente, se tomó 1 alícuota de 1 mL de la solución madre que se diluyó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, obteniendo una dilución a 10^{-1} , repitiendo esta operación hasta llegar a 10^{-4} . De las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se tomó 1 alícuota de 1 mL que se distribuyó homogéneamente sobre una caja Petri con medio de cultivo PDA. Las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad continua ([Singh et al., 2008](#)) hasta que se observó crecimiento abundante, pero sin exceder el contacto entre cepas.

Las colonias en crecimiento que presentaron las típicas características coloniales de *Trichoderma* spp., las cuales son colonias de coloraciones verdosas y la formación de anillos concéntricos fueron resembradas en medio PDA e incubados a 28 °C durante 5

días (Küçük y Kivanç, 2003) para su purificación, utilizando la técnica de punta de hifa descrita por Da Silva y Clark, (2013) y Leyva *et al.*, (2015).

Las cepas de *Trichoderma* spp. fueron conservadas en tubos con medio de cultivo PDA y almacenadas a 4 °C para su posterior utilización (Jana *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007; Hajieghrar *et al.*, 2008).

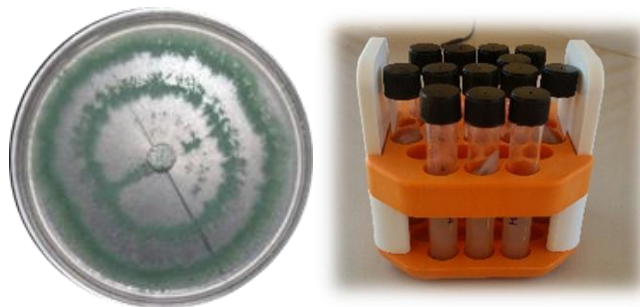


Figura 3. Cultivo puro de *Trichoderma* spp. y conservación en tubos inclinados.

3.2.3. Identificación molecular

3.2.3.1. Obtención de biomasa de *Trichoderma* spp.

Los aislados de *Trichoderma* spp. obtenidas de las muestras de suelo se multiplicaron en placas Petri con medio cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados a 28 °C por 7 días en oscuridad continua para la obtención de la biomasa (Singh *et al.*, 2008; Błaszczuk *et al.*, 2013).

3.2.3.2. Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Plant Mini siguiendo el protocolo del fabricante. El cual se detalla arriba (3.1.3.2).

3.2.3.3. PCR y Secuenciación

Para las reacciones de PCR se siguió el mismo procedimiento utilizado para el patógeno *M. Phaseolina*, en este caso la secuenciación se realizó en dos direcciones (5'→3' y 3'→5') utilizando los primers ITS-5 (GGAAGTAAAAGTC GTAACAAGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (3.1.3.3) (White *et al.*, 1990).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Identificación morfológica y molecular de *M. phaseolina*

4.1.1. Identificación morfológica

A pesar de la creciente dependencia en el diagnóstico molecular, la identificación morfológica tradicional sigue siendo una herramienta de clasificación de gran valor (Skantar *et al.*, 2011) antes de llegar a las técnicas moleculares específicas.

Se aislaron 4 colonias de *M. phaseolina*, una por Estado denominándose MpMx₁ (San Luís), MpMx₂ (Chiapas), MpMx₃ (Campeche) y MpPy (Choré). El color de las colonias de *M. phaseolina* en medio de cultivo PDA es gris inicialmente, tornándose negro a medida que pasa el tiempo debido a la gran cantidad de microesclerocios, con micelio aéreo denso y microesclerocios negros, esféricos e irregulares formado por agregación de hifas septadas e hialinas inicialmente o negras a la madurez. Numerosos microesclerocios de color marrón oscuro a negro fueron observados al dorso de la placa Petri e inmersos en el medio de cultivo; estas características coinciden con lo descrito por Kaur *et al.*, (2012) y Zhang *et al.*, (2016).

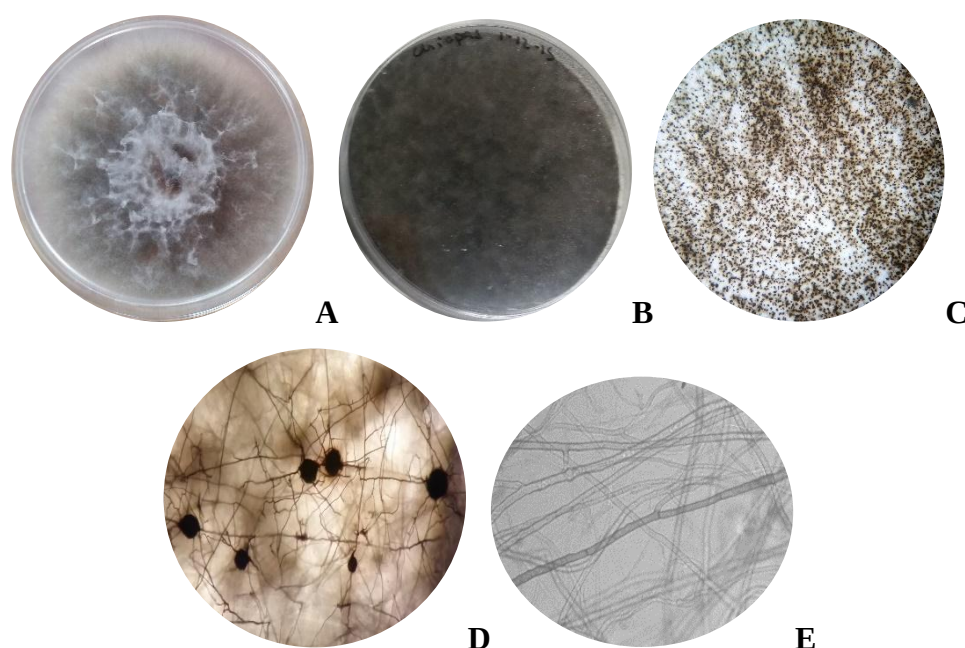


Figura 4. Crecimiento de *M. phaseolina* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar. A: micelio joven aéreo denso de color gris; B: abundante microesclerocios crecidos en medio de cultivo con micelio aéreo; C: abundante microesclerocios de color marrón oscuro a negro observado al reverso de la placa Petri; D: microesclerocios esféricos a irregulares formado por agregación de hifas y E: hifas septadas.

4.1.2. Identificación molecular

En el cuadro 2 se presenta los resultados de la amplificación de la región ITS del DNAr con los primers ITS-5, el cual generó un producto de 580 – 617 pb, respectivamente. Los resultados de las secuencias de nucleótidos mediante BLASTn confirmaron que los aislamientos MpMx₁, MpMx₂, MpMx₃ y MpPy (GenBank números de acceso KX620951, KX620950, KX620949 y KX620952) efectivamente corresponden a *M. phaseolina* mostrando una identidad del 100 % con varias secuencias presentes en la base de datos para este patógeno.

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de aislamientos de *M. phaseolina*.

Cepa	Identificación morfológica	Clave de aislamiento	Número de nucleótidos (pb)	Amplificación	Identidad (%)	Número de acceso NCBI
MpMx ₁	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MpMx15-01	617	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100	KX620951
MpMx ₂	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MpMx15-02	580	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100	KX620950
MpMx ₃	<i>Macrophomina</i>	MpMx15-03	582	<i>Macrophomina</i>	100	KX620949

MpPy	<i>phaseolina</i> <i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>	MpPy01	585	<i>phaseolina</i> <i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>	100	KX620952
------	---	--------	-----	---	-----	----------

Existen numerosos trabajos realizados para confirmar la identidad de *M. phaseolina* como agente causal de la pudrición carbonosa en muchos cultivos incluyendo la soya, frijol, algodón, maíz, girasol, caña de azúcar, fresa mediante la amplificación de la región ITS utilizando los primers ITS-1, ITS-4, ITS-5 (Cummings y Bergstrom, 2013; Weems *et al.*, 2011; Leyva-Mir *et al.*, 2015). Trabajos realizados por Pavlovic *et al.*, (2015) con cepas aisladas de siempreviva (*Helichrysum italicum*), las cuales fueron identificadas morfológicamente y corroboradas a partir del análisis de la secuencia de la región ITS reveló que MP1 aislado de Serbia (Nº de Acceso del GenBank KP281809) comparte una identidad del 100 % con *M. phaseolina* aislados de México (KF951700), Alemania (KJ744350) y Turquía (KF453967). Resultados de las secuencias (GenBank números de acceso KT862031 y KT862032) de Zhang *et al.*, (2016) fueron alineados en GenBank, mostrando una identidad del 100 % con *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (*Rhizoctonia bataticola* [Taub.] Butler) (JX945162.1).

4.2. Identificación molecular de las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Fueron aisladas 2 cepas nativas de *Trichoderma* spp., uno de San Luís (TS) y el otro de Chiapas (TT), no habiendo obtenido ninguna cepa de las muestras de suelo de Campeche, las demás cepas nativas fueron aislados de San Pedro, Paraguay (Figura 5).

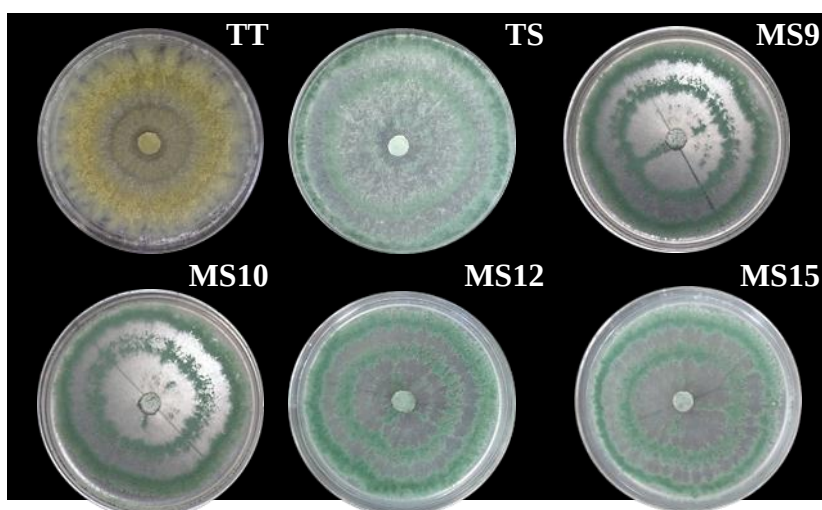




Figura 5. Crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. en cajas Petri con PDA identificadas molecularmente.

A partir de la amplificación de la región ITS con los primers ITS-5 eITS-4 se obtuvieron un producto de talla variable de 600 - 1082 pares de bases (pb) aproximadamente (Cuadro 3).

Para las cepas MS9, MS10, MS12, MS15, MS16 y MS19 el análisis de las secuencias de nucleótidos realizado mediante BLASTn mostro una identidad del 100 % con diversas secuencias correspondientes a cepas de *T. asperellum*; el análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados de la cepa TT presentó una identidad del 100 % con diferentes secuencias reportadas para *T. harzianum*, para TS el análisis de la secuencia revelo una identidad de 100 % con diferentes cepas de *Trichoderma yunnanense* y para la cepa MS28 el análisis de la secuencia revelo una identidad de 100 % con diferentes cepas de *T. erinaceum*.

Cuadro 3. Identificación molecular de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp.

Cepa	Clave de aislamiento	Número de nucleótidos (pb)	Amplificación	Identidad (%)	Número de acceso NCBI
TT	TSP15-02	1050/731	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	---
TS	TSP15-01	629/615	<i>Trichoderma yunnanense</i>	100	---
MS9	TSESP14-13	713/638	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KX620953
MS10	TSESP14-18	625/613	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KX 620958
MS12	TSESP14-16	614/628	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KX620954
MS15	TSESP14-21	602/614	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KX620955
MS16	TSESP14-19	1082/860	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KX620956
MS19	TSESP14-14	600/602	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KX620957
MS28	TSESP14-15	603/629	<i>Trichoderma erinaceum</i>	100	----

Trichoderma asperellum fue descrito como una nueva especie por Samuels *et al.* en 1999, estas cepas producen conidios finamente verrugosas, pueden sobrevivir mediante la producción de clamidosporas, con temperatura óptima de 30 °C (Sriram *et al.*, 2013).

Una reciente clasificación indicó la presencia de dos especies hermanas morfológicamente crípticas de *T. asperellum* (*T. asperelloides* y *T. yunnanense*), las secuencias de *T. yunnanense* eran muy similares a *T. asperellum*, sin embargo, *T. asperellum* puede distinguirse fácilmente de *T. yunnanense* por su rápida tasa de crecimiento, ramificación principalmente apareada, conidios finamente ornamentados y ligeramente más pequeños, además sus secuencias por TEF1 eran muy diferentes (Similitud 90.3 %) (Samuels *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2007).

T. harzianum es un agregado de especies, agrupadas sobre la base de patrones de conidióforos con ramas cortas laterales, filíadas inflados cortos, y conidios suaves y pequeña ramificación, se ha dividido en tres, cuatro, o cinco grupos subespecíficos, dependiendo de las cepas y de los atributos considerados (Grondona *et al.*, 1997). Aunque varios estudios han sugerido que es un complejo de especies, sólo unas pocas especies crípticas se nombran. Especies incluidas en el complejo son *T. guizhouense*, *T. harzianum* y *T. inhamatum*. Se proponen dos nuevas combinaciones, *T. lentiforme* y *T. lixii*. Otras nueve especies se describen como nuevas, *T. afarasin*, *T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. camerunense*, *T. endophyticum*, *T. neotropica*, *T. pyramidal*, *T. rifaii* y *T. simmonsii* (Chaverri *et al.*, 2015).

Para la correcta identificación de *T. erinaceum*, se realizaron estudios de la morfología de las colonias y análisis microscópico de la estructura reproductiva. La formación de una colonia verde algodonosa con anillos concéntricos, conidióforos erectos y ramas laterales cortas, conidios de $2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, globoso, de color verde pálido con suaves paredes fueron observados en medio de cultivo. El análisis de la amplificación de la región ITS mediante GenBank reveló una similitud del 100 % con *T. erinaceum* (Hhmu *et al.*, 2015).

V. CONCLUSIONES

De los 4 aislados de *M. phaseolina* identificados morfológicamente se ha confirmado su identidad a través del análisis de la secuencia de nucleótidos mediante la base de datos GenBank utilizando BLASTn.

De las nueve cepas evaluadas de *Trichoderma* spp., seis de ellas corresponden a *T. asperellum*, una pertenece a *T. harzianum*, otra a *T. yunnanense* y la restante a *T. erinaceum*.

VI. LITERATURA CITADA

Almeida, ÁM; Abdelnoor, RV; Arias, CAA; Carvalho, VP; Jacoud, DS; Marin, SR; Carvalho, CG. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3), 279-285.

Babu, BK; Saxena, AK; Srivastava, AK; Arora, DK. 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*, 99(6), 797-803.

Beas-Fernández, R; De Santiago-De Santiago, A; Hernandez-Delgado, S; Mayek-Perez, N. 2006. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *Journal of Plant Pathology*, 80(1), 53-60.

Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC y Codón, AC. 2004. Mecanismos de biocontrol de cepas de *Trichoderma*. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.

Błaszczuk, L; Siwulski, M; Sobieralski, K; Frużyńska-Józwiak, D. 2013. Diversity of *Trichoderma* spp. causing Pleurotus green mould diseases in Central Europe. *Folia Microbiologica*, 58(4), 325-333.

Castle, A; Speranzini, D; Rghei, N; Alm, G; Rinker, D; Bissett, J. 1998. Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms. *Applied and environmental microbiology*, 64(1), 133-137.

Chakraborty, BN; Chakraborty, U; Saha, A; Dey, PL; Sunar, K. 2010. Molecular characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from soils of North Bengal based on rDNA markers and analysis of their PCR-RAPD profiles. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5(1), 55-61.

Chakraborty, BN; Chakraborty, U; Dey, PL; Rai, K. 2011. rDNA Sequence and Phylogenetic Analysis of *Macrophomina phaseolina*, Root Rot Pathogen of *Citrus reticulata* (Blanco). *Global Journal of Molecular Sciences*, 6(2), 26-34.

Chaverri, P; Branco-Rocha, F; Jaklitsch, W; Gazis, R; Degenkolb, T; Samuels, GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.

Cloud, GL; Rupe, JC. 1991. Morphological instability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. *Phytopathology*, 81(8), 892-895.

Cummings, JA; Bergstrom, GC. 2013. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in soybean in New York. *Plant Disease*, 97(11), 1506.

Da Silva, WL; Clark, CA. 2013. Infection of sweetpotato by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina* prior to harvest. *Plant Disease*. 97(12), 1636-1644.

De Souza, JT; Pomella, AV; Bowers, JH; Pirovani, C; Loguercio, LL; Prakash, K. 2006. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches'-broom pathogen. *Phytopathology*, 96(1), 61-67.

Dubey, SC; Suresh, M; Singh, B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40(1), 118-127.

Ganesan, S; Kuppusamy, RG; Sekar, R. 2007. Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(2), 103-108.

Gupta, GK; Sharma, SK; Ramteke, R. 2012. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of phytopathology*, 160(4), 167-180.

Grondona, I; Hermosa, R; Tejada, M; Gomis, MD; Mateos, PF; Bridge, PD; Monte, E; Garcia-Acha, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3189-3198.

Guigón-López, C; González-González, PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 117-124.

Hajieghrari, B; Mousa, TG; Mohammad, RM; Mahdi, D. 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.

Haran, S; Schickler, H; Oppenheim, A; Chet, I. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, 99(4), 441-446.

Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Harrington, TC; Steimel, J; Workneh, F; Yang, XB. 2000. Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north central United States. *Plant Disease*. 84(1), 83-89.

Hermosa, MR; Grondona, I; Iturriaga, ET; Diaz-Minguez, JM; Castro, C; Monte, E; Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.

Hermosa, MR; KECK, E; Chamorro, I; Rubio, B; Sanz, L; Vizcaíno, JA; Grondona, I; Monte, E. 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological research*, 108(08), 897-906.

Hhmau, H; Wijesundera, RLC; Chandrasekharan, NV; Wijesundera, WSS; Kathriarachchi, HS. 2015. Isolation and characterization of *Trichoderma erinaceum* for antagonistic activity against plant pathogenic fungi. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*, 5(2), 120-127.

Jana, T; Sharma, TR; Prasad, RD; Arora, DK. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological research*, 158(3), 249-257.

Kaur, S; Dhillon, GS; Brar, SK; Vallad, GE; Chand, R; Chauhan, VB. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical reviews in microbiology*, 38(2), 136-151.

Küçük, Ç; Kivanç, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 247-253.

Leyva-Mir, SG; Velázquez-Martínez, GC; Tlapal-Bolaños, B; Alvarado-Gómez, OG; Tovar-Pedraza, JM; Hernández-Arenas, M. 2015. First Report of Charcoal Rot of Sugarcane Caused by *Macrophomina phaseolina* in Mexico. *Plant Disease*. 99(4), 553.

Mahdizadeh, V; Safaie, N; Goltapeh, EM. 2011. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. *The Plant Pathology Journal*, 27(2), 128-137.

Mayék-Pérez, N; López-Castañeda, C; González-Chavira, M; Garcia-Espinosa, R; Acosta-Gallegos, J; de la Vega, OM; Simpson, J. 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 257-264.

Mengistu, A; Ray, JD; Smith, JR; Paris, RL. 2007. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science*, 47(6), 2453-2461.

Ospina-Giraldo, MD; Royse, DJ; Chen, X; Romaine, CP. 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology*, 89(4), 308-313.

Pavlovic, S; Ristic, D; Aleksic, G; Milosevic, D; Stevic, T; Starovic, M. 2015. The first report of *Macrophomina phaseolina* of immortelle (*Helichrysum italicum*) in Serbia. *Plant Disease*, 99(9).

Pearson, CAS; Leslie, JF; Schwenk, FW. 1987. Host preference correlated with chlorate, resistance in *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 71(9), 828-831.

Purkayastha, S; Kaur, B; Dilbaghi, N; Chaudhury, A. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant pathology*, 55(1), 106-116.

Quiagen. 2012. Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania.

Raaijmakers, JM; Paulitz, TC; Steinberg, C; Alabouvette, C; Moënné-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 341-361.

Samuels, GJ; Ismaiel, A; Bon, MC; De Respini, S; Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944-966.

Singh, N; Pandey, P; Dubey, RC; Maheshwari, DK. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679.

Skantar, AM; Handoo, ZA; Zasada, IA; Ingham, RE; Carta, LK; Chitwood, DJ. 2011. Morphological and molecular characterization of *Globodera* populations from Oregon and Idaho. *Phytopathology*, 101(4), 480-491.

Srinivasan, A; Wickes, BL; Romanelli, AM; Debelenko, L; Rubnitz, JE; Sutton, DA; Thompson, EH; Fothergill, AW; Rinaldi, MG; Hayden, RT; Shenep, JL. 2009. Cutaneous infection caused by *Macrophomina phaseolina* in a child with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical microbiology*, 47(6), 1969-1972.

Sriram, S; Savitha, MJ; Rohini, HS; Jalali, SK. 2013. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. *Curr Sci India*, 104(10), 1332-1340.

Su, G; Suh, SO; Schneider, RW; Russin, JS. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126.

Szekeres, A; Kredics, L; Antal, Z; Kevei, F; Manczinger, L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 215-222.

Weems, JD; Ebelhar, SA; Chapara, V; Pedersen, DK; Zhang, GR; Bradley, CA. 2011. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on sunflower in Illinois. *Plant Disease*, 95(10), 1318-1318.

White, TJ; Bruns, T; Lee, SJWT; Taylor, JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, 18(1), 315-322.

Yu, ZF; Qiao, M; Zhang, Y; Zhang, KQ. 2007. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), 101-108.

Zhang, YY; Yu, Y; Wang, K; Li, M; Xu, DS; Zhao, J. 2016. First Report of Sunflower Charcoal Rot Caused by *Macrophomina phaseolina* in Jilin and Inner Mongolia, China. *Plant Disease*. 100(7), 1494.

CAPÍTULO III. CAPACIDAD ANTAGÓNICA *in vitro* DE DIFERENTES AISLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE *Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goidanich, CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.]

Fernández-Gamarra, MA¹; Ramírez-Alarcón, S¹; Acosta-Ramos, M¹; Quintana-de Viedma, L²; Maidana-Ojeda, M²; Fuentes-Aragón, D¹

¹Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo,

²Profesor-Investigador Fitopatología, Universidad Nacional de Itapúa.

Resumen

Se evaluó la tasa de crecimiento (TC) y capacidad antagónica *in vitro* contra *M. phaseolina* de catorce cepas nativas de *Trichoderma* spp. El antagonismo fue evaluado mediante confrontación por cultivos duales, metabolitos volátiles y difusibles. La tasa de crecimiento promedio de las cepas de *Trichoderma* crecido en papa-dextrosa-agar a 25 ± 2 °C varió de 9.31 a 14.25 mm.día⁻¹ y de los aislados de *M. phaseolina* entre 7.63 y 14.50 mm.día⁻¹ a los 72 horas después de la inoculación (HDI). Cuatro cepas de *Trichoderma* de las catorce (TB2, CH1, MS19 y MS15) mostraron mayor capacidad antagónica por cultivo dual en un primer ensayo. Durante un segundo ensayo estas cepas fueron confrontadas con 2 aislados de *M. phaseolina* (MpMx₁ y MpPy) en un diseño completos al azar en arreglo factorial. La inhibición del crecimiento de los aislados de *M. phaseolina* por cultivo dual varió de 48.50 % a 63.75 %, por producción de metabolitos volátiles vario de 14.00 % al 56.00 % y por metabolitos difusibles de 95.75 % al 100 %, respectivamente. La actividad antagónica de MS19 fue el mejor en las 3 pruebas de antagonismo para ambos aislados de *M. phaseolina*, sin embargo para la cepa TB2 por más que por competencia y metabolitos difusibles fuera el mejor no fue capaz de producir metabolitos volátiles que inhiban satisfactoriamente el crecimiento micelial del patógeno en estudio.

Palabras claves: Control biológico, *T. yunnanense*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. erinaceum*, *Macrophomina phaseolina*

I. INTRODUCCIÓN

Macrophomina phaseolina [Tassi] Goidanich es un hongo de suelo causante de la pudrición carbonosa de la raíz y del tallo, que causa importantes pérdidas económicas en muchos cultivos (Jana *et al.*, 2003) incluyendo soya, maíz, sorgo y algodón (Su *et al.*, 2001) y otros (Leyva *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2013; Weems *et al.*, 2011). En soya, es una de las enfermedades más importantes que se encuentra presente en zonas tropicales y subtropicales de las regiones del mundo que resulta en la disminución del rendimientos y calidad de las semillas (Khaledi y Taheri, 2016).

Agentes de control biológico podrían ser una alternativa eficaz y confiable para el control de *M. phaseolina*. Varias cepas del género *Trichoderma* se han reportado por ser eficaz para el control de este y de otros patógenos causante de enfermedades en las plantas, dando resultados muy satisfactorios (Krause *et al.*, 2001; Kredics *et al.*, 2004). Las propiedades antagónicas se basan en la activación de múltiples mecanismos de control biológico (Benítez *et al.*, 2004) como la competencia por espacio y nutrientes, el parasitismo, la producción de enzimas, metabolitos volátiles y no volátiles o la acción combinada de estos mecanismos (Dennis y Webster, 1971; Ganesan *et al.*, 2007).

Una buena selección de estos agentes de control biológico, así como el conocimiento de los mecanismos implicados en el efecto antagónico sobre patógenos de las plantas son importantes en el momento de diseñar estrategias eficaces y seguras (Hajieghrari *et al.*, 2008).

El primer informe de la efectividad de *Trichoderma* como agente de control biológico contra *M. phaseolina* fue realizado por Elad *et al.*, (1986), en un estudio realizado aisló *T. harzianum* que resulto ser muy eficaz para inhibir tanto la producción microesclerocios y el crecimiento de *M. phaseolina* en condiciones *in vitro*.

Sreedevi *et al.*, (2011), mencionaron que sustancias antibióticas fueron producidos por *Trichoderma* spp. en concentración suficiente para afectar el crecimiento de *M. phaseolina*.

El control que ejerce *Trichoderma* sobre cualquier hongo causante de enfermedades en plantas incluyendo *M. phaseolina*, *Fusarium* spp, *Sclerotium* spp., *Colletotrichum* spp., entre otros, puede atribuirse a su capacidad metabólica diversa y a su naturaleza competitiva y agresiva (Bankole y Adebajo, 1996; Elad, 2000; Larralde-Corona *et al.*, 2008; Anand y Reddy, 2009).

Aly *et al.*, (2007), mencionaron que aislados de *Trichoderma* spp. deben ser probados contra el mayor número de aislamientos de *M. phaseolina* como sea posible, ya que esto mejorará la posibilidad de identificar aislados antagonistas eficaces contra varias cepas del patógeno.

Finalmente, Rajendiran *et al.*, (2010), explicaron que el éxito del control biológico se consigue en condiciones *in vitro*, así como también menciona que un agente de control biológico microbiano es inofensivo para los animales y seres humanos, es más económico que los productos químicos y altamente eficaz. No existe riesgo que los patógenos desarrollen resistencia, ni de encontrar residuos de fungicidas en los alimentos y en aguas subterráneas.

II. OBJETIVOS

- ✓ Determinar la tasa de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. y de *M. phaseolina* utilizadas.
- ✓ Evaluar el potencial antagónico de *Trichoderma* spp. para el control *M. phaseolina* en condiciones *in vitro*.
- ✓ Evaluar el efecto antagónico de los metabolitos volátiles y difusibles producidos por las cepas de *Trichoderma* spp. contra *M. phaseolina*.

III. HIPÓTESIS

- Las cepas de *Trichoderma* spp. tienen efecto competitivo (cultivo dual) contra *M. phaseolina*.
- Las cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos volátiles o difusibles con efecto antagónico contra *M. phaseolina*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área de estudio

Los ensayos *in vitro* fueron realizados en el Laboratorio de Hongos Fitopatógenos, perteneciente al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México y en el Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Capitán Miranda, perteneciente al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Capitán Miranda, Paraguay.

4.2. Aislados de *Trichoderma* spp. y de *M. phaseolina*

Las cepas de *Trichoderma*, *T. yunnanense* (TS) y *T. harzianum* (TT), fueron aisladas de suelos próximos al sistema radicular de las plantas de soya con síntomas característicos de la pudrición carbonosa producida por *M. phaseolina* cultivado en San Luís Potosí y Chiapas, México (Capítulo II). Las cepas *T. koningiopsis* (TB2 y CH1), *T. harzianum* (MOR2) y *T. asperellum* (SIN3) fueron proporcionadas por el MSc. Dionicio Fuentes Aragón, todas estas cepas corresponden a los aislados de México. Con respecto a los aislados de Paraguay, las cepas *T. asperellum* (MS19, MS12, MS10, MS16, MS9 y MS15) y *T. erinaceum* (MS28) fueron proporcionados por el Ing. Agr. Andrés Gabriel Sanabria, técnico investigador del Campo Experimental “Hernando Bertoní”, perteneciente al IPTA, situada en Caacupé, Paraguay. La cepa comercial *T. harzianum* Rifai (TL), fue utilizada como testigo.

Las cepas de *M. phaseolina*, MpMx₁, MpMx₂ y MpMx₃ (cepa mexicana) fueron aisladas de raíces que presentaron las características típicas de la enfermedad de los Estados de San Luís, Chiapas y Campeche, México (Capítulo II). La cepa MpPy fue aislada del Distrito de Choré, Departamento de San Pedro, Paraguay y proporcionada por la Ing. Agr. Gabriela Morel, técnico investigador del Centro Experimental Capitán Miranda, perteneciente al IPTA, situada en Capitán Miranda, Paraguay.

Todas las cepas fueron previamente identificadas por métodos moleculares (Capítulo II).

4.3. Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *M. phaseolina*

4.3.1. Caracterización de la tasa de crecimiento diario

Para la determinación de la TC se siguió una adaptación de la metodología descrita por [Guigón *et al.*, \(2010\)](#), discos de PDA de 5 mm de diámetro conteniendo micelio de cada cepa (*Trichoderma* spp. y *M. phaseolina*) fueron inoculados individualmente en el centro de las cajas Petri de 90 mm de diámetro, las cuales fueron incubadas a 25 ± 2 °C con 12 horas luz/oscuridad. La TC fue medido a los 24, 48 y 72 HDI con una regla graduada en mm, utilizando la siguiente formula (Zadoks y Schein, 1979): $TC (mm.día^{-1}) = C_2 (mm) - C_1 (mm) / T_2 (días) - T_1 (días)$

Dónde: TC = Tasa de crecimiento

C_2 = Crecimiento final

C^1 = Crecimiento inicial

T_2 = Tiempo final

T_1 = Tiempo inicial

En esta prueba, de las 3 cepas de *M. phaseolina* (MpMx₁, MpMx₂ y MpMx₃) proveniente de México, fue seleccionada para el ensayo de confrontación por cultivos duales, la que presento mayor TC (mm.día⁻¹).

4.3.2. Técnica de Cultivos duales

El potencial antagónico de *Trichoderma* spp. fue evaluado en relación con los aislados de *M. phaseolina*, por la técnica denominada cultivo dual descrita por [Dennis y Webster, \(1971\)](#); [Dhingra y Sinclair, \(1995\)](#); [Gajera *et al.*, \(2013\)](#). Placas Petri que contenía PDA se inocularon con un disco de 5 mm de diámetro de agar con micelio de *M. phaseolina* y en el otro extremo *Trichoderma* spp., a igual distancia del borde de la placa. El control consistió en una placa con un disco de agar con micelio del patógeno sin el antagonista. Las placas inoculadas se incubaron a 25 ± 2 °C y el crecimiento radial del patógeno se midió 24, 48 y 72 HDI.

En esta prueba las cepas tanto del antagonista como del patógeno provenientes de México y de Paraguay fueron estudiadas por separado a fin de seleccionar 2 cepas de *Trichoderma* con mayor efecto antagónico por cada lugar. Las 4 cepas seleccionadas fueron estudiadas en un segundo ensayo *in vitro* que consiste en confrontar las 4 cepas de *Trichoderma* seleccionadas anteriormente con *M. phaseolina* aislada de cada país utilizando nuevamente el método del cultivo dual y agregando dos métodos más tales como, metabolitos volátiles y difusibles. También fueron utilizados en el ensayo en condiciones semi-controladas (Capítulo IV).

4.3.3. Efecto de metabolitos volátiles

Se empleó el método de placas superpuestas descrita por [Dennis y Webster, \(1971\)](#), que consiste en inocular en el centro de las placas Petri con PDA discos de 5 mm de los aislados de *Trichoderma* e incubadas a 25 ± 2 °C por 48 hs. Posteriormente la parte superior de cada placa fue reemplazada con la parte inferior de otra placa con PDA inoculada centralmente con *M. phaseolina*. Como control se utilizó placas Petri con medio PDA sin *Trichoderma* spp., nuevamente la tapa fue reemplazado con la parte inferior de otra placa inoculada centralmente con *M. phaseolina*. Los pares de cada placa Petri se sellaron con cinta paraffin y se incubaron a 25 ± 2 ° C. El diámetro de la colonia del patógeno se midió a las 24, 48 y 72 HDI.

4.3.4. Efecto de metabolitos difusibles

El efecto de los metabolitos difusibles se desarrolló siguiente el método descrito por [Dennis y Webster, \(1971\)](#); [Lundberg y Unestan, \(1980\)](#). Placas Petri con PDA conteniendo un disco de papel celofán estéril fueron inoculadas en el centro con un disco de agar con micelio de *Trichoderma* spp. e incubadas a 25 ± 2 °C por 72 horas. Posteriormente, se realizó el retiro de este con la colonia de *Trichoderma* spp. y en el mismo lugar se colocó un disco de *M. phaseolina*. El testigo consistió en el cultivo del patógeno después de retirado el celofán, sin previa siembra del antagonista. El diámetro de la colonia del patógeno fue medido a las 24, 48 y 72 HDI.

4.4. Análisis y diseño Experimental

En los 3 ensayos de antagonismo (cultivo dual, metabolitos volátiles y difusibles) fue calculado el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) que ejerció el antagonista sobre el patógeno, mediante la utilización de la siguiente fórmula (Dubey *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2008): $PIC = [(C - T) / C] * 100$

Dónde:

C: crecimiento radial de *M. phaseolina* en el control

T: crecimiento radial de *M. phaseolina* en cultivo dual

Los datos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos expresados en porcentaje fueron transformados al arcoseno/raíz cuadrada antes de su análisis estadístico (ANOVA) (Aly *et al.*, 2007; Guigón *et al.*, 2010). Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ($P = 0.05$), con el paquete estadístico SAS versión 9.3. Para el segundo ensayo, para evaluar el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas por cultivo dual de cada país (Mx y Py) contra los aislados de *M. phaseolina* fueron analizados bajo un diseño factorial 4 X 2 con 4 repeticiones y las medias fueron comparadas por Tukey ($P = 0.05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *M. phaseolina*

5.1.1. Caracterización de la tasa de crecimiento diario

La TC es una herramienta fisiológica útil para predecir la habilidad de las cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico, por lo que es utilizada como una primera referencia al caracterizar cepas nuevas de este antagonista (Uzunovic y Webber, 1998; Hermosa *et al.*, 2000).

En el cuadro 1 se presentan los resultados correspondientes a la TC de las cepas de *Trichoderma* provenientes tanto de México como de Paraguay, a las 72 HDI. Se observó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Con respecto a las cepas de México, las cepas TT y MOR2 mostraron la mayor tasa de crecimiento (14.25 y 14.00 mm.día⁻¹), superando a TB2 (11.88 mm.día⁻¹), siendo esta la cepa con menor TC.

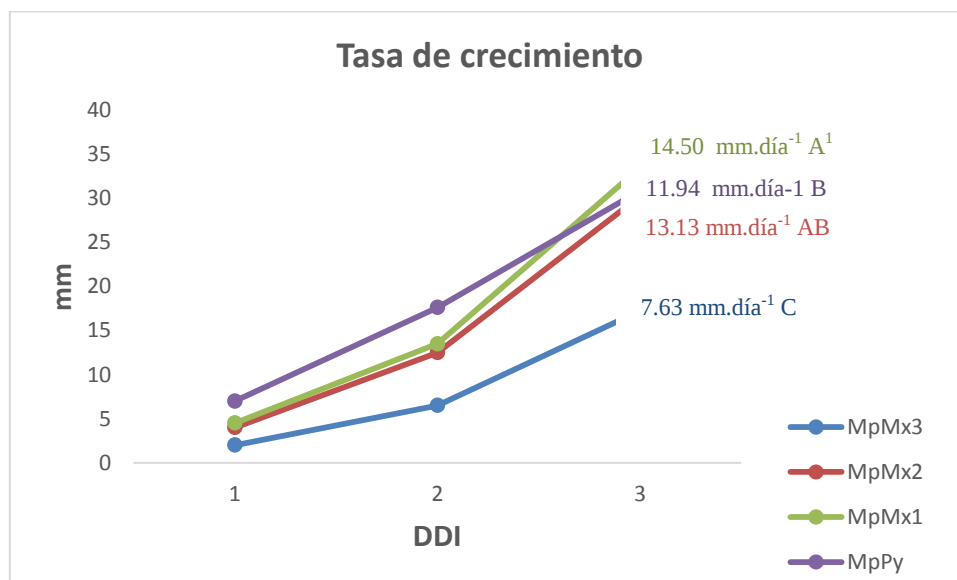
Con relación a las cepas provenientes de Paraguay, la cepa MS19 presento mayor TC con respecto a las demás (11.38 mm.día⁻¹, respectivamente), siendo el MS15 y MS28 la de menor crecimiento (9.88 y 9.31 mm.día⁻¹), mientras que las demás cepas tienen una TC similar entre sí.

Cuadro 1. Tasa de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar.

Cepa	Tasa de crecimiento (mm.día ⁻¹)	Cepa	Tasa de crecimiento (mm.día ⁻¹)
TT	14.25 A ¹	MS19	11.38 A ²
MOR2	14.00 AB	MS12	10.38 B
TS	13.50 ABC	MS9	10.38 B
TL	12.75 ABC	MS16	10.19 B
CH1	12.38 ABC	MS10	10.13 B
SIN3	12.25 BC	MS15	9.88 BC
TB2	11.88 C	MS28	9.31 C
Media	13.00	Media	10.23
FC	4.88 >2.573*	FC	21.34 >2.573*
CV	6.42	CV	2.64

^{1,2}Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$)

Para los aislados de *M. phaseolina*, se observó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) a las 72 HDI, la mayor TC la presentó MpMx₁ (14.50 mm.día⁻¹) seguido de MpMx₂, MpPy y MpMx₃ (13.13, 11.94 y 7.63 mm.día⁻¹, respectivamente) (Figura 1). El análisis de ANOVA arroja una media de 11.84, FC de 31.58 y CV de 8.96.



¹Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$)

Figura 1. Tasa de crecimiento de los aislados de *M. phaseolina* en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar.

Mahdizadeh *et al.*, (2011) midieron la tasa de crecimiento en mm.h⁻¹ de 52 aislados de *M. phaseolina* obtenidos a partir de 24 especies de plantas hospederas, resultados arrojaron una TC de 0.833 a 1.542 mm.h⁻¹. En otro trabajo, Iqbal y Mukhtar, (2014) midieron el crecimiento radial de 65 aislamientos de *M. phaseolina* a los 7 DDI obteniendo resultados que oscilaron entre 32.00 a 87.17 mm.

De los 3 aislados de *M. phaseolina* provenientes de México, fue seleccionado MpMx₁ para ser utilizados en la técnica de cultivos duales, por ser la que presentó mayor TC (14.50 mm.día⁻¹).

5.1.2. Técnica de Cultivos duales

El crecimiento radial de *M. phaseolina* mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) al confrontarse con las diferentes cepas de *Trichoderma* (Cuadro 2).

El crecimiento del patógeno se redujo al doble con respecto al testigo al confrontarse con las diferentes cepas, siendo TB2 la que presentó mejor potencial antagónico al inhibir el 77.25 % de su crecimiento, respectivamente. El resto de las cepas CH1, SIN3, TS, TL, MOR2 y TT mostraron comportamiento similar entre sí. ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. phaseolina*, por el efecto de cepas de *Trichoderma* spp. proveniente de México en cultivo dual.

Cepa de <i>Trichoderma</i>	Cultivo dual	
	Crecimiento radial de <i>M. phaseolina</i> (mm) ¹	Inhibición (%)
TB2	14.25 C ²	77.25 A
CH1	19.25 B	69.00 B
SIN3	19.75 B	68.50 B
TS	20.00 B	68.25 B
TL	21.50 B	65.75 B
MOR2	21.75 B	65.25 B
TT	22.50 B	64.00 B
Control	62.50 A	-----
Media	25.19	68.29
FC	311,66 >2.573*	8.47 >2.573*
CV	6.88	4.41

¹Tiempo de observación 72 HDI

²Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$)

El crecimiento radial de *M. phaseolina* proveniente de Paraguay mostró diferencias estadísticamente significativas al confrontarse con las diferentes cepas de *Trichoderma* ($P < 0.05$) (Cuadro 3). El crecimiento del patógeno se redujo a la mitad al confrontarse con las cepas MS19, MS15, MS16 y MS12. Las cepas de MS19 y MS15 mostraron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *M. phaseolina* que MS10, reflejándose esto en una disminución del 60.75 y 58.25 % del crecimiento micelial del patógeno. El efecto inhibitorio de las cepas MS16, MS12, MS9 MS28 y MS10 fue similar entre sí.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. phaseolina*, por el efecto de cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de Paraguay en cultivo dual.

Cepa de <i>Trichoderma</i>	Cultivo dual	
	Crecimiento radial de <i>M. phaseolina</i> (mm) ¹	Inhibición (%)

MS19	24.00	D ²	60.75 A
MS15	25.50	BC	58.25 AB
MS16	30.25	BC	51.00 AB
MS12	30.25	ABC	51.00 AB
MS9	31.25	ABC	49.25 AB
MS28	33.00	ABC	46.25 AB
MS10	34.25	AB	44.50 B
Control	61.75	A	-----
Media	33.78		51.57
FC	45.54	>2.573*	3.02 >2.573*
CV	10.37		13.31

¹Tiempo de observación 72 HDI

²Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, p = 0.05)

Teniendo en cuenta estos resultados, las cepas TB2, CH1, MS19 y MS15 fueron seleccionadas para evaluarse en un segundo ensayo de antagonismo *in vitro* (Cuadro 4: cultivo dual, metabolitos volátiles y difusibles) y en macetas bajo cámara de vegetación (Capítulo IV).

El porcentaje de inhibición micelial vario de 48.50 % a 63.75 % (Cuadro 4). Para ambas aislados de *M. phaseolina* la cepa que ejerció mayor efecto inhibitorio fue el TB2 (MpMx₁: 57.75 % y MpPy: 63.75 %) y MS19 (MpMx₁: 54.50 % y MpPy: 60.75 %), respectivamente, de la misma forma la cepa MS15 presento menor capacidad para inhibir el micelio del patógeno con un 49.50 % para MpMx₁ y 48.50 % para MpPy, comportándose de manera similar sobre los aislados de *M. phaseolina* (Figura 2).

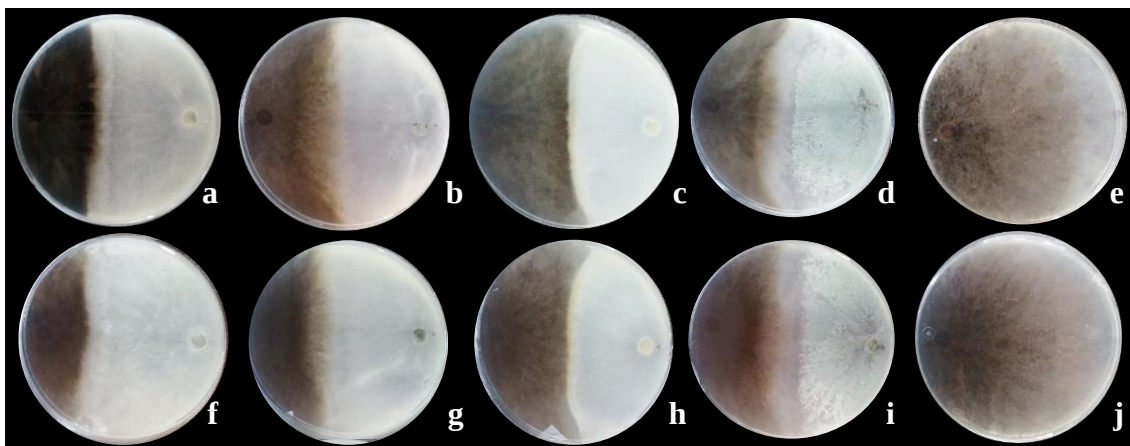


Figura 2. Potencial antagónico de las cepas de *Trichoderma* sobre los aislados *M. phaseolina* en cultivo dual: Arriba MpMx₁ y abajo MpPy en confrontación con a-f, TB2; b-g, MS19; c-h, CH1; d-i, MS15 y e-j, Control.

Estos resultados coinciden con lo observado por [Khaledi y Taher, \(2016\)](#), quienes señalaron que 11 aislados de *Trichoderma* spp. evaluados inhibieron el crecimiento micelial de *M. phaseolina* del 20.22 al 58.67 % en la prueba de cultivo dual.

[Asran-Amal et al., \(2010\)](#), en un estudio *in vitro* realizado con cinco aislados de *T. harzianum*, un aislado de *Chaetomium globosum* y de *Conotherium mentance*, revelaron que todos ellos redujeron significativamente el área de crecimiento de *M. phaseolina*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* en medio papa-dextrosa-agar. [Shekhar y Kumar, \(2010\)](#), evaluaron seis cepas de *T. harzianum* como posibles agentes de control biológico en virtud de la técnica de cultivo dual para su eficacia contra *M. phaseolina*, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *M. phaseolina* vario del 51.00 al 62.34 %, respectivamente, en comparación con el control.

Por su parte, [Khalili et al., \(2016\)](#), proporcionaron evidencias empíricas de la eficacia de tres aislados de *T. harzianum* (T2, T10 y T12) como agentes de control biológico contra la pudrición carbonosa en la soya, concluyendo que los 3 aislados redujeron significativamente el crecimiento del fitopatógeno, sin embargo, la cepa T12 mostro mayor efecto inhibitorio que T2 y T10, inhibiendo el crecimiento de *M. phaseolina* en un 72.31 % por cultura dual, del mismo modo, [Sreedevi et al., \(2011\)](#), mencionaron que *T. viride* y *T. harzianum* reducen el crecimiento del micelio en un 61.1 % y 64.4 %, respectivamente.

5.1.3. Efecto de Metabolitos volátiles

El porcentaje de inhibición micelial de *M. phaseolina* por medio de los metabolitos volátiles liberados por *Trichoderma* fue de 14.00 al 56.00 %, respectivamente (Cuadro 4). Las cepas MS19 y CH1 tuvieron mejor capacidad antagónica sobre MpMx₁ al inhibir el micelio en un 56.00 y 55.25 % y sobre MpPy en un 54.00 y 52.50 %. La cepa TB2 no ejerció gran efecto inhibitorio sobre MpMx₁ al reducir el crecimiento en tan solo 14.00 %, sin embargo para el aislado MpPy logro reducir el crecimiento hasta un 50.75 % (Figura 3). De manera general las cepas MS19, CH1 y MS15 se comportan de manera similar entre sí sobre ambos aislados de *M. phaseolina*, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre esas cepas *Trichoderma* ($P < 0.05$). Con respecto a la cepa TB2 se comporta de manera similar a las cepas anteriormente nombradas sobre el aislado de MpPy, no así sobre el aislado de MpMx₁.

Vey *et al.*, (2001), mencionaron que una gran variedad de metabolitos volátiles secundarios podrían ser producidos por *Trichoderma* spp. tal como etileno, cianuro de hidrógeno, los aldehídos y cetonas, que juegan un papel importante en el control de varias patógenos de plantas. El crecimiento del micelio de *M. phaseolina* se redujo a 49.52 % y 56.72 % respectivamente, debido a la producción de metabolitos volátiles de 2 aislados de *T. harzianum* (Khaledi y Taheri, 2016).

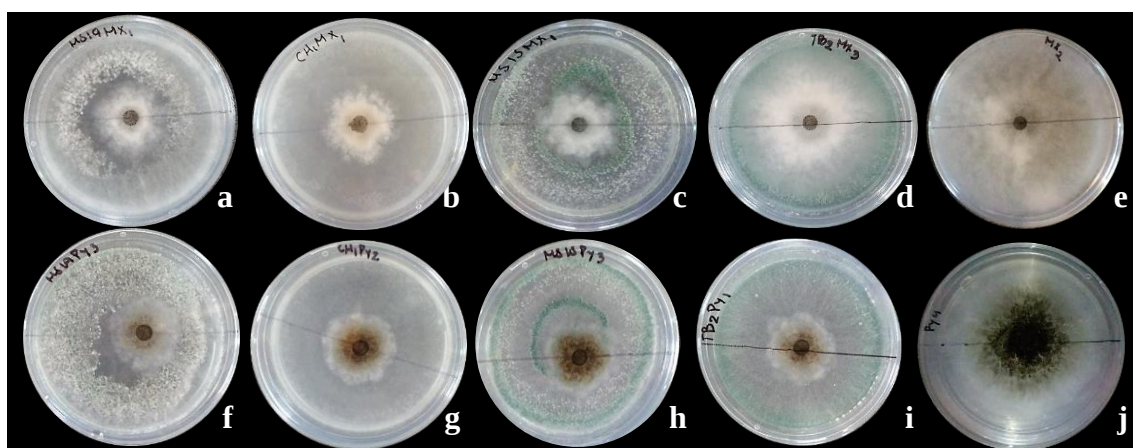


Figura 3. Efecto de los metabolitos volátiles producido por las cepas de *Trichoderma* contra los aislados *M. phaseolina* mediante el método de placas superpuestas: Arriba MpMx₁ y abajo MpPy confrontado con **a-f**, MS19; **b-g**, CH1; **c-h**, MS15; **d-i**, TB2 y **e-j**; Control.

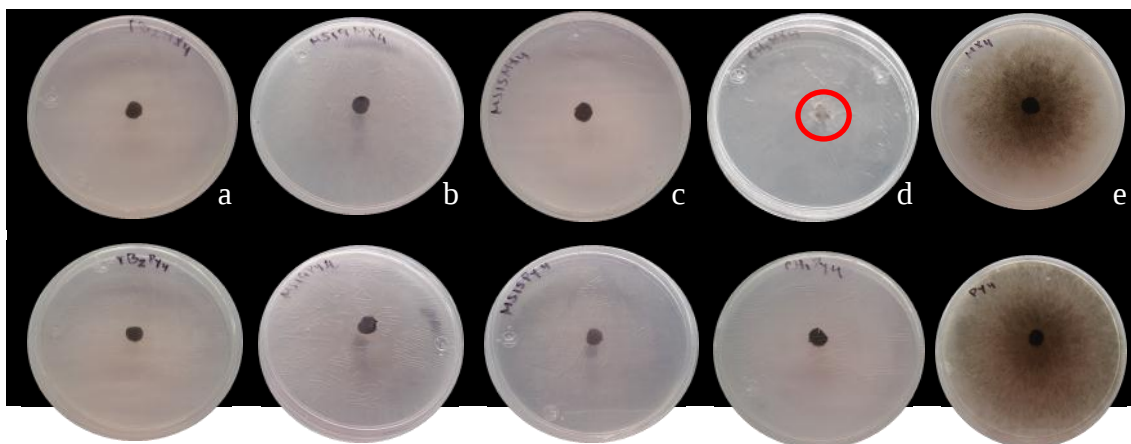
Shekhar y Kumar, (2010) observaron que un nuevo aislado de *T. harzianum* (Hyderabad) fue capaz de inhibir hasta un 41 % el crecimiento radial del patógeno a través de sustancias volátiles. En otro estudio, Khalili *et al.*, (2016), concluyeron que el aislado de *T. harzianum* (T12) inhibió el crecimiento de *M. phaseolina* por la producción de volátiles en un 63.36 %. Sreedevi *et al.*, (2011) mencionaron que el porcentaje de inhibición debido a la producción de metabolitos varía dependiendo de la especie de *Trichoderma*, en el caso de *T. viride* consiguió inhibir el crecimiento del hongo hasta un 47 % y *T. harzianum* hasta un 64.7 %, respectivamente, a las 24 HDI, sin embargo fue reduciendo su efectividad a medida que pasaba el tiempo de inoculación, ya que a las 72 HDI del patógeno el porcentaje de inhibición para *T. viride* era de apenas 13.9 y de *T. harzianum* de 39.5 %.

5.1.4. Efecto de Metabolitos difusibles

No se observó diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de *Trichoderma* y/o entre los aislados de *M. phaseolina* ni entre la interacción *Trichoderma***M. phaseolina* ($P < 0.05$) (Cuadro 4).

El porcentaje de inhibición micelial de *M. phaseolina* por medio de los metabolitos difusibles liberados por *Trichoderma* fue del 95.75 al 100 %, respectivamente (Cuadro 4). Las cepas TB2, MS19 y MS15 tuvieron mejor capacidad antagónica sobre ambos aislados de *M. phaseolina* (MpMx₁ y MpPy) al inhibir el micelio en un 100 %. La cepa CH1 impidió el crecimiento de MpMx₁ en un 95.75 %, sin embargo para el aislado MpPy logro reducir el crecimiento en un 100 % (Figura 3).

Estos resultados son similares a los estudios realizados por [Etebarian, \(2010\)](#) quien evaluó dos aislados de *T. harzianum* (T39 y M), uno de *T. virens* (DAR74290) y *T. viride* (MO) concluyendo que no hay crecimiento de *M. phaseolina* con los 2 aislados de *T. harzianum* y *T. virens* (100 % de inhibición), con relación a *T. viride* logro inhibir el crecimiento de *M. phaseolina* en un 71.00 % a los 7 DDI del patógeno. En otro estudio realizado por [Elad et al., \(1986\)](#), concluyeron que cuatro cepas de *T. harzianum* Rifai inhibieron el crecimiento lineal y la producción de microesclerocios de *M. phaseolina in vitro*. El crecimiento lineal de *M. phaseolina*, fue significativamente reducida del 37.4 al 83.0 %.



f	g	h	i	j
---	---	---	---	---

Figura 4. Efecto de los metabolitos difusibles producido por las cepas de *Trichoderma* contra los aislados *M. phaseolina* mediante el método del papel celofán: Arriba MpMx₁ y abajo MpPy confrontado con a-f, TB2; b-g, MS19; c-h, MS15; d-i, CH1 y e-j; Control.

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. phaseolina*, por el efecto de cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de México y Paraguay en cultivo dual, metabolitos volátiles y difusibles.

Cepa	Porcentaje de Inhibición ¹					
	Cultivo dual		Metabolitos volátiles		Metabolitos difusibles	
	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy
TB2	57.75 ABC ²	63.75 A	14.00 B	50.75 A	100.00	100.00
MS19	54.50 ABC	60.75 AB	56.00 A	54.00 A	100.00	100.00
CH1	52.50 BC	50.75 BC	55.25 A	52.50 A	95.75	100.00
MS15	49.50 C	48.50 C	54.75 A	52.00 A	100.00	100.00
Media	47.78		43.79		89.25	
FC:						
Trich⁴	10.12 > 3.009*		22.98 > 3.009*		1.00 < 3.009NS	
Mp⁵	2.20 < 4.260 NS		13.45 > 4.260*		1.00 < 4.260NS	
Trich*Mp⁶	1.71 < 3.009 NS		22.25 > 3.009*		1.00 < 3.009NS	
CV	5.74		9.36		4.75	

¹Tiempo de observación 72 HDI.

²Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, p = 0.05)

⁴⁻⁵⁻⁶Trich: Cepas de *Trichoderma*, Mp: Aislados de *M. phaseolina* (MpMx₁, MpPy), Trich*Mp: Interacción entre las diferentes cepas de *Trichoderma* y los aislados de *M. phaseolina*.

Khaledi y Taheri, (2016) en un estudio realizado concluyeron que los aislados de *T. harzianum* fue el mejor para inhibir el crecimiento de *M. phaseolina* en condiciones *in vitro* utilizando tanto la pruebas de cultivo dual como las pruebas de volátiles y no volátiles.

No hubo una estrecha relación entre la TC de *Trichoderma* y su potencial para inhibir el micelio, considerando que de las 3 cepas con mayor TC solo la cepa paraguaya MS19 mostro mayor capacidad para inhibir el crecimiento tanto por cultivo dual como por metabolitos volátiles y difusibles, por otra parte, la cepa mexicana de menor tasa de crecimiento (TB2) presento mayor capacidad antagónica por cultivo dual y metabolitos difusibles que la que presento mayor TC, sin embargo no tuvo buena capacidad para producir metabolitos volátiles para inhibir el crecimiento de *M. phaseolina*.

Resultados de muchos años de investigación con especies del género *Trichoderma* como agentes de control biológico han demostrado que no todos los mecanismos y las características consideradas necesarias para un óptimo control biológico se encuentran en un mismo organismo (Howell, 2003).

VI. CONCLUSIONES

De las 14 cepas evaluadas de *Trichoderma* spp. (aislados de México y Paraguay), 3 de ellas (TT, MOR2: cepas Mexicanas y MS19: cepa Paraguaya) desarrollaron la mayor TC *in vitro*.

Con respecto a la TC de los 3 aislados de *M. phaseolina* proveniente de México, la MpMx₁ (aislado de San Luís) presento la mayor TC con respecto a MpMx₂ y MpMx₃, por lo que fue seleccionada para ser evaluados en las pruebas de antagonismo por cultivo dual, metabolitos volátiles y difusibles.

En el primer ensayo fueron confrontadas las diferentes cepas de *Trichoderma* contra *M. phaseolina* de cada país (México y Paraguay), fueron seleccionadas las cepas Mexicanas TB2 y CH1 y las cepas Paraguayas MS19 y MS15 para un segundo ensayo *in vitro*, ya que mostraron mayor poder para inhibir el crecimiento micelial del patógeno.

Durante el segundo ensayo, en cultivo dual las cepas TB2 y MS19 mostraron la mayor capacidad antagónica al inhibir el micelio de ambos aislados MpMx₁ y MpPy. En cuanto a metabolitos volátiles, la cepa MS19 mostro mayor capacidad para inhibir el micelio de MpMx₁ y MpPy, mientras que la cepa TB2 mostró menor capacidad para producir metabolitos volátiles contra los aislados patogénicos. Todas las cepas de *Trichoderma* spp. logro inhibir el crecimiento del patógeno en un 95.75 al 100 % por efecto de los metabolitos difusibles liberados. Las cepas que presentaron el mayor porcentaje de inhibición micelial en ambos aislados de *M. phaseolina* fue TB2, MS19 y MS15, con respecto a la cepa CH1 tuvo gran capacidad de inhibición con el aislado MpPy no así con el MpMx₁.

.

VII. LITERATURA CITADA

Adekunle, AT; Ikotun, T; Florini, D A; Cardwell, K F. 2006. Field evaluation of selected formulations of *Trichoderma* species as seed treatment to control damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 419.

Aly, AA; Abdel-Sattar, MA; Omar, MR; Abd-Elsalam, KA. 2007. Differential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*, 47(2), 91-102.

Anand, S; Reddy, J. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma* sp. against plant pathogens. *International Journal of Agriculture Sciences*, 1(2), 30.

Asran-Amal, A; Moustafa-Mahmoud, SM; Sabet, KK; El Banna, OH. 2010. *In vitro* antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. *Saudi journal of biological sciences*, 17(2), 153-157.

Bankole, SA; Adebajo, A. 1996. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. *Crop protection*, 15(7), 633-636.

Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

Dennis, C; Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II, production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-47.

Dhingra, O. D., and J. B. Sinclair. 1985. Basic plant pathology methods. 2nd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Dubey, RC; Kumar, H; Pandey, RR. 2009. Fungitoxic effect of neem extracts on growth and sclerotial survival of *Macrophomina phaseolina* in vitro. *Journal of American Science*, 5(5), 17-24.

Elad, Y; Zvieli, Y; Chet, I. 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. *Crop protection*, 5(4), 288-292.

Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*, 19(8), 709-714.

Etebarian, HR. 2010. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 8, 243-250.

Gajera, HP; Bambharolia, RP; Patel, SV; Khatrani, TJ; Goalkiya, BA. 2013. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3(149), 2.

Ganesan, S; Ganesh, R; Sekar, R. 2007. Integrated Management of Stem Rot Disease (*Sclerotium rolfsii*) of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC - 4572). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31 (2), 103-108.

Guigón-López, C; Guerrero-Prieto, V; Vargas-Albores, F; Carvajal-Millán, E; Ávila-Quezada, GD; Bravo-Luna, L; Ruocco, M; Lanzuise, S; Woo, S; Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento

in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28 (2), 87-96.

Hajieghrari, B; Mousa, TG; Mohammad, RM; Mahdi, D. 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.

Hermosa, MR; Grondona, I; Iturriaga, ET; Diaz-Minguez, JM; Castro, C; Monte, E; Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.

Howell, CR. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Iqbal, U; Mukhtar, T. 2014. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. *The Scientific World Journal*, ID 950175, p. 9.

Jana, T; Sharma, TR; Prasad, RD; Arora, DK. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological research*, 158(3), 249-257.

Khaledi, N; Taheri, P. 2016. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*, 56(1), 21-31.

Khalili, E; Javed, MA; Huyop, F; Rayatpanah, S; Jamshidi, S; Wahab, RA. 2016. Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(3), 479-488.

Krause, MS; Madden, LV; Hoitink, HA. 2001. Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of *Rhizoctonia* damping-off of radish and *Rhizoctonia* crown and root rot of poinsettia. *Phytopathology*, 91(11), 1116-1123.

Kredics, L; Manczinger, L; Antal, Z; Péntzes, Z; Szekeres, A; Kevei, F; Nagy, E. 2004. *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 491-498.

Larralde-Corona, CP; Santiago-Mena, MR; Sifuentes-Rincón, AM; Rodríguez-Luna, IC; Rodríguez-Pérez, MA; Shirai, K; Narváez-Zapata, JA. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80(1), 167-177.

Leyva-Mir, SG; Velázquez-Martínez, GC; Tlapal-Bolaños, B; Alvarado-Gómez, OG; Tovar-Pedraza, JM; Hernandez-Arenas, M. 2015. First report of charcoal rot of sugarcane caused by *Macrophomina phaseolina* in Mexico. *Plant Disease*, 99(4).

Lundberg, A; Unestam, T. 1980. Antagonism against *Fomes annosus*. Comparison between different test methods *in vitro* and *in vivo*. *Mycopathologia*. 70(2), 107-115.

Mahdizadeh, V; Safaie, N; Goltapeh, EM. 2011. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. *The Plant Pathology Journal*, 27(2), 128-137.

Rajendiran, R; Jegadeeshkumar, D; Sureshkumar, BT; Nisha, T. 2010. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post-harvest pathogens. *Journal of Agricultural Technology*, 6(1), 31-35.

Sánchez, S; Gambardella, M; Henríquez, JL; Díaz, I. 2013. First report of crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. *Plant Disease*, 97(7), 996.

Shekhar, M; Kumar, S. 2010. Potential biocontrol agents for the management of *Macrophomina phaseolina*, incitant of charcoal rot in maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(4), 379-383.

Sreedevi, B; Devi, MC; Saigopal, DVR. 2011. Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *International Journal of Agricultural Technology*, 7(3), 623-635.

Singh, N; Pandey, P; Dubey, RC; Maheshwari, DK. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679.

Su, G; Suh, SO; Schneider, RW; Russin, JS. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126.

Uzunovic, A; Webber, JF. 1998. Comparison of bluestain fungi grown *in vitro* and in freshly cut pine billets. *European Journal of Forest Pathology*, 28(5), 323-334.

Vey, A; Hoagland, RE; Butt, TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: "Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential" (Butt, TM; Jackson, C; Magan, N). *Centre for Agricultural Bioscience International*, Bristol, UK, 311-346.

Weems, JD; Ebelhar, SA; Chapara, V; Pedersen, DK; Zhang, GR; Bradley, CA. 2011. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on sunflower in Illinois. *Plant Disease*, 95(10).

Zadoks, JC; Schein, RD. 1979. Epidemiology and Plant Disease Management. *Oxford University Press*. New York, USA. 427 p.

**CAPÍTULO IV. TRATAMIENTO DE SEMILLA CON AISLADOS NATIVOS
DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE DAMPING OFF CAUSADA
POR *Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goidanich, EN SOYA [*Glycine max* (L.)
Merr.]**

Fernández-Gamarra, MA¹; Ramírez-Alarcón, S¹; Acosta-Ramos, M¹; Quintana-de
Viedma, L²; Maidana-Ojeda, M²; Fuentes-Aragón, D¹

¹Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo,

²Profesor-Investigador Fitopatología, Universidad Nacional de Itapúa.

Resumen

La podredumbre carbonosa de la soya, causada por *Macrophomina phaseolina*, es una enfermedad de importancia económica que ocasiona graves daños al cultivo especialmente en periodos prolongados de sequía y altas temperaturas, presentes en todas las zonas productoras del mundo. Semillas de soya tratadas con cuatro cepas nativas de *Trichoderma* (TB2, CH1, MS15 y MS19), 1 producto biológico comercial (*Trichoderma* spp.) y 1 producto químico (metil tiofanato + pyraclostrobin) se sembraron en macetas con suelo inoculado con *M. phaseolina* y se evaluó el porcentaje de emergencia de las semillas a los 7, 14, 21 después de la siembra (DDS), incidencia de la enfermedad a los 45 DDS, longitud de tallo y raíz, peso seco y severidad. Para ambos aislados de *M. phaseolina* (MpMx₁ y MpPy), el tratamiento de semilla con metil tiofanato + pyraclostrobin y *Trichoderma* spp. mostro tener un efecto mayor sobre todas las variables evaluadas en comparación con el control. Resultados arrojaron un mayor porcentaje de emergencia a los 7 DDS con un 94.00 - 84.75 %, reducción en la incidencia de la enfermedad de 37.75 - 22.00 %, longitud de tallo de 23.40 - 26.10 cm, longitud de raíz de 26.80 - 27.90 cm, peso seco de 1.01 - 1.20 g.planta⁻¹ y una severidad de 10.00 - 8.00 % para el metil tiofanato + pyraclostrobin y con un 87.75 - 78.75 % de emergencia a los 7 DDI, 50.25 - 34.75 % de incidencia, 23.30 - 24.20 cm de longitud de tallo, 26.70 - 24.30 cm de longitud de raíz, con un 1.00 - 1.10 g.planta⁻¹ de peso seco y una severidad del 13.00 – 10.00 % para *Trichoderma* spp.

Palabras claves: *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *Trichoderma* spp. Metil tiofanato + Pyraclostrobin, *Macrophomina phaseolina*, Pudrición carbonosa de la soya, Control

I. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas agrícolas y silvestres pueden interactuar a través de patógenos comunes tales como *M. phaseolina*, un hongo clonal generalista con más de 284 plantas hospederas que posiblemente con el correr del tiempo sea de mucha más importancia en los diferentes escenarios climáticos de aumento de calor y estrés por sequía (Saleh *et al.*, 2010).

M. phaseolina es un importante patógeno del suelo en el cultivo de soya que infecta las plantas en una amplia gama de temperaturas (± 30 °C) y es considerablemente influenciada por las condiciones del agua en el suelo; puede aparecer en cualquier etapa del crecimiento de las plantas afectando a las semillas, plántulas y plantas adultas; una vez que penetra la raíz, el hongo se mueve en el tejido cortical intercelular y luego intracelular para finalmente invadir el sistema vascular (Ammon *et al.*, 1974; Sinclair, 1989; Olaya y Abawi, 1996; Kendig *et al.*, 2000; Simonetti *et al.*, 2015).

El manejo de las enfermedades incluye el uso de métodos químicos, variedades resistentes y tratamientos biológicos. Una combinación de estos métodos de control, reducirá el riesgo de acumulación de residuos en la cadena alimentaria además de reducir la posibilidad de resistencia patogénica a los fungicidas (Adekunle *et al.*, 2006).

El tratamiento de semillas con agentes de control biológico ha sido exitoso en la prevención de muchas enfermedades de plantas causada por hongos (Anis *et al.*, 2010).

Especies de *Trichoderma* spp, son simbioses de plantas endófitas ampliamente utilizado en la agricultura (Mastouri *et al.*, 2010), para el control de un gran número de patógenos de las plantas transmitido por el suelo y de importancia económica, incluyendo *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* y *M. phaseolina* (Elad *et al.*, 1980; Hadar *et al.*, 1984; Sivan *et al.*, 1987; Hussain *et al.*, 1990).

Muchos estudios han demostrado la efectividad del tratamiento de semillas con *Trichoderma* spp. para el control de patógenos de suelo (Howell *et al.*, 2000; Burns y Benson, 2000; Howell, 2002), mejorando significativamente la germinación de las

semillas, el crecimiento y desarrollo de las raíces, la productividad de los cultivos, además induce la resistencia sistémica y/o cambios fisiológicos que activan los mecanismos de defensa de las plantas contra la pudrición de la raíz causada por *M. phaseolina* (Benítez *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2005; Harman, 2006; Govindappa *et al.*, 2010; Mastouri *et al.*, 2010).

Los mecanismos empleados para el control biológico de enfermedades de las plantas son muchos y muy complejos, y su uso varía con el tipo de agente de biocontrol, el patógeno, y la planta huésped implicados en la interacción (Howell, 2003).

II. OBJETIVOS

- Evaluar la efectividad de aislados nativos de *Trichoderma* spp. para el control de *M. phaseolina* bajo cámara de vegetación y compararlas con un producto biológico comercial y un producto químico.

III. HIPÓTESIS

- Las cepas de *Trichoderma* evaluadas fueron eficaces para el control de la pudrición carbonosa causada por *M. phaseolina*.
- El funguicida utilizado resulto ser más eficaz para el control de la enfermedad que las cepas de *Trichoderma* spp.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área de estudio

El ensayo *in vivo* fue realizado en la cámara de vegetación, perteneciente al Departamento de Fitopatología del Campo Experimental Capitán Miranda del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Capitán Miranda, Paraguay.

4.2. Aislados de *Trichoderma* spp. y *Macrophomina phaseolina*

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. y *M. phaseolina* utilizados en el presente estudio fueron obtenidos de los resultados del cultivo dual *in vitro* (Capítulo III). Fueron utilizados 2 de las mejores cepas de *Trichoderma* por país (TB2, CH1, MS19 y MS15) y comparadas con un Producto Biológico Comercial y un Producto Químico.

4.3. Preparación de inóculo de *Trichoderma* spp.

Cuatro aislados de *Trichoderma*, *T. koningiopsis* (TB2 y CH1) y *T. asperellum* (MS19 y MS15) fueron multiplicados en placas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados a 28 °C por 6 días para la obtención de la biomasa (Singh *et al.*, 2008).

4.4. Preparación del inóculo de *M. phaseolina* en arroz

Para la preparación del inóculo de *M. phaseolina* se realizó una combinación de la metodología de Adekunle *et al.*, (2006) y Castellanos *et al.*, (2013); semillas de arroz blanco (50 g de semillas de arroz) fue depositado en placas Petri de 15 cm de diámetro y lavado una vez con agua destilada. Posteriormente se agregó 50 ml de agua destilada estéril (1g de semillas de arroz: 1 ml de agua) y fueron envueltas, primero con papel aluminio y luego con papel kraft antes de autoclavar a una temperatura de 121 °C por 40 minutos. Se dejó enfriar y luego se volvió a autoclavar a la misma temperatura y tiempo. Después de un enfriamiento adicional, las placas fueron inoculadas con discos de 2 cm de micelio de 7 días de un cultivo de *M. phaseolina* y se incubaron a 30 °C

durante 15 días momento en el cual las semillas de arroz fueron colonizados por el patógeno.

Para su uso en cámara de vegetación, las semillas de arroz fueron picadas en trozos, los cuales, con la ayuda de un mortero, se maceraron suavemente y se dejaron secar sobre toallas de papel por 24 horas a temperatura ambiente. El inóculo fue almacenado a 4 °C hasta su uso.

4.5.Tratamiento de semilla

Se utilizaron semillas de soya que fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 1 minuto; posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel filtro estéril hasta secarse completamente (Leyva *et al.*, (2015).

Los conidios se rasparon de colonias de 9 a 14 días de edad, cultivadas en placas Petri sobre PDA. Las semilla fueron sumergidas en una suspensión de conidios de *Trichoderma* spp. de 10^8 conidios.mL⁻¹ (Hadar *et al.*, 1984). La concentración de conidios fue determinada mediante la utilización de la cámara de Neubauer (Jegathambigai *et al.*, 2009).

Las semillas fueron tratadas durante 30 minutos (Adekunle *et al.*, 2006) y sembradas 2 semillas por maceta.

4.6.Inoculación de suelo con el patógeno

Fueron preparadas macetas de 20 x 20 cm con suelo previamente esterilizado y depositadas en la cámara de vegetación.

Se introdujeron el equivalente de diez semillas en gramos (1g) de arroz colonizado por hoyo de plantación para inducir la infección por *M. phaseolina* (Adekunle *et al.*, 2006).

Las macetas se regaron cada 3 días durante 45 DDS para mantener constante la humedad.

4.7.Tratamiento y Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar en arreglo factorial 7 x 2 con cuatro repeticiones, 7 tratamientos incluido el testigo (4 cepas nativas de *Trichoderma* spp., 1 producto biológico comercial, 1 producto químico y el testigo) y 2 cepas de *M. phaseolina* (aislado de México y Paraguay). La unidad experimental consistió en 8 plantas por repetición (2 plantas por maceta).

Como control se tuvieron suelo infestado con *M. phaseolina* sembradas con semilla de soya no tratada (Mao *et al.*, 1997).

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para el control de los aislados de *M. phaseolina*.

Número	Tratamiento	Dosis aplicada
1	<i>T. koningiopsis</i> (TB2) ¹	10 ⁸
2	<i>T. koningiopsis</i> (CH1) ²	10 ⁸
3	<i>T. asperellum</i> (MS15) ³	10 ⁸
4	<i>T. asperellum</i> (MS19) ⁴	10 ⁸
5	<i>Trichoderma</i> spp. ⁵	600 gramos/5 litros de agua/ 1000 kg de semilla
6	Metil tiofanato + Pyraclostrobin ⁶	100 ml /100 kg de semilla
7	Control ⁷	----

¹⁻²⁻³⁻⁴Cepas nativas de *Trichoderma*, ⁵Producto biológico comercial, ⁶Producto químico y ⁷Suelo infestado con *M. phaseolina*.

El número de plantas (% de emergencia) por tratamiento fue registrado a los 7, 14 y 21 DDS (Adekunle *et al.*, 2006).

A los 45 DDS se registraron datos de incidencia, longitud de tallo (cm), longitud de raíz (cm), peso seco (g.planta⁻¹) (Aly *et al.*, 2007). La incidencia de la enfermedad se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula (Ullah *et al.*, 2011): Incidencia de la enfermedad = (Número de plantas infectadas / Número total de plantas) * 100.

Se evaluó la severidad de la raíz y el tallo en 10 plantas seleccionadas al azar por tratamiento (Figura 1). Las plantas fueron arrancadas con suavidad y cortadas

longitudinalmente para evaluar la intensidad de la decoloración así como la cantidad de microesclerocios que cubre el tejido vascular y cortical, utilizando una adaptación de la escala de [Mengistu et al., \(2007\)](#), con valores que van de 1 a 5, donde 1 = sin decoloración y 5 = muy decolorados.



Figura 1. Escala visual para evaluar la severidad en raíz y tallo de la pudrición carbonosa causada por *M. phaseolina*: **1** = Tejido sin microesclerocio visible; **2** = Tejido vascular sin decoloración con muy pocos microesclerocios visibles en la médula, tejido vascular o debajo de la epidermis; **3** = Tejido vascular parcialmente decolorado con microesclerocios cubriendo parcialmente el tejido; **4** = Tejido vascular decolorado con numerosos microesclerocios visible bajo la epidermis externa en las secciones de tallo y la raíz y **5** = Tejido vascular oscurecido debido al alto número de microesclerocios tanto dentro como fuera de los tejidos del tallo y la raíz.

El porcentaje de severidad se calculó mediante la fórmula propuesta por [Townsend y Heuberger, \(1943\)](#):
$$S (\%) = \frac{\sum (nv)}{NV} \times 100$$

Dónde: n = número de plantas evaluadas

V = valor de la categoría

V =valor de la categoría más alta

N =número total de plantas evaluadas

4.8.Análisis estadístico

Los datos expresados en porcentaje fueron transformados al arcoseno/raíz cuadrada antes de su análisis estadístico (ANOVA) ([Aly et al., 2007](#)). Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey (P = 0.05) utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.3.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Porcentaje de emergencia a partir de semillas de soya tratadas y sembradas en suelo inoculado con *M. phaseolina*

Los tratamientos tuvieron un efecto altamente significativo ($p = 0.01$) en el porcentaje de emergencia a los 7, 14 y 21 DDS, sin embargo, entre los aislados de *M. phaseolina* y la interacción entre los diferentes tratamientos y los aislados patogénicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2).

El mayor porcentaje de emergencia para MpMx₁ se observó a los 7 DDS del patógeno en el suelo con un 94.00 y 87.75 % para el metil tiofanato + pyraclostrobin y *Trichoderma* spp., manteniéndose constante a los 21 DDS para el primero y reduciéndose finalmente a un 78.25 % para el segundo, respectivamente, en comparación con el control que tuvo una emergencia del 59.50 % a los 7 DDS, lo que se redujo a un 53.25 % a los 21 DDS. Para el aislado MpPy, el mayor porcentaje de emergencia fue de 84.75 % para el metil tiofanato + pyraclostrobin a los 7 DDS, reduciéndose finalmente a los 21 DDS con un 81.50 %, en comparación con el control que tuvo un porcentaje de emergencia de 62.75 % a los 7 DDS.

Los tratamientos con las cepas nativas de *Trichoderma* (TB2, CH1, MS19 y MS15) mostraron los más bajos porcentajes de emergencia. A las 7 DDS, la emergencia de la planta oscilaba entre los 66.00 y 81.50 %, reduciéndose a un 62.50 y 75.25 % a los 21 DDS del patógeno. Entre los aislados de *Trichoderma* spp., el TB2 y MS19 resultó ser más efectivo con un 75.25 y 75.00 % de emergencia para los aislados MpMx₁ y MpPy a los 21 DDS.

Cuadro 2. Efecto del tratamiento de semilla en el porcentaje de emergencia en suelo infestado con *M. phaseolina*.

Tratamiento	Emergencia ¹					
	7 DDS		14 DDS		21 DDS	
	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy
TB2	81.50 AB ²	75.25 AB	78.50 AB	72.25 AB	75.25 AB	72.25 AB
CH1	68.75 AB	72.00 AB	68.75 AB	69.00 AB	62.50 B	69.00 AB
MS19	78.50 AB	78.50 AB	75.25 AB	78.50 AB	66.00 B	75.00 AB
MS15	69.00 AB	66.00 B	66.00 B	66.00 B	62.75 B	66.00 B
<i>Trichoderma</i> spp.	87.75 AB	78.75 AB	81.50 AB	78.75 AB	78.25 AB	75.50 AB
Metil tiofanato +	94.00 A	84.75 AB	94.00 A	84.75 AB	94.00 A	81.50 AB

Pyraclostobin Control	59.50	B	62.75	B	59.50	B	62.75	B	53.25	B	62.75	B
Media	75.46				73.93				71.00			
FC:												
Trat ³ :	4.83>3.27**				4.76 > 3.27**				4.72 > 3.27**			
Mp ⁴ :	1.35<4.07 N.S				0.42<4.07 N.S				0.02<4.07 N.S			
Trat*Mp ⁵ :	0.59<2.32 N.S				0.64<2.32 N.S				1.07<2.32 N.S			
CV	15.86				15.64				16.49			

¹Datos expresados en porcentaje fueron transformados al arcoseno/raíz cuadrada antes de su análisis estadístico. **Altamente significativo al $p \leq 0.01$. *Significativo al $p \leq 0.05$. N.S: No significativo. ²Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$). ³Trat: Tratamientos, ⁴Mp: Aislados de *M. phaseolina* (MpMx₁, MpPy), ⁵Trat*Mp: Interacción entre los diferentes tratamientos y los aislados de *M. phaseolina*.

Adekunle *et al.*, (2001), mencionaron que el mayor porcentaje de emergencia de plantas se sitúa a los 21 días después de la siembra con un 66 % para *T. koningii* y *T. harzianum*, y con un 51 % para *Trichoderma* sp., concluyendo que, las formulaciones de *T. harzianum* y *T. koningii* resultó en un mayor porcentaje de plantas emergidas que las semillas tratadas con *Trichoderma* spp. y los controles. Maheshwari *et al.*, (2001), evaluaron el efecto de *T. virens* (*Gliocladium virens*) como tratamiento de semillas de cacahuete, observando una emergencia de plántulas de 60 - 68 % a los 7 DDS. En otro estudio, Adekunle *et al.*, (2006), concluyeron que semillas tratados con suspensión de *T. harzianum* puede obtener un porcentaje de emergencia del 55 % a los 7 DDS, lo que finalmente se reduce en un 45.8 % a los 21 DDI debido a damping off en post emergencia.

M. phaseolina, es un hongo que penetra las raíces de las plantas de soya desde los 7 a 42 días y las plántulas infectadas pueden continuar desarrollándose muchas veces sin síntomas visibles de la enfermedad (Short *et al.*, 1978; Kendig *et al.*, 2000).

Cabe mencionar, que en todos los tratamientos se observó que las semillas que no lograron emerger se encontraban colonizados por el patógeno, plántulas infectadas mostraban muerte prematura a partir de los 7 a 14 DDS (damping off en post emergencia), a los 45 días en plantas muy infectadas se observaban que las hojas muertas permanecían unidas al peciolo, así como lo menciona Mengistu *et al.*, (2011) (Figura 2).



Figura 2. Efectividad del tratamiento de semilla para el control de *M. phaseolina*, agente causal de la pudrición carbonosa en el cultivo de soya.

5.2. Efecto de los tratamientos sobre la incidencia, longitud de tallo y raíz, peso seco y severidad de la pudrición carbonosa de la soya.

El análisis estadístico (Cuadro 3) mostró diferencias altamente significativas ($p = 0.01$) para el efecto de los tratamientos sobre todas las variables evaluadas. En cuanto a los aislados de *M. phaseolina* se observa diferencias altamente significativas ($p = 0.01$) para la variable incidencia y severidad, y significativa ($p = 0.05$) para la longitud del tallo (cm), no mostrando diferencias para las variables longitud de raíz (cm) y peso seco (g.planta^{-1}). En la interacción de los diferentes tratamientos por los aislados de *M. phaseolina* se observó diferencias altamente significativa ($p = 0.01$) para la variable severidad, mientras que para las demás variables evaluadas no mostro diferencias estadísticamente significativas.

Para el caso de la incidencia de la enfermedad causada por *M. phaseolina* a los 45 DDS, se observó una reducción de la incidencia causada por MpMx₁ del 37.75 % con el metil tiofanato + pyraclostrobin, seguido de *Trichoderma* spp. (50.25 %) y TB2 (56.50 %), en

comparación con el control que tuvo una incidencia del 81.50 %, de la misma forma, para el aislado de MpPy, la incidencia fue menor con el metil tiofanato + pyraclostrobin (22.00 %) seguido de *Trichoderma* spp. (34.75 %) y MS19 (38.00 %) en comparación con su control (72.25 %).

Con relación a la longitud del tallo y raíz de la soya, el tratamiento de semilla con el metil tiofanato + pyraclostrobin fue mejor (23.40 y 26.80 cm), seguido de *Trichoderma* spp. (23.30 y 26.70 cm) y TB2 (23.10 y 25.60 cm) para el aislado MpMx₁, de la misma manera, para el aislado MpPy, la mayor longitud del tallo y raíz se observó con el metil tiofanato + pyraclostrobin (26.10 y 27.90 cm), seguido de *Trichoderma* spp. (24.20 y 24.30 cm) y MS19 (24.00 y 23.70) en comparación con los controles (19.20 - 19.20 cm y 20.70 - 23.00 cm).

Así mismo, el peso seco de la planta fue mayor con el metil tiofanato + pyraclostrobin (1.01 g.planta⁻¹), seguido de *Trichoderma* spp. (1.00 g.planta⁻¹) y TB2 (0.92 g.planta⁻¹) para el aislado de MpMx₁. Con respecto al aislado de MpPy el mayor peso seco se registró para el metil tiofanato + pyraclostrobin (1.20 g.planta⁻¹), seguido de *Trichoderma* spp. (1.10 g.planta⁻¹) y MS19 (1.03 g.planta⁻¹) con relación a los controles (0.50 y 0.63 g.planta⁻¹).

El menor porcentaje de severidad se debe a los tratamientos con el metil tiofanato + pyraclostrobin (10.00 - 8.00 %), seguido de *Trichoderma* spp. (13.00 - 10.00 %), TB2 (14.00 %) y MS19 (10.00 %) para los aislados MpMx₁ y MpPy.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp, resultaron ser menos efectiva en comparación con el producto químico y el producto biológico comercial. Entre ellas, la más efectiva fueron el TB2 y MS19 para los aislados MpMx₁ y MpPy.

No existe reportes del uso de la mezcla del metil tiofanato + pyraclostrobin para el control de *Macrophomina phaseolina*, siendo recomendado en soya solo para el control de *Phomopsis phaseoli*, *Diaporthe phaseolorum*, *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Alternaria* spp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizotocnia* spp., *Penicillium* spp. El tratamiento de semillas con metil tiofanato (1.0 g.kg⁻¹ de semilla), carbendazim 50 %, mancozeb

75 % y jkstein (2.0 g.kg^{-1} semilla) fue eficaz en la eliminación del patógeno a partir de semillas infectadas de soya con *M. phaseolina* (Singh y Kumar, 2002). Aplicación de lactofen en la etapa de crecimiento R1 y azoxistrobin ya sea en la siembra, R3, R6 no tuvo un impacto significativo sobre la severidad de la pudrición carbonosa (Cross *et al.*, 2012). Shumaila y Khan (2016) llevaron a cabo un experimento para determinar el efecto del tratamiento de semillas con carbendazim, captan, tiram, mancozeb y carboxim + thiram contra la pudrición de la raíz del frijol mungo (*Vigna radiata*) causada por *Macrophomina phaseolina* en macetas, los resultados demostraron que todos los fungicidas redujeron la severidad de la enfermedad además de mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas infectadas en mayor o menor medida.

Elad *et al.*, (1986) en un primer informe realizado sobre el control biológico de *M. phaseolina*, mencionaron que tratando la semilla de melón con *T. harzianum* se conseguía reducir la incidencia de la enfermedad en un 46.3 %, 37.5 % y 41.2 % a los 34, 38 y 46 días después de la siembra. Por su parte, Ullah *et al.*, (2011), evaluaron cuatro agentes de control biológico (*A. flavus*, *A. niger*, *T. viride* y *P. capsulatum*) para tratamiento de semillas en girasol, las cuales fueron sembradas en macetas con suelo infestado con *M. phaseolina*. La incidencia de la enfermedad fue significativamente reducida en comparación con el control en los que las semillas no se recubrieron con el antagonista, con una reducción del 100 % para *A. flavus*, seguido de *A. niger* con un 64.86 %, *P. capsulatum* con un 63.79 % y *T. viride* con un 31.89 %. Aplicación preventiva de *T. asperellum* por inmersión de raíz redujo la incidencia de la pudrición carbonosa (hasta un 44 % en una cámara de crecimiento y hasta un 65 % en condiciones de campo) (Pastrana *et al.*, 2016).

Semillas de garbanzo C.V. JG-62 tratadas con carbendazim, *Trichoderma viride* y enmiendas orgánicas arrojaron los siguientes resultados; para carbendazim, germinación de la semilla (90.0 %) menos incidencia de la enfermedad (14.0 %) y el máximo control de la enfermedad (86.0 %), *Trichoderma viride* se registró más alta germinación de la semilla (92.0 %), incidencia de la enfermedad menor (31.1 %), y el máximo control de la enfermedad (68.8 %) y las enmiendas orgánicas con torta de neem se encontró que era significativamente mayor la germinación y dio como resultado un mayor porcentaje de control de la enfermedad (Sayyad *et al.*, 2015).

Algunos primeros trabajos demostraron que *Trichoderma* también promueve respuestas de crecimiento en algunos otros cultivos como frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), rábano (*Raphanus sativus*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Sharma *et al.*, 2012), otros estudios han informado que *Trichoderma harzianum* sensu lato, *T. asperellum* y *T. asperelloides* son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de las raíces que ayudan en la absorción de nutrientes y la defensa inmune de las plantas (Harman *et al.*, 2004).

Rojan *et al.*, (2010) en un ensayo realizado con *Trichoderma* para el control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* y *Pythium arrhenomanes* en soya, concluyeron que el sistema de raíces y tallo, la nodulación y peso seco mejora en la soya tratada directamente con *Trichoderma*, además de ayudar en la actividad fotosintética de las plantas, existe una mayor fijación biológica de nitrógeno. Del mismo modo, se encontró que la colonización de raíces de *Lotus japonicus* por *Trichoderma koningi* produjo fitoalexinas isoflavonoides vestitol (una importante respuesta defensiva de las leguminosas) y el aumento de peso en seco de plantas (126 %) (Masunaka *et al.*, 2011). Promoción del crecimiento de la planta como la longitud de raíz y tallo eran significativamente mayor en el caso de las semillas tratadas de Chile con *T. harzianum* (Joshi *et al.*, 2010). Así mismo, colonización de raíz de trigo por *Trichoderma harzianum* ocasiono un aumento en el crecimiento de las plantas y el rendimiento del cultivo (Sharma *et al.*, 2012). Raíz de maíz colonizado con *T. harzianum* (T-22) induce aproximadamente el doble de intercepciones profundas de raíz (25 - 75 cm) por debajo de la superficie del suelo, dando lugar a una mayor tolerancia a la sequía, resistencia y probablemente a los suelos compactados (Harman, 2000).

En el cuadro 3 se presenta el efecto del tratamiento de semilla sobre algunas variables de la enfermedad causada por *M. phaseolina* en el cultivo de soya bajo cámara de vegetación.

Cuadro 3. Efecto del tratamiento de semilla sobre algunas variables de la enfermedad en el cultivo de soya bajo cámara de vegetación.

Tratamiento	Incidencia (45 DDS) ¹		Longitud de tallo (cm)		Longitud de raíz (cm)		Peso seco (g.planta ⁻¹)		Severidad (%)	
	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy	MpMx ₁	MpPy
TB2	56.50 ABC	44.00 ABC	23.10 ABC	23.50 ABC	25.60 AB	23.00 AB	0.92 ABC	0.88 ABC	14.00 DEF	11.00 DEF
CH1	66.00 ABC	44.00 ABC	21.90 ABC	23.30 ABC	24.80 AB	23.60 AB	0.79 ABC	0.97 ABC	18.00 CDE	11.00DEF
MS19	62.50 ABC	38.00 BC	22.20 ABC	24.00 ABC	25.10 AB	23.70 AB	0.91 ABC	1.03 ABC	18.60 CD	10.00 EF
MS15	72.00 AB	47.25 ABC	21.30 ABC	22.70 ABC	19.70 C	23.00 AB	0.64 BC	0.81 ABC	26.00 BC	12.00 DEF
<i>Trichoderma</i> spp.	50.25 ABC	34.75 BC	23.30 ABC	24.20 AB	26.70 AB	24.30 AB	1.00 ABC	1.10 AB	13.00 DEF	10.00 EF
Metil tiofanato + Pyraclostobin	37.75 BC	22.00 C	23.40 ABC	26.10 A	26.80 AB	27.90 A	1.01 ABC	1.20 A	10.00 EF	8.00 F
Control	81.50 A	72.25 AB	19.20 C	20.70 BC	19.20 C	23.00 AB	0.50 C	0.63 BC	44.00 A	28.00 B
Media FC:	52.05		22.78		24.03		0.88		17.19	
Trat3:	6.65> 3.27**		4.49>2.95**		3.54>2.95**		5.85>2.95**		59.59>2.95**	
Mp4:	17.00> 7.28**		7.09>3.92*		0.01<3.92 N.S		4.32>3.92 N.S		74.51>6.84**	
Trat*Mp5:	0.30< 3.27 N.S		0.25<2.17 N.S		1.28<2.17 N.S		0.25<2.17 N.S		5.64>2.95**	
CV	22.67		14.07		21.83		39.22		31.45	

¹Datos expresados en porcentaje fueron transformados al arcoseno/raíz cuadrada antes de su análisis estadístico. **Significativo al p = 0.01; *Significativo al p = 0.05 y N.S: No significativo al p = 0.05. ²Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, p = 0.05). ³Trat: Tratamientos, ⁴Mp: Aislados de *M. phaseolina* (MpMx1, MpPy). ⁵Trat*Mp: Interacción entre los diferentes tratamientos y los aislados de *M. phaseolina* (MpMx1, M

Es de importancia mencionar, que en la mayoría de los tratamientos no se observó microesclerocios visibles en el tejido vascular, sin embargo, si se observó en la superficie del tallo, por lo que nos hace suponer que no llegó a penetrar la raíz (Figura 3).

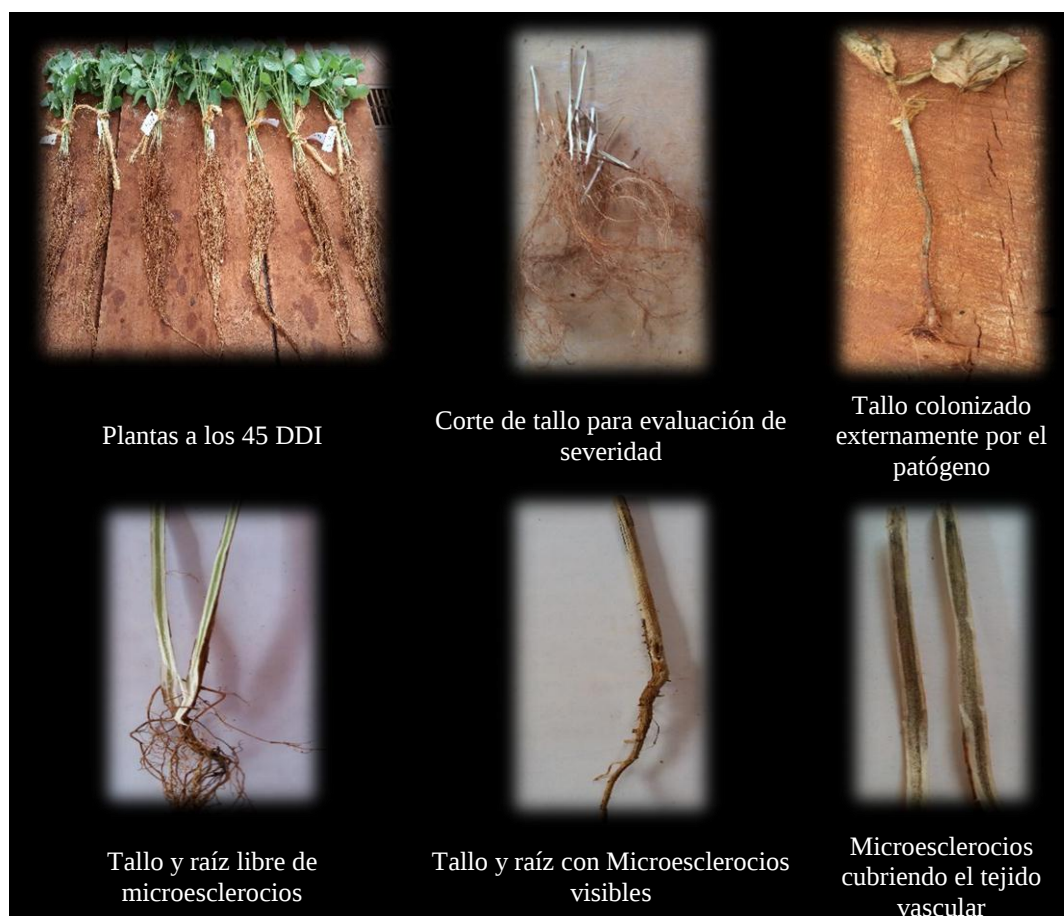


Figura 3. Evaluación del grado de severidad de la pudrición carbonosa de la soya causada por *M. phaseolina*.

Vyas, (1994) llegó a la conclusión de que los métodos de control biológicos y químicos pueden ser integrados para controlar la pudrición de la raíz de soya.

VI. CONCLUSIONES

El mayor porcentaje de emergencia se obtuvo con el tratamiento de semilla con metil tiofanato + pyraclostrobin a los 7 DDS con un rango de 94.00 - 84.75 % seguido de *Trichoderma* spp. con un rango 87.75 – 78.75 % de emergencia.

La incidencia de la enfermedad para ambos aislados de *M. phaseolina* se redujo con el metil tiofanato + pyraclostrobin con un 37.75 - 22.00 % seguido de *Trichoderma* spp. con un 50.25 - 34.75 %.

El metil tiofanato + pyraclostrobin y *Trichoderma* spp. resultaron ser más efectivos para ambos aislados de *M. phaseolina*, con una longitud de tallo de 23.40 - 26.10 cm, longitud de raíz de 26.80 - 27.90 cm, peso seco de 1.01 -1.20 g.planta⁻¹ y severidad de 10.00 - 8.00 % para el metil tiofanato + pyraclostrobin y con un 23.30 - 24.20 cm de longitud de tallo, 26.70 - 24.30 cm de longitud de raíz, con 1.00 - 1.10 g.planta⁻¹ de peso seco y 13.00 – 10.00 % de severidad para *Trichoderma* spp.

El producto químico y el producto biológico comercial resultaron ser más efectivo para el control de la pudrición carbonosa de la soya causada por *M. phaseolina*.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. resultó ser menos efectivo para el control del patógeno bajo cámara de vegetación en relación al producto químico y biológico, probablemente debido a muchos factores como el tiempo de exposición, temperatura, humedad relativa, entre otros.

VII. LITERATURA CITADA

Adekunle, AT; Cardwell, KF; Florini, DA; Ikotun, T. 2001. Seed treatment with *Trichoderma* species for control of damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biocontrol Science and Technology*, 11(4), 449-457.

Adekunle, AT; Ikotun, T; Florini, DA; Cardwell, KF. 2006. Field evaluation of selected formulations of *Trichoderma* species as seed treatment to control damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 419-424.

Aly, AA; Abdel-Sattar, MA; Omar, MR; Abd-Elsalam, KA. 2007. Differential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*, 47(2), 91-102.

Ammon, V; Wyllie, TD; Brown, MF. 1974. An ultrastructural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Physiological Plant Pathology*, 4(1), 1-4.

Anis, M; Abbasi, MW; Zaki, MJ. 2010. Bioefficacy of microbial antagonists against *Macrophomina phaseolina* on sunflower. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2935-29.

Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

Burns, JR; Benson, DM. 2000. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Plant Disease*. 84(6), 644-648.

Castellanos, G; Jara, C; Mosquera, G. 2013. Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos de Fríjol. Guía Práctica 5: *Macrophomina phaseolina*. Enfermedad:

Macrophomina, pudrición gris (*en línea*). Publicación CIAT No. 375. Consultado 15 junio 2015. Disponible en http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/04/guia_practica5.pdf

Cross, C; Wrather, A; Fothergill, K; Shannon, G; Li, S; Shumway, C; Rupe, J. 2012. Effect of lactofen, azoxystrobin, and genotypes on charcoal rot, *Phomopsis* seed decay, and pod and stem blight in soybean. *Plant Disease*, 96(8), 1154-1158.

Elad, Y; Chet, I; Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70(2), 119-121.

Elad, Y; Zvieli, Y; Chet, I. 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. *Crop protection*, 5(4), 288-292.

Govindappa, M; Lokesh, S; Rai, VR; Naik, VR; Raju, SG. 2010. Induction of systemic resistance and management of safflower *Macrophomina phaseolina* root-rot disease by biocontrol agents. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(1), 26-40.

Hadar, Y; Harman, GE; Taylor, AG. 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 74(1), 106-110.

Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84, 377–393.

Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Harman, GE. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.

Howell, CR; Hanson, LE; Stipanovic, RD; Puckhaber, LS. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252.

Howell, CR. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 92(2), 177-180.

Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10.

Hussain, S; Ghaffar, A; Aslam, M. 1990. Biological control of *Macrophomina phaseolina* charcoal rot of sunflower and mung bean. *Journal of Phytopathology*, 130(2), 157-160.

Jegathambigai, V; Wilson, R; Wijesundera, L. 2009. *Trichoderma* as a Seed Treatment to Control *Helminthosporium* Leaf Spot Disease of *Chrysalidocarpus lutescens*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(6), 720-728.

Joshi, BB; Bhatt, RP; Bahukhandi, D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmental Biology*, 31(6), 921-928.

Kendig, SR; Rupe, JC; Scott, HD. 2000. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plant Disease*, 84(8), 895-900.

Leyva-Mir, SG; Velázquez-Martínez, GC; Tlapal-Bolaños, B; Alvarado-Gómez, OG; Tovar-Pedraza, JM; Hernández-Arenas, M. 2015. First Report of Charcoal Rot of Sugarcane Caused by *Macrophomina phaseolina* in Mexico. *Plant Disease*. 99(4), 553.

Maheshwari, DK; Dubey, RC; Sharma, VK. 2001. Biocontrol Effects of *Trichoderma virens* son *Macrophomina phaseolina* Causing Charcoal Rot of Peanut. *Indian Journal Microbiology*, 41(4), 251-256.

Masunaka, A; Hyakumachi, M; Takenaka, S. 2011. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and environments*, 26(2), 128-134.

Mastouri, F; Björkman, T; Harman, GE. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221.

Mengistu, A; Ray, JD; Smith, JR; Paris, RL. 2007. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science*, 47(6), 2453-2461.

Mengistu, A; Smith, JR; Ray, JD; Bellaloui, N. 2011. Seasonal progress of charcoal rot and its impact on soybean productivity. *Plant disease*, 95(9), 1159-1166.

Mao, W; Lewis, JA; Hebbar, PK; Lumsden, RD. 1997. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis.* 81(5), 450-454.

Olaya, G; Abawi, GS. 1996. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 80(12), 1347-1350.

Pastrana, AM; Basallote-Ureba, MJ; Aguado, A; Akdi, K; Capote, N. 2016. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 109.

Rojan, PJ; Tyagi, RD; Prévost, D; Brar, SK; Pouleur, S; Surampalli, RY. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29(12), 1452-1459.

Saleh, AA; Ahmed, HU; Todd, TC; Travers, SE; Zeller, KA; Leslie, JF; Garrett, KA. 2010. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. *Molecular Ecology*, 19(1), 79-91.

Sayyad, SI; Mogle, TR; Sonkamble, MM. 2015. Effect of fungicides, bio-agents and organic amendments against *Macrophomina phaseolina* in Chick pea. *Annals of Plant Protection Sciences*, 23(2), 355-357.

Sinclair, JB. 1989. Compendium of Soybean Diseases. APS Press, St. Paul, MN.

Singh, J; Kumar, K. 2002. Location, Survival, Transmission and Control of Seedborne, *Macrophomina phaseolina* Causing Dry Root Rot and Leaf Blight in Urdbean. *Annals of Plant Protection Sciences*, 10(1), 111-113.

Singh, N; Pandey, P; Dubey, RC; Maheshwari, DK. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679.

Simonetti, E; Viso, NP; Montecchia, M; Zilli, C; Balestrasse, K; Carmona, M. 2015. Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. *Microbiological research*, 180, 40-48.

Sivan, A; Ucko, O; Chet, I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant disease*, 71(7), 587-592.

Sharma, P; Patel, AN; Saini, MK; Deep, S. 2012. Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal of Agricultural Science*, 4(8), 65.

Shoresh, M; Yedidia, I; Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95(1), 76-84.

Short, GE; Wyllie, TD; Ammon, VD. 1978. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. *Phytopathology*, 68(5), 736-741.

Shumaila, S; Khan, MR. 2016. Management of root-rot of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* through seed treatment with fungicides. *Indian Phytopathology*, 69(2), 128-136.

Townsend, GR; Heuberger JW. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*, 27(17), 340-343.

Ullah, MH; Khan, MA; Sahi, ST; Habib, A. 2011. Evaluation of antagonistic fungi against charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5(8), 616-621.

Vyas, SC. 1994. Integrated biological and chemical control of dry root rot on soybean. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 24(2), 132-134.