

Caracterización funcional de hongos aislados de suelo por su capacidad antagónica contra *Macrophomina phaseolina*

Functional characterization of fungi isolated from soil by their antagonistic capacity against *Macrophomina phaseolina*

Isidro Humberto Almeyda-León^{1*}, Raúl Rodríguez-Guerra¹, J. Isabel López-Arroyo¹, Raúl Asael Rodríguez-Villarreal², Efrén Ricardo Robledo-Leal², Luis Fernando Armijo-Martínez²

¹Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carr. Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México. ²Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66450 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Resumen

Hongos aislados de suelos cultivados con sorgo, soya, melón y chile, así como de suelos nativos no cultivados cercanos a las parcelas cultivadas, se caracterizaron funcionalmente por su actividad antagónica para inhibir el crecimiento de *Macrophomina phaseolina*, causante de la enfermedad conocida como pudrición carbonosa de plantas cultivadas. De un total de 312 aislados obtenidos entre ambos tipos de suelo, se identificaron 212 morfotipos, 195 fueron distintos y 17 comunes para ambos tipos de suelo. La cantidad de morfotipos identificados fue similar tanto en suelos cultivados como en suelos nativos cercanos (105 y 107, respectivamente). La diversidad de morfotipos en cada suelo fue relativamente elevada considerando que valores cercanos a cero del índice de diversidad de Shannon y Wiener implican baja diversidad. Ciento sesenta y siete morfotipos fueron evaluados en un escrutinio sin repeticiones contra cepas del patógeno aisladas de soya, melón, chile y frijol. Quince morfotipos que mostraron más del 70 % de inhibición se evaluaron por confrontación dual contra una cepa de *Macrophomina* aislada de sorgo, bajo un diseño experimental. Tres morfotipos causaron una inhibición del crecimiento de la cepa del fitopatógeno del sorgo mayor al 60%. De estos morfotipos dos fueron

Abstract

Fungi isolated from soils cultivated with sorghum, soybeans, cantaloupe and chilli, as well as from non-cultivated native soils close to the cultivated plots, were functionally characterized by their antagonistic activity to inhibit the growth of *Macrophomina phaseolina*, which causes the disease known as charcoal rot of cultivated plants. From the total of 312 isolates obtained between both types of soil, 212 morphotypes were identified, 195 were different and 17 were common for both types of soil. The amount of morphotypes identified was similar both in cultivated soils and in nearby native soils (105 and 107, respectively). The diversity of morphotypes in each soil was relatively high considering that values close to zero of the Shannon and Wiener diversity index imply low diversity. One hundred and sixty-seven morphotypes were evaluated in a scrutiny test without repetitions against strains of the pathogen isolated from soybean, cantaloupe, chilli and bean. Fifteen morphotypes that showed more than 70% inhibition were evaluated by dual confrontation against a *Macrophomina* strain isolated from sorghum, under an experimental design. Three morphotypes caused a growth inhibition of the sorghum phytopathogen strain greater than 60%. Two of these morphotypes were identified at the genus

identificados al nivel de género como *Aspergillus* y uno como *Penicillium*. Este estudio muestra la ocurrencia de cepas de hongos con importante actividad funcional antagonista contra *Macrophomina phaseolina*.

Palabras Clave: Morfotipos, Diversidad, Antagonismo, *Aspergillus*, *Penicillium*.

***Autor de correspondencia:**
almeida.isidro@inifap.gob.mx

Introducción

Los microorganismos presentes en suelos están sujetos a interacciones complejas con otros microorganismos, raíces de plantas, la composición física y química del suelo, entre otros factores. Esta diversidad microbiana es modificada por las características edáficas, tipo de vegetación y el tipo de uso del suelo (Garbeva *et al.*, 2004). En áreas cultivadas, esta diversidad se ve modificada por las prácticas a las que están sujetas las especies de plantas (Steenwerth *et al.*, 2002), tales como la fertilización química (Ullah *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017) y labores al suelo (Lu *et al.*, 2108; Essel *et al.*, 2019). Además, en estas áreas las plantas cultivadas pueden asociarse a microorganismos nativos del suelo que ayudan a enfrentar el daño por microorganismos fitopatógenos (Mallikarjuna y Jayapal, 2015). El hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, infecta a más de 500 especies de plantas a las que comúnmente les causa la enfermedad conocida como pudrición carbonosa (Kaur *et al.*, 2012). Su control se basa principalmente en el uso de fungicidas (Cohen *et al.*, 2016) y en la selección de genotipos resistentes (Ambrosio *et al.*, 2015). Sin embargo, investigaciones sobre el uso de hongos como agentes de biocontrol se han realizado (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019; Gajera *et al.*, 2012). En el noreste de México se cultivan especies de plantas susceptibles a *M. phaseolina* como sorgo,

level as *Aspergillus* and one as *Penicillium*. This study shows the occurrence of fungal strains with significant antagonistic functional activity against *Macrophomina phaseolina*.

Keywords: morphotypes, diversity, antagonism, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Introduction

The microorganisms present in soils are subject to complex interactions with other microorganisms, plant roots, the physical and chemical composition of the soil, among other factors. The microorganism diversity is modified by factors such as, edaphic features, type of vegetation and type soil use (Garbeva *et al.*, 2004). In crop areas, this diversity is modified by the practices applied to these plant species (Steenwerth *et al.*, 2002), such as chemical fertilization (Ullah *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017) and soil work. (Lu *et al.*, 2108; Essel *et al.*, 2019). In addition, in these areas cultivated plants can be associated to native soil microorganisms that help against the damage produced by phytopathogenic microorganisms (Mallikarjuna and Jayapal, 2015). The phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* infects more than 500 species of plants that commonly cause the disease known as charcoal rot (Kaur *et al.*, 2012). Its control is mainly based on the use of fungicides (Cohen *et al.*, 2016) and on the selection of resistant genotypes (Ambrosio *et al.*, 2015). However, research on the use of fungi as biocontrol agents has been carried out (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019; Gajera *et al.*, 2012). In northeastern Mexico, plant species susceptible to *M. phaseolina* such as sorghum, soybeans, chilli and melon are cultivated (Cohen *et al.*, 2016; Reyes-Franco *et al.*, 2006), and it is unknown if there are antagonistic fungi to this phytopathogen that can be used as biocontrol agents and give sustainability to these crops. The objective of this research was to carry out a functional

soya, chile y melón (Cohen *et al.*, 2016; Reyes-Franco *et al.*, 2006), y se desconoce si existen hongos antagónicos a este fitopatógeno que puedan ser utilizados como agentes de biocontrol y dar sostenibilidad a estos cultivos. El objetivo de esta investigación fue realizar una caracterización funcional de hongos aislados de suelos cultivados con melón, soya, chile y sorgo, así como de suelos cercanos a estos no cultivados, por su capacidad antagónica contra *M. phaseolina*, así como determinar la diversidad de los hongos aislados de estos suelos.

Materiales y métodos

Obtención de muestras de suelo

En el 2019 se obtuvieron ocho bancos de microorganismos aislados de suelos cultivados con sorgo, soya, melón y chile, así como de suelos nativos no cultivados cercanos a las parcelas cultivadas; excepto en sorgo, cuya muestra de suelo control se tomó de una parcela vecina no cultivada (Cuadro 1). El área de muestreo fue de 5 x 5 m para cada suelo; en cinco puntos se tomaron aproximadamente 100 gr de suelo a una profundidad entre 15 cm y 30 cm, con la ayuda de una pala. Las muestras fueron transportadas en una hielera con geles refrigerantes al Campo Experimental General Terán (CEGET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en Nuevo León.

Aislamiento de hongos

El suelo se homogeneizó, se pesó 1 gr de suelo, y se realizaron diluciones de suelo en tubos cónicos de 50 mL, obteniendo las diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000. Posteriormente, se colocaron 50 µL de las diluciones en cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) acidificado (200 µL de ácido láctico 85 % L⁻¹). Se utilizó la dilución 1:10 para inocular 2 cajas Petri, de la dilución 1:100 se inocularon 5 cajas Petri, la

characterization of fungi isolated from melon, soybeans, chili and sorghum crop soils, as well as from non-cultivated nearby soils, for their antagonistic antibiosis capacity against *M. phaseolina*, as well as to determine the diversity of fungi isolated from these soils.

Materials and methods

Obtaining soil samples

In 2019, eight microorganism banks were isolated from soils cultivated with sorghum, soybean, cantaloupe and chilli, as well as from non-cultivated native soils close to the crop plots; except in sorghum, whose control soil sample was taken from a neighboring non-cultivated plot (Table 1). The sampling area was 5 x 5 m for each soil; at five points, approximately 100 g of soil were taken at a depth between 15 cm and 30 cm, with the help of a shovel. The samples were transported in a cooler with cooling gels to the General Terán Experimental Field (CEGET), of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research, in Nuevo León.

Fungi isolation

The soil was homogenized, 1 g of soil was weighed, and soil dilutions were made in 50 mL conical tubes, obtaining serial dilutions 1:10, 1: 100, 1: 1,000 and 1: 10,000. Subsequently, 50 µL of the dilutions were placed in Petri dishes with acidified potato dextrose agar (PDA) medium (200 µL of lactic acid 85% L-1). The 1:10 dilution was used to inoculate 2 Petri dishes, from the 1: 100 dilution 5 Petri dishes were inoculated, the 1: 1,000 dilution was used to inoculate 13 dishes, and the 1: 10,000 dilution to inoculate 5 Petri dishes. These dilutions made it possible to facilitate the isolation of individual microcolonies of fungi under the compound microscope at 24-48 hr, which were transferred to the same culture medium.

Identification of morphotypes

dilución 1:1,000 se utilizó para inocular 13 cajas, y la dilución 1:10,000 para inocular 5 cajas Petri. Estas diluciones permitieron facilitar el aislamiento de microcolonias individuales de hongos bajo el microscopio compuesto a las 24-48 hr, las cuales se transfirieron al mismo medio de cultivo.

After seven days, colonies were characterized according to their color, growth and appearance, as well as the appearance and color of their lower part, the production of color in the substrate, and the appearance of the hyphae at the edge of the colonies. All the strains were preserved in water and are kept in

Cuadro 1. Sitios de muestreo de suelos cultivados y nativos cercanos no cultivados.

Table 1. Nearby cultivated and uncultivated native soil sampling sites.

Estado	Cultivo	Suelo cultivado	Suelo nativo cercano no cultivado
Tamaulipas	Sorgo	25°58'24" N; 98° 00'58" O	25°58'24" N; 98° 00'58" O
Tamaulipas	Soya	22°34'24.3804"N; 98°10'22.42668" O	22°34'8.1336"N; 98°10'23.83932" O
Coahuila	Melón	25° 39' 28.253" N; 101° 53' 51.745" O	25° 38' 22.614" N; 101° 54' 38.746" O
Tamaulipas	Chile	22°31'51.02" N; 98°9'19.91" O	22°31'49.26" N; 98°9'22.07" O

Identificación de morfotipos

A los siete días, las colonias se caracterizaron con base al color, crecimiento y apariencia de la colonia, así como a la apariencia y color de la parte inferior de la colonia, la producción de color en el sustrato y por la apariencia de hifas en el borde de las colonias. Cada conjunto de características únicas de las colonias se definió como morfotipo. Todas las cepas fueron conservadas en agua y se mantienen en el laboratorio de fitopatología del CEGET.

Diversidad de morfotipos

Los morfotipos de cada suelo cultivado fueron comparados con los morfotipos aislados de suelos nativos no cultivados y se determinó el índice de diversidad en base al método de Shannon-Wiener (Shannon, 1948) utilizando la fórmula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$$

the CEGET plant pathology laboratory.

Diversity of morphotypes

The morphotypes of each cultivated soil were compared with the isolated morphotypes of non-cultivated native soils and the diversity index was determined based on the Shannon-Wiener method (Shannon, 1948) using the formula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$$

Where H represents the diversity index of the sample; " p_i " represents the ratio of the relative abundance of morphotype " i " in relation to the abundance of all morphotypes in a soil sample and " S " represents the total number of morphotypes.

Scrutiny test

In this test without repetitions, one strain of each one of 86% of the morphotypes was compared against four strains of *Macrophomina* isolated from soybeans, melons, chilli and beans. Some very fast-

En donde H representa el índice de diversidad de la muestra; " p_i " representa la proporción de la abundancia relativa del morfotipo " i " en relación con la abundancia de todos los morfotipos en una muestra de suelo y " S " representa el número total de morfotipos.

Prueba de escrutinio

En esta prueba sin repeticiones, una cepa de cada uno del 86 % de los morfotipos se confrontaron contra cuatro cepas de *Macrophomina* aisladas de soya, melón, chile y frijol. Algunos morfotipos de muy rápido crecimiento, que hubiera sido imposible evaluar su posible antagonismo, y otros que fueron incapaces de volver a crecer, fueron excluidos. Además, en el caso de varias cepas de un mismo morfotipo sólo una fue seleccionada arbitrariamente para su estudio. Un fragmento de 0.5 cm² aproximadamente de cada morfotipo, se colocó en el centro de cajas Petri conteniendo PDA durante 3 a 5 días, y en seguida un fragmento de colonia de las cepas de *Macrophomina* se colocó en los puntos cardinales de la caja. El testigo consistió en la inoculación de las cepas de *Macrophomina* en puntos cardinales de cajas Petri solamente. Las placas se mantuvieron a 26 °C por 24 hr y se registró el crecimiento de cada cepa de *Macrophomina* en dirección a los morfotipos, y se obtuvo el porcentaje promedio de inhibición respecto al testigo.

Confrontación dual

Los morfotipos con mayor promedio de inhibición del crecimiento contra las cuatro cepas de *Macrophomina* se seleccionaron para realizar confrontaciones duales, las cuales se realizaron colocando los morfotipos en un extremo de las cajas Petri por 3-5 días antes de inocular la cepa de *M. phaseolina* aislada de sorgo en el otro extremo. El testigo consistió en inocular sólo la cepa de *Macrophomina* en cajas Petri con medio de cultivo. El experimento se incubó a 26 °C y a los 4 días se registró el crecimiento radial del fitopatógeno en dirección de cada morfotipo y

growing morphotypes, which it would have been impossible to assess their possible antagonism, and others that were unable to regrow, were excluded. Furthermore, in the case of several strains of the same morphotype, only one was arbitrarily selected for study. A fragment of approximately 0.5 cm² of each morphotype was placed in the center of Petri dishes containing PDA for 3 to 5 days, and then a similar colony fragment of the *Macrophomina* strains was placed in the cardinal points of the box. The control consisted of the inoculation of the *Macrophomina* strains in the cardinal points of Petri dishes only. The plates were kept at 26 °C for 24 hr and the growth of each *Macrophomina* strain was recorded in the direction of the morphotypes, and the average percentage of inhibition was obtained with respect to the control.

Dual confrontation

The morphotypes with the highest average growth inhibition against the four *Macrophomina* strains were selected for dual confrontations, which were performed by placing the morphotypes at one end of the Petri dishes for 3-5 days before inoculating the *M. phaseolina* strain isolated from sorghum at the other end. The control consisted of inoculating only the *Macrophomina* strain in Petri dishes with culture medium. The experiment was incubated at 26 °C and at 4 days the radial growth of the phytopathogen was recorded in the direction of each morphotype and the percentage of inhibition with respect to the growth in the control was obtained, whose growth covered most of the Petri dish.

Five repetitions were established under a completely randomized design for both the control and for 15 selected fungal morphotypes. Radial growth data was subjected to an analysis of variance and comparison of means (Tukey; $p = 0.05$) was performed with the Experimental Design Program ver. 1.6, of the Faculty of Agronomy of the Autonomous University of Nuevo León

se obtuvo el porcentaje de inhibición respecto al crecimiento en el testigo, cuyo crecimiento cubrió la mayor parte de la caja Petri.

Cinco repeticiones fueron establecidas bajo un diseño completamente al azar tanto para el testigo como para 15 morfotipos de hongos seleccionados. Los datos de crecimiento radial se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey; $p= 0.05$) con el Programa de Diseños Experimentales ver. 1.6, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Olivares, 2015). De este experimento, los morfotipos de hongos que causaron más del 60 % de inhibición sobre la cepa de sorgo de *M. phaseolina*, fueron identificados a nivel de género con base a sus características morfológicas utilizando las claves de Barnett y Hunter (1998).

Resultados

En total se obtuvieron 312 aislados de hongos y la cantidad en cada tipo de suelo varió de 16 a 54 (Cuadro 2). De estos aislados se determinaron 195 morfotipos distintos, de los cuales 17 morfotipos fueron comunes entre todos los pares de suelos analizados (cultivado y no cultivado relacionadas a cada especie de planta); 107 se obtuvieron en suelos nativos y 105 en suelos cultivados. La mayor cantidad de morfotipos en suelos cultivados ocurrió en melón (30) y sorgo (27); mientras que en suelos nativos no cultivados la mayor cantidad de morfotipos se presentó en los cercanos a chile (29) y sorgo (26) (Figura 1A).

Cuadro 2. Cepas, morfotipos e índice de diversidad de hongos en suelos cultivados y nativos cercanos no cultivados.

Table 2. Strains, morphotypes and index of fungal diversity in cultivated soils and nearby non-cultivated natives.

Tipo de suelo	Sorgo			Soya			Melón			Chile		
	No. de cepas	No. de morfotipos	Índice de diversidad	No. de cepas	No. de morfotipos	Índice de diversidad	No. de cepas	No. de morfotipos	Índice de diversidad	No. de cepas	No. de morfotipos	Índice de diversidad
Cultivado	46	38	3.82	16	13	2.51	41	33	3.46	44	21	2.66
No cultivado	54	37	3.98	26	18	2.75	36	21	2.70	49	31	3.27

(Olivares, 2015). From this experiment, the fungal morphotypes that caused more than 60% inhibition on the sorghum strain of *M. phaseolina*, were identified at the genus level based on their morphological characteristics using the keys of Barnett and Hunter keys (1998).

Results

Three hundred twelve of total fungal isolates were obtained and the amount in each type of soil varied from 16 to 54 (Table 2). From these isolates, 195 different morphotypes were determined, of which 17 morphotypes were common among all pairs of soils analyzed (cultivated and non-cultivated related to each plant species); 107 were obtained in native soils and 105 in cultivated soils. The highest amount of morphotypes in cultivated soils occurred in cantaloupe (30) and sorghum (27); while in non-cultivated native soils the highest amount of morphotypes was presented in those close to chilli (29) and sorghum (26) (Figure 1A).

The Shannon-Wiener index showed that all the soil samples present values from 2.51 to 3.98, which indicates a high diversity of morphotypes in each one of them (Table 2). The cultivated soybean soil showed the lowest diversity index (2.51) followed by the soil cultivated with chilli (2.66) and the native soils close to the uncultivated cantaloupe (2.70) and soybean (2.75).

One hundred and sixty-seven of the total of morphotypes obtained (195) were functionally characterized in the scrutiny

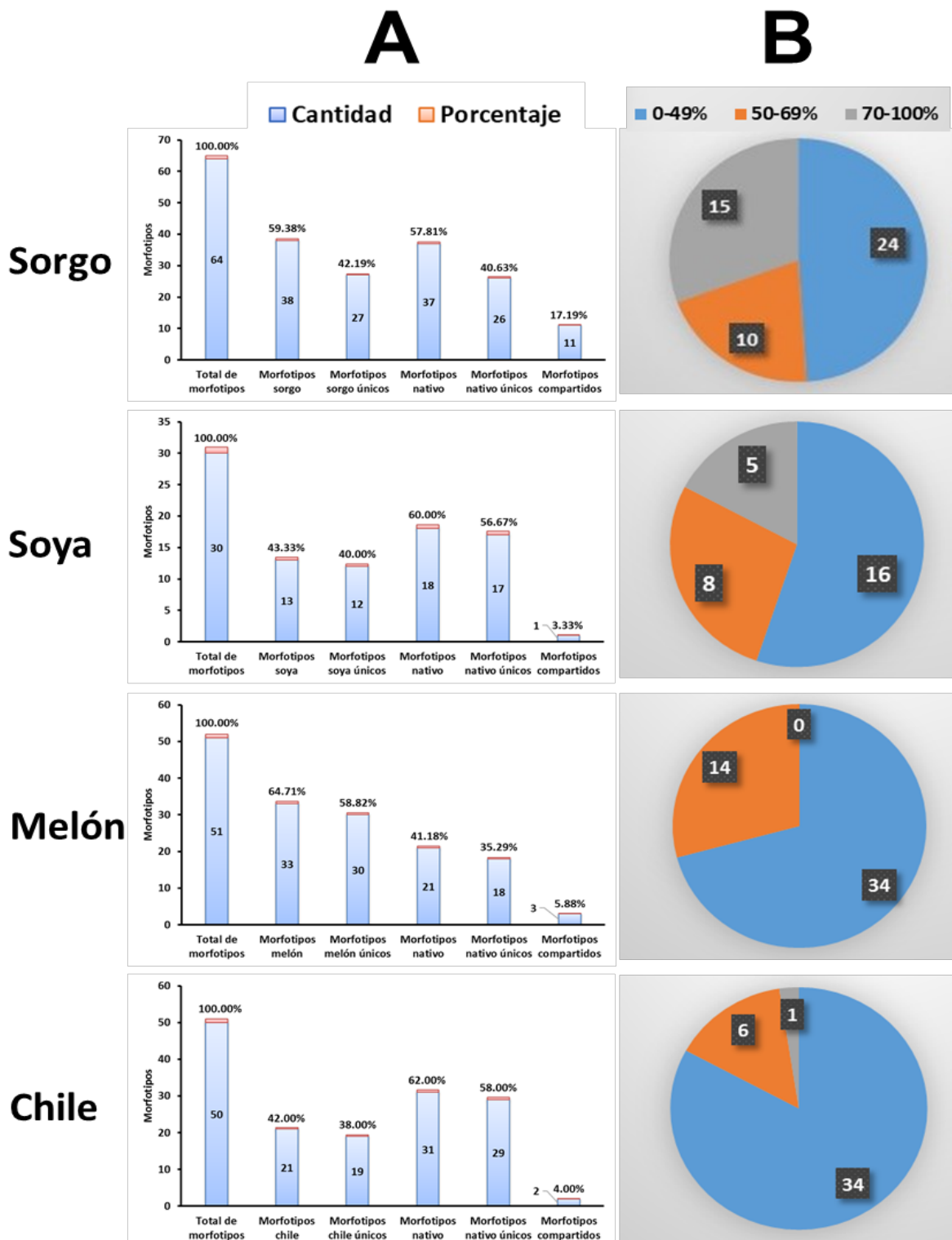


Figura 1. Diversidad de morfotipos de hongos en suelos cultivados y suelos nativos cercanos no cultivados (A) y número de morfotipos en tres rangos de porcentaje de inhibición de cuatro cepas de *Macrophomina phaseolina* durante el escrutinio (B).

Figure 1. Diversity of fungal morphotypes in cultivated soils and nearby uncultivated native soils (A) and number of morphotypes in three ranges of percentage inhibition of four strains of *Macrophomina phaseolina* during the scrutiny (B).

El índice de Shannon-Wiener mostró que todas las muestras de suelo presentan valores de 2.51 a 3.98, lo que indica una alta diversidad de morfotipos en cada uno de ellos (Cuadro 2). El suelo cultivado de soya mostró el menor índice de diversidad (2.51) seguido del suelo cultivado con chile (2.66) y de los suelos nativos cercanos a los no cultivados de melón (2.70) y soya (2.75).

De los 195 morfotipos obtenidos, 167 fueron caracterizados funcionalmente en el escrutinio sin repeticiones por su capacidad antagonica contra cuatro cepas de *M. phaseolina* (Figura 1 B). Veintiún morfotipos mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento mayor al 70 %. De estos morfotipos sobresalientes, 15 fueron evaluados por su antagonismo contra la cepa de sorgo de *M. phaseolina* bajo un diseño experimental con repeticiones.

without repeats for their antagonistic capacity against four strains of *M. phaseolina* (Figure 1 B). Twenty-one morphotypes showed percentages of growth inhibition by antibiosis greater than 70%. Of these outstanding morphotypes, 15 were evaluated for their antagonism against the sorghum strain of *M. phaseolina* under an experimental design with repetitions.

Significant differences were found in the dual confrontation between these morphotypes and the control. Three morphotypes stood out for their ability to inhibit the radial growth of *Macrophomina*, with an inhibition percentage greater than 60% compared to the control (Tukey; p = 0.05) (Table 3). Morphotypes that showed more than 60% inhibition were identified as *Aspergillus* (M9 of uncultivated native soil

Cuadro 3. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de la cepa *Macrophomina phaseolina* aislada de sorgo, confrontada con morfotipos seleccionados del escrutinio.

Table 3. Radial growth and inhibition percentage of the *Macrophomina phaseolina* strain isolated from sorghum, compared with morphotypes selected from the scrutiny.

Morfotipo (suelo de origen)	Crecimiento radial (desviación estándar)	Porcentaje de inhibición
Testigo	6.5 (±0.00) a*	-
M12 (Melón)	5.0 (±0.00) b	23.1
M9 (Nativo-soya)	4.7 (±0.19) b	28
M11 (Sorgo)	4.7 (±0.20) b	28
M24 (Soya)	4.6 (±0.29) b	29.2
M4 (Nativo-melón)	3.9 (±0.34) c	40.6
M10 (Nativo-melón)	3.8 (±0.35) c	41.8
M29 (Sorgo)	3.7 (±0.37) c	42.5
M7 (Nativo-soya)	3.5 (±0.05) cd	46.8
M30 (Soya)	3.1 (±0.22) de	52
M18 (Melón)	3.0 (±0.16) de	53.8
M34 (Melón)	2.8 (±0.26) ef	56.3
M6 (Nativo-soya)	2.7 (±0.47) efg	58.8
M9 (Nativo-melón)	2.6 (±0.09) efg	60.6
M33 (Sorgo)	2.2 (±0.46) fg	65.5
M26 (Soya)	2.1 (±0.24)g	68

* Valores con la misma letra no fueron estadísticamente diferentes.

* Values with the same letter were not statistically different.

En la confrontación dual se encontró diferencias altamente significativas entre estos morfotipos y el testigo. Tres morfotipos sobresalieron por su capacidad de inhibir el crecimiento radial de *Macrophomina*, con un porcentaje de inhibición mayor al 60 % respecto al testigo (Tukey; $p= 0.05$) (Cuadro 3). Los morfotipos que mostraron más del 60 % de inhibición se identificaron como *Aspergillus* (M9 de suelo nativo no cultivado relacionado al melón, y M26 de suelo de la parcela cultivada con soya) y *Penicillium* (M33 de suelo de la parcela cultivada con sorgo). Los restantes 12 morfotipos mostraron inhibiciones del 23.1 al 58.8 %. Estos morfotipos muestran una gran capacidad para inhibir el crecimiento micelial de *Macrophomina*.

Discusión

La escasa presencia de morfotipos comunes (17) entre los suelos cultivados y los suelos nativos cercanos a las parcelas cultivadas, muestra que existe gran diversidad de cepas de hongos entre ellos. Entre el suelo cultivado de sorgo y el no cultivado, ocurrió el mayor número de morfotipos comunes (11). Lo anterior, sugiere que la diversidad de cepas nativas de hongos presentes en parcelas cultivadas ha sido desplazada y que el manejo de los cultivos, como fertilización (Ullah *et al.*, 2019) y labores al suelo (Essel *et al.*, 2019), ha favorecido el establecimiento de nuevos hongos. Además, esta diversidad en parcelas cultivadas también puede deberse a la presencia de hongos acarreados por la semilla de estos cultivos (Rahim *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2009; Shovan *et al.*, 2008; Sharfun-Nahar *et al.*, 2004). La diversidad morfológica de hongos cultivables encontrada en esta investigación puede considerarse baja con relación al uso de herramientas basadas en el análisis del ADN (Kirk *et al.*, 2004) que permiten detectar microorganismos no cultivables y escasamente representados en suelo; sin embargo, éstas limitan la caracterización funcional de la diversidad microbiana que detectan (Garbeva *et al.*,

related to cantaloupe and M26 of soil of the plot cultivated with soybean) and *Penicillium* (M33 of soil of the plot cultivated with sorghum). The remaining 12 morphotypes showed inhibitions from 23.1 to 58.8%. These morphotypes show a great capacity to inhibit the mycelial growth of *Macrophomina* through antibiosis.

Discussion

The limited presence of common morphotypes (17) between cultivated soils and native soils close to the cultivated plots shows that there is a great diversity of fungal strains between them. Between the cultivated sorghum soil and the uncultivated one, the highest number of common morphotypes occurred (11). The above suggests that the diversity of native strains of fungi present in cultivated plots has been displaced and that the management of crops, such as fertilization (Ullah *et al.*, 2019) and soil work (Essel *et al.*, 2019), has favored the establishment of new fungi. Furthermore, this diversity in cultivated plots may also be due to the presence of fungi carried by the seed of these crops (Rahim *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2009; Shovan *et al.*, 2008; Sharfun-Nahar *et al.*, 2004). The morphotypic diversity of cultivable fungi found in this investigation can be considered low in relation to the use of tools based on DNA analysis (Kirk *et al.*, 2004), which allow the detection of non-cultivable and poorly represented microorganisms in soil; however, these limit the functional characterization of the microbial diversity that they detect (Garbeva *et al.*, 2004). This functional capacity can range from chemical aspects to activities that microorganisms can develop; in this case as antagonists.

In the scrutiny (without repetitions), strains of fungal morphotypes with high capacity to reduce radial growth of the four strains used in the study were selected; however, after performing the dual confrontation with repetitions, lower percentages were observed than those observed in the scrutiny. This may be due to

2004). Esta capacidad funcional puede ir desde aspectos químicos hasta actividades que pueden desarrollar los microorganismos; en este caso como antagonistas.

En el escrutinio (sin repeticiones), se seleccionaron cepas de morfotipos de hongos con elevada capacidad para disminuir el crecimiento radial de las cuatro cepas utilizadas en el estudio; sin embargo, al realizar la confrontación dual con repeticiones, se observó porcentajes más bajos a los observados en el escrutinio. Lo anterior puede deberse a que en él escrutinio no se utilizó la cepa de *M. phaseolina* aislada de sorgo con la cual se realizó la confrontación dual. Lo anterior sugiere que la capacidad antagónica de los hongos está influenciada por la cepa del fitopatógeno utilizada, lo que implica que el efecto de una cepa antagónica sobre el crecimiento de varias cepas del fitopatógeno será dependiente de la cepa utilizada de este último. Se ha demostrado que cepas de *Trichoderma* muestran una interacción diferencial contra cepas de *M. phaseolina* (Aly *et al.*, 2007), por lo que es necesario realizar estudios para sustentar esta hipótesis en la interacción de las cepas sobresalientes con todas las cepas de *M. phaseolina* usadas en esta investigación. A pesar de la inhibición observada, un morfotipo (M26) identificado como *Aspergillus* mostró una inhibición del 68% del crecimiento de *M. phaseolina*, mayor a la reportada (10 – 66%) en otras investigaciones que incluyeron especies de *Aspergillus* (Anis *et al.*, 2010; Ullah *et al.*, 2011). Mientras que el porcentaje de inhibición observado por el morfotipo M33 de *Penicillium* también mostró un porcentaje de inhibición del crecimiento de 65.5% superior a los valores de 11.1 – 57.8 observados por otros investigadores para otras especies de *Penicillium* (Cherkupally *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2011). De acuerdo a Quiroz *et al.* (2008), algunas especies de *Aspergillus* tienen capacidad antagónica mediante la competencia y la antibiosis contra hongos fitopatógenos, sin embargo, mencionan que,

the fact that the *M. phaseolina* strain isolated from sorghum with which the dual confrontation was performed was not used in the scrutiny. This suggests that the antagonistic capacity of the fungi is influenced by the strain of the phytopathogen used, which implies that the effect of an antagonistic strain on the growth of various strains of the phytopathogen will be dependent on the strain of the latter used. It has been shown that *Trichoderma* strains show a differential interaction against strains of *M. phaseolina* (Aly *et al.*, 2007), so it is necessary to carry out studies to support this hypothesis in the interaction of the outstanding strains with all strains of *M. phaseolina* used in this research. Despite the observed inhibition, a morphotype (M26) identified as *Aspergillus* showed a 68% inhibition of the growth of *M. phaseolina*, greater than that reported (10 - 66%) in other investigations that included *Aspergillus* species (Anis *et al.*, 2010; Ullah *et al.*, 2011). Moreover, the percentage of inhibition observed by the M33 morphotype of *Penicillium* also showed a percentage of growth inhibition of 65.5% higher than the values of 11.1 - 57.8 reported by other researchers for other *Penicillium* species (Cherkupally *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2011). According to Quiroz *et al.* (2008), some *Aspergillus* species have antagonistic capacity by competition and antibiosis against phytopathogenic fungi, however, it has been reported that although *Aspergillus* strains may be a new option for the use of biological control, they are not really recommended for some extensive use and/or application in the field since this genus of fungi commonly produces mycotoxins.

The identification of *Aspergillus* and *Penicillium* strains antagonistic to *M. phaseolina* obtained in this research strengthens previous findings (Cherkupally *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2011; Anis *et al.*, 2010), that report species of these genera with inhibition by antibiosis of the growth of this phytopathogen. Numerous investigations have

aunque las cepas de *Aspergillus* pueden ser una nueva opción para el uso de control biológico, no son realmente recomendables para algún uso y/o aplicación extensiva en campo ya que este género de hongos comúnmente produce micotoxinas.

La identificación de cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* antagónicas a *M. phaseolina* obtenidas en esta investigación fortalece hallazgos previos (Cherkupally *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2011; Anis *et al.*, 2010) que reportan especies de estos géneros con inhibición por antibiosis del crecimiento de este fitopatógeno. Numerosas investigaciones han sido dirigidas a evaluar cepas de *Trichoderma* contra *M. phaseolina* (Iqbal y Mukhtar, 2020), sin embargo, hongos antagónicos a *M. phaseolina* como *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Paecilomyces* (Hussain *et al.*, 1990) no fueron identificados en este trabajo como antagónicos por antibiosis contra *M. phaseolina*.

Conclusiones

El número de morfotipos identificados fue muy similar tanto en suelos cultivados con sorgo, soya, melón y chile, así como en suelos nativos no cultivados cercanos a las parcelas cultivadas, pero el número de morfotipos comunes para ambos tipos de suelos fue bajo. La caracterización funcional de antagonismo por los morfotipos analizados permitió identificar a dos de ellos como *Aspergillus* y uno como *Penicillium*, y se consideran como sobresalientes para inhibir el crecimiento de *M. phaseolina* bajo condiciones *in vitro*.

Agradecimientos

Se agradece al INIFAP el apoyo financiero para la realización de esta investigación como parte del Proyecto 13403834745 "Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR-Noreste", así como a Yesenia Yazmín Salazar Mata por su apoyo técnico.

been directed to evaluate *Trichoderma* strains against *M. phaseolina* (Iqbal and Mukhtar, 2020), however, fungi antagonistic to *M. phaseolina* such as *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Paecilomyces* (Hussain *et al.*, 1990) were not identified in this work as antagonists for antibiosis against *M. phaseolina*.

Conclusions

The number of identified morphotypes was very similar both in soils cultivated with sorghum, soybeans, melon and chilli, as in non-cultivated native soils close to the cultivated plots, but the number of common morphotypes for both types of soils was low. The functional characterization of antagonism by the analyzed morphotypes allowed the identification of two of them as *Aspergillus* and one as *Penicillium*, and they are considered as outstanding for inhibiting the growth of *M. phaseolina* under *in vitro* conditions.

Acknowledgments

INIFAP is grateful for the financial support to carry out this research as part of Project 13403834745 "Use of microbial biodiversity against phytosanitary problems of crops in the area of influence of CIR-Northeast", as well as Yesenia Yazmín Salazar Mata for her technical support.

References

Referencias

- Aly, A.A., Abdel-Sattar, M.A., Omar, M.R. and Abd-Elsalam, K.A. (2007). Differential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research* 47: 91-102.
- Ambrosio, M.M., Dantas, A.C., Martínez Pérez, E.M., Medeiros, A.C., Sousa Nunes, G.H.D. and Picó Sirvent, M.B. (2015). Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica* 206: 287-300.
- Anis, M., Abbasi, M. W., and Zaki, M. J. 2010. Bioefficacy of microbial antagonists against *Macrophomina phaseolina* on sunflower. *Pakistan Journal of Botany* 42: 2935-2940.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (No. Ed. 4). American Phytopathological Society (APS Press). St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Cherkupally, R., Amballa, H. and Reddy, N. 2016. In vitro antagonistic activity of *Trichoderma* and *Penicillium* species against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Annals of Biological Research* 7:34-38.
- Cohen, R., Elkabetz, M. and Edelstein, M. 2016. Variation in the responses of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina*. *Crop Protection* 85: 46-51.
- Cubilla-Ríos, A.A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D.D., Romero-Rodríguez, M.C., Flores-Giubi, M.E. and Barúa-Chamorro, J.E. 2019. Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana* 30: 63-77.
- Essel, E., Xie, J., Deng, C., Peng, Z., Wang, J., Shen, J., Xie, J., Coulter, J.A. and Li, L. 2019. Bacterial and fungal diversity in rhizosphere and bulk soil under different long-term tillage and cereal/legume rotation. *Soil and Tillage Research* 194, 104302.
- Gajera, H.P., Bambharolia, R.P., Patel, S.V., Khatrani, T.J. and Goalkiya, B.A. 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.
- Garbeva, P. V., Van Veen, J. A. and Van Elsas, J. D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 243-270.
- Hussain, S., Ghaffar, A. and Aslam, M. 1990. Biological control of *Macrophomina phaseolina* charcoal rot of sunflower and mung bean. *J. Phytopathology* 130: 157-160.
- Iqbal, U., and Mukhtar, T. 2020. Evaluation of biocontrol potential of seven indigenous *Trichoderma* species against charcoal rot causing fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen* 72: 195-202.
- Islam, S.M.M., Masum, M.M.I. and Fakir, M.G.A. 2009. Prevalence of seed-borne fungi in sorghum of different locations of Bangladesh. *Scientific Research and Essays* 4: 176-179.
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Vallad, G.E., Chand, R. and Chauhan, V.B. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38: 136-151.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. and Trevors, J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169-188.
- Lu, X., Lu, X., and Liao, Y. 2018. Effect of tillage treatment on the diversity of soil arbuscular mycorrhizal fungal and soil aggregate-associated carbon content. *Frontiers in Microbiology* 9, 2986.
- Mallikarjuna, M. and Jayapal, G.B. 2015. Isolation, identification and in vitro screening of rhizospheric fungi for biological control of *Macrophomina phaseolina*. *Asian Journal of Plant Pathology* 9: 175-188.
- Olivares, S.E. 2015. Programa de diseños experimentales FAUANL, versión 1.6. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Versión transportable. emolivares@gmail.com
- Quiroz, V., Ferrera-Cerrato R., Alarcón, A. and Lara, M. 2008. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología* 26:27-34.
- Rahim, S., Dawar, S. and Azeem, M. 2016. Detection of mycoflora and aflatoxin B1 in the

- seeds of Inodorous melons (*Cucumis melo* L.). *Walailak Journal of Science and Technology* 13: 23-33.
- Reyes-Franco, M.C., Hernández-Delgado, S., Beas-Fernández, R., Medina-Fernández, M., Simpson, J. and Mayek-Pérez, N. 2006. Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. *Journal of Phytopathology* 154: 447-453.
- Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379-423.
- Sharfun-Nahar, S.N., Mushtaq, M. and Pathan, I.H. 2004. Seed-borne mycoflora of *Capsicum annuum* imported from India. *Pakistan Journal of Botany* 36: 191-198.
- Shovan, L. R., Bhuiyan, M. K. A., Sultana, N., Begum, J. A., and Pervez, Z. 2008. Prevalence of fungi associated with soybean seeds and pathogenicity tests of the major seed-borne pathogens. *International Journal of Sustainable Crop Production* 3: 24-33.
- Steenwerth, K. L., Jackson, L. E., Calderón, F. J., Stromberg, M. R. and Scow, K. M. 2002. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1599-1611.
- Ullah, M.H., Khan, M.A., Sahi, S.T. and 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: 616-621.
- Ullah, S., Ai, C., Ding, W., Jiang, R., Zhao, S., Zhang, J., Zhou, W., Hou, Y. and He, P. 2019. The response of soil fungal diversity and community composition to long-term fertilization. *Applied Soil Ecology* 140: 35-41.
- Wang, L. M., Huang, D. F., Fang, Y., Wang, F., Li, F. L. and Liao, M. 2017. Soil fungal communities in tea plantation after 10 years of chemical vs. integrated fertilization. *Chilean Journal of Agricultural Research* 77: 355-364.