



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---



*Centro Universitario UAEM Tenancingo*

**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *in vitro* DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp.  
FRENTA A *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*,  
PATÓGENOS DEL CULTIVO DE ROSA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

**P R E S E N T A**

**ANAHID ALONSO BAHENA**

**DIRECTORES DE TESIS**

**M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi**

**Dr. en C. Rómulo García Velasco**

**ASESOR DE TESIS**

**Dra. en C. Martha Elena Mora Herrera**

**Tenancingo, Estado de México**

**Enero de 2020**

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Importancia del cultivo de <i>Rosa</i> sp. ....	3
2.2. Patógenos de importancia en el cultivo de rosa en la zona florícola del Estado de México.....	3
2.2.1. <i>R. necatrix</i> .....	4
2.2.2. <i>V. dahliae</i> .....	5
2.2.3. <i>B. cinerea</i> .....	6
2.3. El género de <i>Trichoderma</i> .....	7
2.4. Distribución mundial de <i>Trichoderma</i> spp. ....	8
2.5. Características morfológicas y culturales de <i>Trichoderma</i> spp. ....	8
2.6. Condiciones óptimas de desarrollo .....	9
2.7. <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico.....	9
2.7.1. Micoparasitismo .....	10
2.7.2. Competencia por espacio y nutrientes .....	11
2.7.3. Antibiosis por metabolitos volátiles y no volátiles .....	11
2.7.4. Desactivación de enzimas del patógeno .....	11
2.7.5. Promoción de crecimiento vegetal .....	12
2.7.6. Inducción de resistencia sistémica .....	12
2.8. Principales especies de <i>Trichoderma</i> spp. utilizadas como agentes de control biológico .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	17
5.1. Objetivo general .....	17
5.2. Objetivos específicos .....	17
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
6.1. Colecta de muestras de suelo.....	18

6.2.	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	19
6.3.	Obtención de cultivos monospóricos.....	20
6.4.	Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> a nivel género .....	22
6.5.	Identificación molecular a nivel especie .....	23
6.6.	Determinación de los mecanismos de acción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>R. necatrix</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>B. cinerea</i> .....	24
6.6.1.	Material biológico .....	24
6.6.2.	Competencia .....	24
6.6.4.	Antibiosis por metabolitos difusibles.....	28
6.6.5.	Micoparasitismo .....	29
6.6.6.	Diseño experimental y análisis estadístico .....	29
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
7.1.	Aislamiento de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.....	30
7.2.	Selección de cultivos monospóricos .....	30
7.3.	Caracterización cultural.....	30
7.4.	Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> a nivel de género .....	33
7.5.	Identificación molecular a nivel de especie .....	36
7.6.	Mecanismos de acción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>Verticillium dahliae</i> y <i>Botrytis cinerea</i> .....	38
7.6.1.	Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>R. necatrix</i> ..	38
7.6.1.1.	Competencia .....	38
7.6.1.2.	Antibiosis por metabolitos volátiles.....	42
7.6.1.3.	Antibiosis por metabolitos difusibles.....	44
7.6.1.4.	Micoparasitismo .....	46
7.6.2.	Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>V. dahliae</i> ...	46
7.6.2.1.	Competencia .....	46
7.6.2.2.	Antibiosis por metabolitos volátiles.....	50
7.6.2.3.	Antibiosis por metabolitos difusibles.....	52
7.6.2.4.	Micoparasitismo .....	54
7.6.3.	Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>B. cinerea</i> ...	57
7.6.3.1.	Competencia .....	57
7.6.3.2.	Antibiosis por metabolitos volátiles.....	60
7.6.3.3.	Antibiosis por metabolitos difusibles.....	62

7.6.3.4. Micoparasitismo .....	64
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>10. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>11. LISTA DE REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales municipios del Estado de México productores de <i>Rosa</i> sp., superficie cultivada y valor de producción en el año 2018.....	3
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre fitopatógenos de acuerdo a Bell y Markham (1982), modificado por Ruiz (2010).....	26
<b>Cuadro 3.</b> Tasa de crecimiento y esporulación de los cultivos monospóricos de las colonias SS1 y SS2.....	31
<b>Cuadro 4.</b> Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. de las cepas SS1 y SS2 de acuerdo con el tamaño de conidios y fíalides.....	35
<b>Cuadro 5.</b> Identificación molecular de cuatro aislamientos de <i>Trichoderma</i> , utilizando los cebadores universales ITS4 e ITS5 alineados con especies mantenidas en la base de datos del NCBI.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Área de crecimiento micelial de <i>R. necatrix</i> confrontado en cultivos duales con <i>Trichoderma</i> spp., 15 días después de la siembra.....	40
<b>Cuadro 7.</b> Área de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de <i>R. necatrix</i> por efecto de metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp., siete días después de la siembra.....	42
<b>Cuadro 8.</b> Área de crecimiento micelial de <i>R. necatrix</i> por efecto de metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp., siete días después de la siembra.....	44

<b>Cuadro 9.</b> Área de intersección y área de crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> confrontado en cultivos duales con <i>Trichoderma</i> spp., 15 días después de la siembra.....	48
<b>Cuadro 10.</b> Área de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de <i>V. dahliae</i> por efecto de metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp., 14 días después de la siembra.....	50
<b>Cuadro 11.</b> Área de crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> por efecto de metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp., 14 días después de la siembra.....	52
<b>Cuadro 12.</b> Área de crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> confrontado en cultivos duales con <i>Trichoderma</i> spp., 15 días después de la siembra.....	58
<b>Cuadro 13.</b> Área de crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> con metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp., cinco días después de la siembra.....	60
<b>Cuadro 14.</b> Área de crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> con metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp., seis días después de la siembra.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lugar de muestreo en ambiente natural de bosque ubicado en la localidad de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México.....	18
<b>Figura 2.</b> Trazo del área de crecimiento micelial, cada 24 horas, de cultivos monospóricos de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
<b>Figura 3.</b> Técnica de cajas superpuestas para determinar el efecto de metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>R. necatrix</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>B. cinerea</i> .....	27
<b>Figura 4.</b> Características culturales de la cepa SS1 en medio de cultivo PDA. a) Crecimiento micelial blanco algodonoso y anillos concéntricos verdosos debido a la producción de conidios. b) Reverso de la caja de Petri con pigmentación amarillenta.....	31
<b>Figura 5.</b> Características culturales de la cepa SS2 en medio de cultivo PDA. a) Crecimiento en forma de anillos concéntricos y crecimiento grumoso donde se agrupan las esporas. b) Reverso de la caja de Petri con pigmentación blanca.....	32
<b>Figura 6.</b> Micelio septado (m), conidióforos (cn), fiálides (f) y conidios (c) de la cepa SS1 (100x).....	33
<b>Figura 7.</b> Micelio septado (m), conidióforos (cn), fiálides (f) y conidios (c) de la cepa SS2 (100x).....	34
<b>Figura 8.</b> Comparación de medias entre los días al primer contacto entre <i>R. necatrix</i> y <i>Trichoderma</i> spp. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).....	38

<b>Figura 9.</b> Grado de competencia de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>R. necatrix</i> . Disco superior corresponde a la cepa de <i>Trichoderma</i> spp. y disco inferior a <i>R. necatrix</i> . a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	41
<b>Figura 10.</b> Crecimiento micelial de <i>R. necatrix</i> por efecto de metabolitos volátiles. a) Testigo, b) SS1. c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	43
<b>Figura 11.</b> Crecimiento micelial de <i>R. necatrix</i> por efecto de metabolitos difusibles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	45
<b>Figura 12.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma tomentosum</i> hacia <i>Rosellinia necatrix</i> . a) micelio de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) enrollando (E) al micelio de <i>R. necatrix</i> (Rn). b) Lisis (L) de micelio de <i>R. necatrix</i> . Objetivo 100x.....	46
<b>Figura 13.</b> Comparación de medias de días al primer contacto entre <i>V. dahliae</i> y <i>Trichoderma</i> spp. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativa, comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ). El promedio de la SS2, corresponde a los días al primer contacto de las cinco repeticiones en las que hubo intersección entre esta cepa y <i>V. dahliae</i> .....	47
<b>Figura 14.</b> Grado de competencia de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>V. dahliae</i> Disco superior corresponde a la cepa de <i>Trichoderma</i> spp. y disco inferior a <i>V. dahliae</i> . a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	49
<b>Figura 15.</b> Crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> por efecto de metabolitos volátiles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	51
<b>Figura 16.</b> Crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> por efecto de metabolitos difusibles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	53
<b>Figura 17.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma tomentosum</i> hacia <i>Verticillium dahliae</i> . a) Reconocimiento y adhesión del micelio de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1)	



a <i>V. dahliae</i> (Vd) (40x). b) Enrollamiento de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) al micelio de <i>V. dahliae</i> (V). Objetivo 100x.....	54
<b>Figura 18.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> hacia <i>Verticillium dahliae</i> . a, b y d) Crecimiento adyacente de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) que forma haustorios (H) de penetración para alimentarse de <i>V. dahliae</i> (Vd) (100x). c) Adhesión del micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) al micelio de <i>V. dahliae</i> (Vd). Objetivo 40x.....	55
<b>Figura 19.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma asperellum</i> a <i>Verticillium dahliae</i> . a b) Reconocimiento y adhesión del micelio de <i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3) al micelio de <i>V. dahliae</i> (Vd). Objetivo 40x.....	56
<b>Figura 20.</b> Días al primer contacto de <i>B. cinerea</i> con <i>Trichoderma</i> spp. Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).....	57
<b>Figura 21.</b> Grado de competencia de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>B. cinerea</i> . Disco superior corresponde a la cepa de <i>Trichoderma</i> spp. y disco inferior a <i>B. cinerea</i> . a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	59
<b>Figura 22.</b> Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> por efecto de metabolitos volátiles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	61
<b>Figura 23.</b> Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> por efecto de metabolitos difusibles frente a las cepas. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.....	63
<b>Figura 24.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma tomentosum</i> hacia <i>Botrytis cinerea</i> a y c) Formación de haustorios (H) por parte de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) para alimentarse de <i>B. cinerea</i> (Bc) y ocasionarle la muerte. b) Adhesión del micelio de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) al micelio de <i>B. cinerea</i> (Bc). d)	

Enrollamiento de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) al micelio de <i>B. cinerea</i> . Objetivo 100x.....	64
<b>Figura 25.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma barbatum</i> hacia <i>Botrytis cinerea</i> . Crecimiento micelial y formación de haustorios (H) por parte de <i>Trichoderma barbatum</i> (SS2) para alimentarse de <i>B. cinerea</i> (Bc). Objetivo 100x.....	65
<b>Figura 26.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> hacia <i>Botrytis cinerea</i> . a) Enrollamiento de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) al micelio de <i>B. cinerea</i> (Bc) (40x). b) Penetración (P) de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) al micelio de <i>B. cinerea</i> (Bc) (100x). c) Reconocimiento y adhesión del micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) al micelio de <i>B. cinerea</i> (Bc) (100x). d) Enrollamiento y absorción del contenido celular (A) por parte de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) al micelio de <i>B. cinerea</i> (Bc). Objetivo 40x.....	66
<b>Figura 27.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma asperellum</i> hacia <i>Botrytis cinerea</i> . a y b) Crecimiento y formación de haustorios de penetración (H) de <i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3) que provocan la muerte de <i>B. cinerea</i> (Bc). c y d) crecimiento y adhesión de micelio de <i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3) al micelio del patógeno (Bc). Objetivo 100x.....	67

## RESUMEN

En el Estado de México, en el 2018 se cultivaron 820 hectáreas de rosa, siendo los municipios de mayor importancia: Villa Guerrero, Tenancingo y Coatepec de Harinas. En la región se han reportado serios daños causados por *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, los cuales ocasionan la pudrición blanca de raíz, marchitez de la planta y el moho gris de la flor, respectivamente. Por lo que se planteó por objetivo: aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. de una zona forestal del municipio de Tenancingo, Estado de México, México; y determinar la actividad antagónica *in vitro* de estas y de las cepas TFR3 y TA4, obtenidas en estudios previos, frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*. A partir de muestras de suelos forestales de San Simonito, Tenancingo, Estado de México se obtuvieron las cepas SS1 y SS2, que de acuerdo con la identificación molecular correspondieron a *Trichoderma tomentosum* y *T. barbatum*, respectivamente; las cepas TA4 y TFR3 correspondieron a *T. harzianum* y *T. asperellum*. En cuanto a los mecanismos de acción *in vitro* se determinó el grado de competencia, la antibiosis por metabolitos volátiles, difusibles y micoparasitismo. En los experimentos de competencia, se obtuvo que las cuatro cepas inhibieron el crecimiento micelial de los fitopatógenos en un intervalo de 89 y 43.3%. Por otro lado, con los metabolitos volátiles las cepas SS2, SS1 y TFR3 inhibieron 48.3, 45.7 y 30% del crecimiento micelial de *R. necatrix*; SS1 y SS2 inhibieron el crecimiento de *V. dahliae* en 42.9 y 46.8%, respetivamente; en el caso de *B. cinerea* las cepas

SS1, SS2 y TA4 inhibieron el 65.2, 58.3 y 36% de crecimiento micelial, respectivamente.

Con metabolitos difusibles la cepa SS2 inhibió 13.4% del crecimiento micelial de *R. necatrix*; sin embargo, SS2 y SS1 inhibieron 52.1 y 48.8% del crecimiento de *V. dahliae*, respectivamente; en cuanto a *B. cinerea*, la única cepa que presentó efecto inhibitorio fue la SS2 con 25.9%. En lo que respecta a micoparasitismo, la única cepa en la que se observó este efecto con *R. necatrix* fue la SS1, en la que se detectó enrollamiento y ruptura de las hifas; con *V. dahliae* se observó penetración en diferentes puntos del micelio y enrollamiento por parte de las cepas SS1, TA4 y TFR3; con *B. cinerea* con las cuatro cepas se observó enrollamiento y haustorios penetrando las hifas.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Rosa* sp. es uno de los principales ornamentales que México exporta, su valor en el año 2018 fue de 6,548,916 USD (SIAVI, 2019). El Estado de México es el principal productor de rosa en la República Mexicana, en 2018 se cultivaron 820 hectáreas bajo invernadero, siendo los municipios más importantes Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas (SIAP, 2018).

Este cultivo es atacado por distintos hongos fitopatógenos que provocan pérdidas de rendimiento y calidad, entre estos se encuentran: *Rosellinia necatrix* Berl ex Prill., *Verticillium dahliae* Kleb. y *Botrytis cinerea* Pers., las enfermedades que ocasionan son la pudrición blanca de la raíz, marchitez de la planta y moho gris de la flor, respectivamente (García-Velasco *et al.*, 2017; García-Velasco *et al.*, 2012; Camacho., 2009). Su principal método de manejo es el químico, pero a medida que se realizan constantes aplicaciones, los patógenos adquieren resistencia, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas, siendo una de estas el control biológico.

Especies del género *Trichoderma* spp. destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos. Presentan diferentes mecanismos de acción, entre estos: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis por efecto de metabolitos volátiles y difusibles, desactivación de enzimas del patógeno, inducción resistencia sistémica en las plantas y estimulación del crecimiento vegetal (Infante *et al.*, 2009).

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó por objetivo: aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. de una zona forestal del municipio de Tenancingo, Estado de

Actividad Antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa.

---

México, México; y determinar la actividad antagónica *in vitro* de éstas y de las cepas TFR3 y TA4, obtenidas en estudios previos, frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Importancia del cultivo de *Rosa* sp.

México es un país que exporta diferentes plantas ornamentales, siendo la rosa la principal flor de corte; cuyo valor en el año 2017 fue de USD \$ 6,318,772, seguido por *Lilium candidum* L. con USD \$ 1,488,599 (SIAVI. 2018). En lo que respecta a la superficie de cultivo, en 2018 en el Estado de México se cultivaron 820 hectáreas bajo invernadero (SIAP, 2019), lo cual lo posiciona como el principal productor, donde destacan los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas (Cuadro 1) (SIAP, 2019).

**Cuadro 1.** Principales municipios del Estado de México productores de *Rosa* sp., superficie cultivada y valor de producción en el año 2018.

Municipio	Superficie cultiva (ha)	Valor de la producción (MXN)
Villa Guerrero	450	696,504,250
Tenancingo	204	548,274,000
Coatepec Harinas	104	180,746,480
Otros	62	172,665,500
<b>Total</b>	<b>820</b>	<b>1,598,190,230</b>

Fuente: SIAP (2019).

### 2.2. Patógenos de importancia en el cultivo de rosa en la zona florícola del Estado de México

El cultivo de rosa es susceptible a un amplio número de patógenos que pueden causar enfermedades en la raíz, follaje o flor (Kenneth y Cloyd, 2007). *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea* son patógenos importantes de dicho

cultivo en la región florícola del sur del Estado de México. Las enfermedades que ocasionan corresponden a la pudrición blanca de la raíz, marchitez de la planta y el moho gris de la flor, respectivamente; las cuales, provocan serias pérdidas de rendimiento y calidad (García-Velasco *et al.*, 2017; García-Velasco *et al.*, 2012; Camacho, 2009).

### **2.2.1. *R. necatrix***

De acuerdo con Ju y Rogers (2019), *Rosellinia necatrix* (anomorfo: *Dematophora necatrix* Berl) se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Xylariales

**Familia:** Xylariaceae

**Género:** *Rosellinia*

**Especie:** *R. necatrix*

La enfermedad causada por *R. necatrix* se presenta en manchones, sobre todo en zonas del terreno con exceso de humedad. En el suelo se pueden observar las raíces invadidas por cordones miceliales blanco algodonoso que se tornan a negro cuando envejece; así mismo, en la parte aérea, las plantas presentan escaso follaje, además de muerte de ramas; las hojas muertas pueden permanecer adheridas a las ramas durante largo tiempo. En campo algunas de las plantas que se encuentran infectadas no presentan síntomas en la parte aérea esto se debe a que la



sintomatología depende de la edad de la planta y de la severidad de la enfermedad (García-Velasco *et al.*, 2012; Domínguez, 2008).

El principal método de manejo que se emplea en la región es el químico, utilizando diferentes ingredientes activos como quintozeno, benomilo, fluazinam y tiofanato metílico. Al respecto, Domínguez en 2008, reportó que el patógeno ha perdido sensibilidad a quintozeno.

### **2.2.2. *V. dahliae***

Clasificación taxonómica de *Verticillium dahliae* (Kirk, 2019):

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Glomerellales

**Familia:** Plectosphaerellaceae

**Género:** *Verticillium*

**Especie:** *V. dahliae*

*Verticillium dahliae* afecta al cultivo de rosa cuando este se establece en zonas donde previamente estuvo algún otro cultivo susceptible, como frutales u hortalizas. Cabe señalar que el fitopatógeno puede sobrevivir en el suelo por largos periodos (Kenneth y Cloyd, 2007).

En general, los síntomas que presenta la planta de rosa son: marchitamiento en las hojas jóvenes y amarillamiento en las hojas inferiores; posteriormente se produce

marchitamiento total. Las hojas presentan color amarillo que finalmente se tornan a color marrón a medida que se marchitan y mueren (García-Velasco *et al.*, 2017; Kenneth y Cloyd, 2007).

El manejo que se da a esta enfermedad consiste en la eliminación de plantas infectadas, desinfección del suelo a través de vapor o por la aplicación de fungicidas, manejo del agua de riego y el uso de material propagativo libre del patógeno (Figueroa *et al.*, 2002).

### **2.2.3. *B. cinerea***

*Botrytis cinerea* (teleomorfo: *Botrytinia fuckeliana* Pers.) se ubica en la siguiente clasificación taxonómica (Kirk, 2019):

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Leotiomycetes

**Orden:** Helotiales

**Familia:** Sclerotiniaceae

**Género:** *Botrytis*

**Especie:** *B. cinerea*

Los daños causados por *B. cinerea* en cultivo de rosa ocurren en el almacenamiento o durante el transporte, ya que en estos sitios se encuentran las condiciones para que el patógeno se desarrolle. Los síntomas que ocasiona son pequeñas manchas marrones en los pétalos, las puntas o los lados se vuelven marrones y suaves. Las infecciones son obvias en los cultivares de rosa con flores blancas.

El manejo es de tipo químico, algunos de los ingredientes activos que se utilizan son: tiabendazol, benomil, tiofanato de metilo, carbendazim, iprodiona, tebuconazol y procloraz; sin embargo, se ha reportado que en la región florícola ha perdido sensibilidad a tiabendazol, procloraz e iprodiona (Camacho, 2009) y que ha desarrollado resistencia a tiabendazol (López, 2019; Manzanos-Ayala *et al.*, 2019).

### **2.3. El género de *Trichoderma***

De acuerdo con Kirk *et al.* (2018), el género *Trichoderma* spp. se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Hypocreaceae

**Género:** *Trichoderma*

En la mayoría de las especies solo observan esporas asexuales, por lo que se desconoce el estado sexual. Cuando la etapa sexual se presenta, las especies se clasifican dentro del género *Hypocrea* (Kubicek y Harman, 2002). Es un hongo de vida libre, está presente en suelos de cualquier sitio. Se encuentra en la rizosfera y en materia orgánica en estado de descomposición y no es complicado aislarlo en medio de cultivo (Howell, 2003).

#### **2.4. Distribución mundial de *Trichoderma* spp.**

Las especies del género *Trichoderma* se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo y están presentes en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos suelos con altos contenidos de materia orgánica y en residuos de cultivos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo es favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente (Salazar *et al.*, 2012).

#### **2.5. Características morfológicas y culturales de *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* spp., es un hongo de rápido crecimiento, presenta micelio septado y ramificado, fiálides hialinas en forma de matraz que en algunas especies pueden ser redondas y en otras ovaladas, las fiálides terminales en la mayoría de las especies tienden a ser alargadas; en cuyo extremo se forman los conidios, el color puede ser de tonalidades verdes y menos frecuente en marrones y grises, también desarrollan clamidosporas que tienden a ser globosas y pueden estar intercaladas o encontrarse al final del micelio (Kubicek y Harman, 2002).

En cuanto a características culturales en medio de cultivo papa, dextrosa y agar, las colonias presentan crecimiento a 25 °C, son de aspecto algodonoso y compacto conforme maduran. En ausencia de luz el micelio es blanco algodonoso; por el contrario con presencia de luz se observa esporulación con tonalidades verdosas. Algunas especies pueden formar anillos concéntricos, al reverso de la caja se puede observar pigmentación amarillenta y en otros casos blanca. Los olores mohosos se producen comúnmente por diferentes especies de *Trichoderma*, uno de los más

característicos es el que se asemeja al de coco (Kubicek y Harman, 2002; Windham *et al.*, 1989).

## **2.6. Condiciones óptimas de desarrollo de *Trichoderma* spp.**

El género requiere de temperaturas en un intervalo de 15 a 35 °C, siendo la óptima de 25 °C, en algunos casos las especies pueden soportar temperaturas de 4 °C y hasta de 41 °C. La humedad relativa con la que es capaz de crecer se encuentra entre 20 y 80%. Puede crecer en suelos con pH de 5.5 a 8.5, siendo el óptimo de 5.5 a 6.5; pero puede sobrevivir en intervalos mayores, ya que tiene la capacidad de acidificar el medio. La luz es otro factor importante, fundamentalmente para la esporulación y la producción de metabolitos secundarios (Martínez *et al.*, 2013).

## **2.7. *Trichoderma* spp. como agente de control biológico**

*Trichoderma* spp., tiene potencial como agente de control biológico contra diversos fitopatógenos fúngicos al competir por nutrientes y espacio (Benitez *et al.* 2004; Windham *et al.*, 1989). Los mecanismos antagónicos dependen de la cepa de *Trichoderma* spp., así como del fitopatógeno, de la planta y de las condiciones ambientales que incluye la disponibilidad de nutrientes, el pH y la temperatura. La activación de cada mecanismo implica la producción de compuestos y metabolitos específicos (Benitez *et al.*, 2004).

Entre sus mecanismos de acción se encuentran: micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, antibiosis por metabolitos volátiles y no volátiles, desactivación de enzimas del patógeno, promoción de crecimiento vegetal e inducción de

resistencia sistémica (Infante *et al.*, 2009., Guigón y Gonzáles, 2004; Vera *et al.*, 2002; Selitrennkoff, 2001; Howell *et al.*, 2000; Altomare *et al.*, 1999).

### **2.7.1. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es definido como una simbiosis de tipo parasítica entre organismos, generalmente están implicadas enzimas extracelulares como las quitinasas y celulasas, que son parte de la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parásitos (Infante *et al.*, 2009). Durante el proceso de micoparasitismo ocurren cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento y actividad lítica.

En el crecimiento, quimiotrófico las especies de *Trichoderma* spp. crecen en dirección al patógeno debido a estímulos químicos, posteriormente ocurre el reconocimiento que se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos; cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* spp. se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos, se enrollan alrededor de estas, las penetran y se alimenta. La degradación de las paredes celulares del hospedante ocurre debido a la actividad lítica donde se producen enzimas líticas extracelulares, las cuales son quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* spp. (Infante *et al.*, 2009).

### **2.7.2. Competencia por espacio y nutrientes**

*Trichoderma* spp. está biológicamente adaptado para colonizar rápidamente a los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, su abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Infante *et al.*, 2009).

### **2.7.3. Antibiosis por metabolitos volátiles y no volátiles**

Numerosas cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico; tales sustancias inhibidoras son consideradas “antibióticos” (Infante *et al.*, 2009). Los metabolitos antifúngicos más conocidos del género *Trichoderma* spp. son: gliotoxina, gliovirina, viridina, entre otros (Selitrennikoff, 2001), así como también metabolitos volátiles y difusibles, tales como son trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticina, richotoxina, que afectan negativamente el desarrollo de patógenos. Entre los volátiles los más efectivos son las alquil pionas; y entre los difusibles se encuentran clilosporina, isonitrilo. (Vinale *et al.*, 2006; Santamarina *et al.*, 2005; Guigón y Gonzáles, 2004).

### **2.7.4. Desactivación de enzimas del patógeno**

La desactivación de enzimas de los patógenos por parte de *Trichoderma* spp. constituye un mecanismo de antagonismo indirecto poco estudiado (Martínez *et al.*,

2013). Resultados de investigaciones demuestran que *T. harzianum* Rifai secreta una proteasa que degradan las enzimas que utiliza *B. cinerea* para atacar la pared celular de las plantas (Chérif y Benhamou, 1990), mientras que *T. viride* Pers. produce glucosidasa para degradar una fitotoxina de *Rhizoctonia solani* Kühn (Harman, 2000). El potencial enzimático de *Trichoderma* spp. para detener el proceso infeccioso de los patógenos es mucho mayor, pues este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos (Martínez *et al.*,2013).

### **2.7.5. Promoción de crecimiento vegetal**

*Trichoderma* spp. promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que produce metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal, además de la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces, libera hormonas de crecimiento como: auxinas, giberelinas y citoquininas, que estimulan la germinación y desarrollo vegetal (Vera *et al.*, 2002; Altomare *et al.*, 1999).

### **2.7.6. Inducción de resistencia sistémica**

*Trichoderma* spp. activa el sistema de defensa de la planta al ponerse en contacto con la planta por flujos rápidos de iones, y debido al sistema enzimático oxidativo. Además induce a la producción de compuestos relacionados con la resistencia de fitopatógenos, como la elevación de terpenoides, también se involucra ácido salicílico (AS) y jasmonato/etileno, esto da como resultado que la planta adquiera diversos grados de tolerancia a la invasión de patógenos (Mukherjee *et al.*, 2012; Howell *et al.*, 2000).



## **2.8. Principales especies de *Trichoderma* spp. utilizadas como agentes de control biológico**

Algunas de las especies más utilizadas de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico son: *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. hamantum*, *T. asperellum*, *T. reesei* y *T. koningii* (Hajjehgrari *et al.*, 2008). En numerosos trabajos realizados con aislamientos de *Trichoderma* spp. se utilizan cepas nativas, ya que se encuentran más adaptadas al lugar de estudio, incluyendo condiciones como la temperatura, pH, entre otros (Villalpando *et al.*, 2016).

Algunos de los patógenos más estudiados y con los que se han obtenido resultados satisfactorios son: *Sclerotinia sclerotiorum* Lib, *B. cinerea*, *V. dahliae*, *Phytophthora capsici* Leonian, *R. necatrix*, *Monoliophthora roreri* Cif y Par. (Villalpando *et al.*, 2016; Sanabria y Graboswaski, 2016; Villamil *et al.*, 2015; Allori *et al.*, 2014; Guigón-López y González-González, 2004; Martinn-Corder y de Mole, 1998).

Los cultivos en los que se ha utilizado como agente de control biológico son comestibles, entre estos: mango (*Mangifera indica* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), fresa (*Fragaria* sp.), macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden y Betché), cacao (*Theobroma cacao* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), entre otros (Sanabria y Graboswaski, 2016; Villamil *et al.*, 2015; Merchán-Gaitán *et al.*, 2014; Michel-Aceves *et al.*, 2008; Lisboa *et al.*, 2007; Guigón-López y González-González, 2004).

Como se puede observar, los estudios están dirigidos a cultivos de importancia alimenticia; existe poca información de su aplicación en cultivos ornamentales. Al respecto, Soto *et al.* (2002), realizaron una investigación sobre el uso de *T. harzianum* como estimulador de crecimiento y floración en belen (*Impatiens hawkeri* W. Bull), cultivado en invernadero, a las plantas las inocularon con diferentes concentraciones de esporas ( $10^5$ ,  $10^6$ , y  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  de suelo); diez semanas después presentaron mayor crecimiento (altura, número de hojas y de flores) respecto a las plantas no inoculadas; además, las flores se desarrollaron en menor tiempo. Cabe mencionar que el trabajo trata sobre estimulación de crecimiento y floración, no como agente de control biológico.

En distintos países se ha implementado el manejo biológico de fitopatógenos con cepas nativas de *Trichoderma* spp., tal es el caso de Colombia, Argentina, Paraguay, China, Venezuela y en México; en este último, principalmente en los estados de Guerrero, Chihuahua, Tamaulipas, por mencionar algunos (Sanabria y Graboswaski, 2016; Villamil *et al.*, 2015; Merchán-Gaitán *et al.*, 2014; Xiaojun *et al.*, 2014; Salazar *et al.*, 2012; Guigón-López y González-González, 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En el año 2018, en el Estado de México se cultivaron bajo invernadero 820 ha de rosa para flor de corte. Este cultivo se ve afectado por diferentes microorganismos que afectan tanto la raíz como la parte aérea de la planta. Entre los fitopatógenos del suelo se reportan *Rosellinia necatrix* que causa la pudrición blanca, *Verticillium dahliae* agente causal de la marchitez; y en la parte aérea *Botrytis cinerea* dañando al botón floral el cual provoca el moho gris.

Por décadas el manejo de dichos fitopatógenos se ha basado en el uso de fungicidas de síntesis química; sin embargo, en la actualidad se conocen diferentes estrategias de manejo como el uso de agentes de control biológico del género *Trichoderma*, el cual cuenta con diferentes mecanismos de acción. Es importante destacar, que para tener mayores beneficios se requiere que las cepas sean nativas, ya que están adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de la región.

En la región florícola del Estado de México, no existen reportes del aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp.; por lo que en el presente trabajo se tiene por objetivo: aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. de un bosque de encino deteriorado del municipio de Tenancingo, Estado de México, México; y determinar la actividad antagónica *in vitro* de estas y de las cepas TFR3 y TA4, obtenidas en estudios previos, frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.

#### 4. HIPÓTESIS

Los suelos forestales son reservorios de una gran diversidad de microorganismos, entre ellos diversos géneros y especies de hongos benéficos; por lo que se aislarán cepas nativas de *Trichoderma* spp. de una zona forestal del municipio de Tenancingo, Estado de México, México.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. provenientes de un bosque de encino deteriorado y la cepas TFR3 y TA4, obtenidas en estudios previos, presentarán diferente actividad antagónica *in vitro* frente a los patógenos de rosa: *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. de un bosque de encino deteriorado del municipio de Tenancingo, Estado de México, México; y determinar la actividad antagónica *in vitro* de estas y de las cepas TFR3 y TA4, obtenidas en estudios previos, frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. a partir de un bosque de encino deteriorado de la localidad de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México.
2. Obtener cultivos puros y monospóricos de las colonias de *Trichoderma* spp.
3. Identificar morfológicamente a nivel género a las cepas de *Trichoderma* spp.
4. Identificar molecularmente las cepas obtenidas y la TFR3 y TA4.
5. Determinar el grado de competencia de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.
6. Determinar el efecto de metabolitos secundarios volátiles y difusibles de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.
7. Determinar la capacidad de micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* spp. a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Colecta de muestras de suelo

Se realizó un muestreo de suelo en un bosque de encino deteriorado de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México, ubicada en la latitud 18.990538 y longitud -99.542815 (Figura 1); siguiendo la técnica de Guigón-López y colaboradores (2004) y Howell (2003). Se seleccionaron cinco puntos de muestreo, de cada uno se tomó una muestra de suelo de 200 g, a 20 cm de profundidad en la rizosfera; en total por los cinco puntos muestreados se obtuvo 1 kg de suelo.



**Figura 1.** Lugar de muestreo en ambiente natural de bosque de encino deteriorado ubicado en la localidad de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México.

Las muestras se llevaron al laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en Carretera Tenancingo Villa Guerrero km. 1.5 Tenancingo, Estado de México, C.P. 52400, donde se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

## **6.2. Aislamiento de *Trichoderma* spp.**

Las cinco muestras de suelo se homogenizaron y se tomó una submuestra de 10 g que fue incorporada a 90 mL de agua destilada estéril y se agitó durante 20 minutos en una placa de agitación (Cimarec®). En seguida se tomó una alícuota de 1 mL que se diluyó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. Estas diluciones se realizaron cinco veces consecutivas; de las últimas tres se tomó 1 mL que se adicionó en medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp., el cual contiene 0.2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.9 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15 g L<sup>-1</sup> de KCL, 1.0 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 3.0 g L<sup>-1</sup> de Glucosa, 0.25 g L<sup>-1</sup> de Cloranfenicol, 0.2 g L<sup>-1</sup> de PCNB, 0.075 g L<sup>-1</sup> de Rosa de bengala, 20.0 g L<sup>-1</sup> de Agar, 0.04 g L<sup>-1</sup> de Captan (Askew *et al.*, 1993); adicionalmente se realizaron siembras en dicho medio de cultivo, pero sin incorporar fungicidas.

Las siembras se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a temperatura ambiente (21±2 °C) y luz natural. Diariamente se revisaron con la finalidad de identificar la presencia de crecimiento micelial típico de *Trichoderma* spp. cuyas características son: micelio algodonoso y compacto conforme van envejeciendo; en ausencia de luz el micelio es de color blanco algodonoso; sin embargo, con presencia de ésta existe esporulación, lo cual se hace evidente con tonalidades

verdosas, en algunos casos tienen apariencia de anillos en forma concéntrica, al reverso de la caja se puede observar pigmentación amarillenta (Windham *et al.*, 1989).

De las colonias que se sospechó que se trataba del género *Trichoderma* spp. se realizaron preparaciones temporales y se observaron bajo microscopio compuesto (CARL ZEISS®). Las estructuras que se buscaron en las muestras fueron: fiálides, micelio septado, clamidiosporas y conidios, y se corroboraron con claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998); Windham *et al.* (1989), y literatura especializada de Kubicek y Harman (2002).

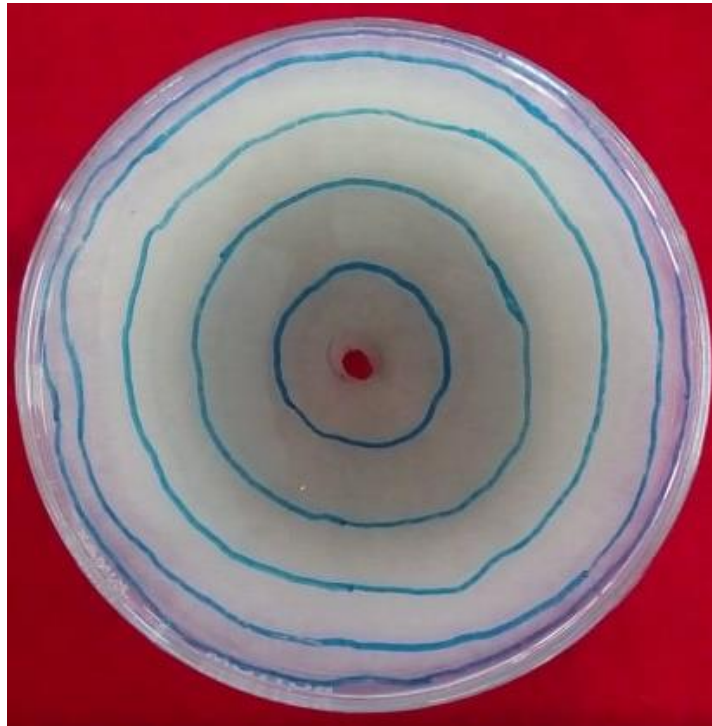
### **6.3. Obtención de cultivos monospóricos**

De las cepas obtenidas se realizaron cultivos monospóricos; esta técnica consistió en colocar a la colonia de *Trichoderma* spp. con crecimiento de siete días, 15 mL de agua destilada estéril, posteriormente con una varilla de aluminio estéril se dispersaron las esporas y 1 mL de solución se transfirió a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, a partir de esta se realizaron seis diluciones seriadas y de cada tubo se tomó 1 mL y se incorporó en medio de cultivo agar, dextrosa y papa (PDA) (BDBioxon®) dispersándolo con una varilla de aluminio estéril.

Las siembras se revisaron cada 24 horas; una vez que se detectó crecimiento se transfirió por separado a una nueva caja de Petri (Kimax®) con medio PDA (las seis colonias monospóricas de mayor tamaño). Cada 24 h, con el apoyo de un marcador indeleble de punto fino, se trazó el crecimiento radial hasta que al menos una cubrió por completo el medio de cultivo de la caja de Petri (Figura 2), se tomaron fotografías



y se determinó el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43). Los datos se analizaron con una regresión lineal simple con el programa InfoStat versión estudiantil, y a partir de esta información se determinó la tasa de crecimiento.



**Figura 2.** Trazo del área de crecimiento micelial, cada 24 horas, de cultivos monospóricos de *Trichoderma* spp.

Se realizó el conteo de esporas para determinar la concentración por mililitro en cada cultivo monospórico. Esto consistió en colocar la respectiva colonia de *Trichoderma* spp. con siete días de edad 10 mL de agua destilada estéril, posteriormente se dispersaron las esporas con una varilla de aluminio estéril; con ayuda de una micropipeta (Boeco®) se tomaron 2 mL de la suspensión y se depositaron en un tubo (Eppendorf®). A partir de esta suspensión, se realizó el conteo de esporas con una cámara de Neubauer (Marienfeld®) visualizada en

microscopio compuesto (CARL ZEISS®). La determinación de número de esporas se realizó mediante las siguientes fórmulas:

- a) Número de esporas contadas x 50= número de esporas mm<sup>-3</sup>
- b) Número de esporas mm<sup>-3</sup> x 1000= número de esporas mL<sup>-1</sup>

Como criterios descritos para la selección de los cultivos monospóricos, por cada cepa se seleccionó aquel que presentó la mayor tasa de crecimiento y esporulación.

#### **6.4. Identificación morfológica de *Trichoderma* a nivel género**

Se realizó la identificación morfológica de las cepas a nivel de género basándose en claves taxonómicas y literatura especializada (Kubicek y Harman, 2002; Barnett y Hunter, 1998; Windham *et al.*, 1989). Para lo cual se realizó la técnica de microcultivos (Ramírez-Gama *et al.*, 2015), que consiste en colocar en una caja de Petri papel absorbente, un triángulo de aluminio y sobre este un porta objetos y un disco de medio de cultivo PDA sobre el que se inoculó en uno de los extremos la respectiva cepa de *Trichoderma* spp. por último se colocó agua glicerinada al 5% en el papel absorbente.

Los microcultivos se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio. Todos los días se revisó el desarrollo micelial alrededor de los discos de medio de cultivo PDA. Tres días después de la siembra, con ayuda de pinzas de disección estériles, los cubreobjetos se separaron cuidadosamente el disco tratando de no dañar el desarrollo de los hongos adheridos, por último se colocó la muestra en un portaobjetos con azul de algodón y se revisaron bajo microscopio.

## 6.5. Identificación molecular a nivel especie

Las cepas SS1, SS2, TA4 y TFR3, se cultivaron en medio de cultivo PDA y se transfirió una porción del crecimiento para realizar la extracción de ADN genómico con el kit de extracción AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Por PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) se amplificaron las regiones internas ITS4 e ITS5 de los genes ribosomales (ARN) 18S–5.8S y 5.8S–28S; esto con los cebadores universales ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Professional estándar (Biometra®, Alemania) en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 0.75 mM, dNTP's 0.2 mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen®, USA), 10 µM de cada iniciador y 80 ng de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final a 72 °C por 4 min. Se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, la tinción se realizó con bromuro de etidio (5 mg L<sup>-1</sup>) y los geles se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad®, USA).

Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones (5'– 3' y 3'– 5') por la compañía Macrogen Korea. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.0.0 (Hall, 1999) y se alinearon con la base de datos del GenBank-NCBI (NCBI, 2019).

## **6.6. Determinación de los mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea***

### **6.6.1. Material biológico**

Adicional a las cepas que se aislaron en el presente trabajo, se utilizaron las cepas TA4 y TFR3 pertenecientes a la colección del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo. La cepa TA4 fue aislada de plantas de Alstroemeria (*Alstroemeria* sp.) con síntomas de marchitez, provenientes del municipio de Villa Guerrero; y la TFR3 fue aislada de un cultivo de rosa infectado con *R. necatrix* en el municipio de Tenancingo, Estado de México.

Los patógenos también pertenecen a la colección del Laboratorio de Fitopatología, *R. necatrix* (VG2GR) y *V. dahliae* (V.D) fueron aisladas en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México y *B. cinerea* (TBC2) del municipio de Tenancingo, Estado de México; todos provenientes del cultivo de rosa.

Antes de realizarse las pruebas para determinar los mecanismos de acción del antagonista, las cepas de los patógenos y de *Trichoderma* spp. se sembraron en medio de cultivo PDA, posteriormente se colocaron en una incubadora (LINDBERG/BLUEM®) a temperatura de 25 °C± 1 °C. Cabe señalar que para todos los experimentos se utilizaron cepas de siete días de edad.







### **6.6.2. Competencia**

Se determinó el grado de competencia mediante cultivos duales en cajas de Petri de cristal con medio de cultivo PDA (Bell y Markham, 1982). Para ello, se tomaron

discos de medio de cultivo con crecimiento micelial de 8 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. y de los fitopatógenos y se colocaron en los extremos de la caja de Petri separándolos aproximadamente 6 cm, las siembras fueron incubadas a  $25 \pm 1$  °C, bajo condiciones de luz natural. Cabe señalar que solo en el caso de *V. dahliae* se sembró tres días antes que *Trichoderma* spp., ya que el crecimiento de este microorganismo es lento.

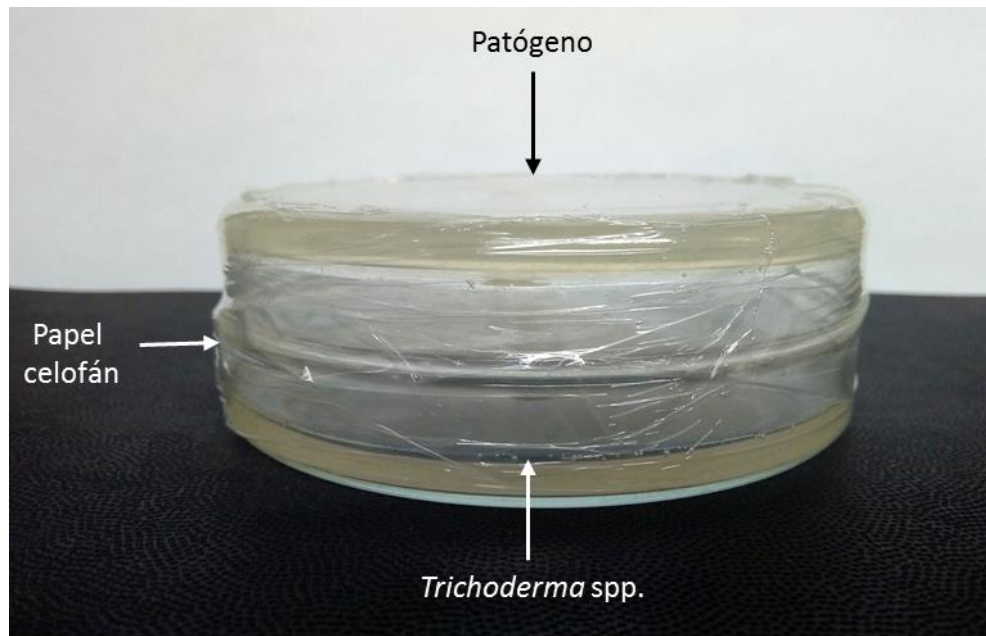
El experimento se revisó diariamente y se registró la fecha en que los patógenos y las cepas de *Trichoderma* spp. establecieron contacto. Quince días después de la siembra (dds) se determinó la clasificación de antagonismo por medio del pictograma propuesto por Bell y Markham (1982), modificado por Ruiz (2010) (Cuadro 2), y se trazó el área de crecimiento micelial del respectivo patógeno para determinar el área de crecimiento, para esto se tomaron fotografías del reverso de la caja y se utilizó el programa Image J (versión 1.43).

**Cuadro 2.** Clasificación de antagonismo de *Trichoderma* sobre fitopatógenos de acuerdo a Bell y Markham (1982), modificado por Ruiz (2010).

Clase	Pictograma	Descripción
1		<i>Trichoderma</i> crecido completamente sobre el fitopatógeno
2		<i>Trichoderma</i> crecido sobre el fitopatógeno de 2/3 partes.
3		<i>Trichoderma</i> y fitopatógeno crecido ambos a la mitad de la superficie del medio y ninguno de los organismos parece dominar al otro.
4		Fitopatógeno crecido menos de 2/3 partes de la superficie del medio y parece resistir la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5		Fitopatógeno crecido sobre <i>Trichoderma</i> menos de 2/3 partes.
6		Fitopatógeno crecido completamente sobre <i>Trichoderma</i> .

### 6.6.3. Antibiosis por metabolitos volátiles

El efecto por metabolitos volátiles se determinó con la técnica de cajas superpuestas (Allori *et al.*, 2014). Para esto, por separado se sembraron discos de medio de cultivo de 8 mm de diámetro con crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. y de los patógenos; enseguida se confrontaron el antagonista y el respectivo patógeno colocando dos bases de las cajas de Petri separadas por un papel celofán estéril, se sellaron e incubaron a  $25 \pm 1$  °C bajo condiciones de luz natural (Figura 3).



**Figura 3.** Técnica de cajas superpuestas para determinar el efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. frente a *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea*.

El crecimiento micelial de los fitopatógenos se trazó cada 24 h con el apoyo de un marcador indeleble de punto fino; para el caso de *V. dahliae* se marcó cada 48 h debido a su lento crecimiento. El experimento se dio por finalizado cuando al menos uno de los testigos de cada patógeno llenó por completo una caja de Petri; en el caso de *V. dahliae*, el experimento finalizó 15 días después de la siembra (dds). En

todos los casos se tomaron fotografías para determinar el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43).

#### **6.6.4. Antibiosis por metabolitos difusibles**

Para determinar el efecto inhibitorio de metabolitos difusibles se utilizó la técnica de papel celofán (Dennise y Webster, 1971) que consistió en colocar papel celofán estéril sobre el medio de cultivo PDA, posteriormente se colocó un disco de 8 mm de diámetro de *Trichoderma* spp., las siembras se incubaron a  $25 \pm 1$  °C. Después de 48 h se retiró el papel celofán con *Trichoderma* spp., lo cual se realizó con la ayuda de dos pinzas estériles doblando los extremos del mismo, esto para que ninguna espora del antagonista contaminara el medio PDA; una vez retirado el papel se colocó al respectivo fitopatógeno y se incubaron bajo las condiciones descritas con anterioridad.

El crecimiento micelial de los fitopatógenos fue marcado con el apoyo de un marcador indeleble de punto fino cada 24 h y para el caso de *V. dahliae* cada 48 h debido a su lento crecimiento. El experimento concluyó hasta que al menos uno de los testigos llenó por completo la caja de Petri; para *V. dahliae* el experimento finalizó 15 dds. De todas las repeticiones se tomaron fotografías para determinar el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43).



### **6.6.5. Micoparasitismo**

Se utilizó la técnica de microcultivos (Ramírez-Gama *et al.*, 2015), descrita en el apartado 6.4; pero en este caso en un extremo del disco de medio de cultivo PDA se colocó al respectivo patógeno y en el otro extremo la cepa de *Trichoderma* spp., al tercer día se retiró el cubre objetos y este se fijó en un portaobjetos con azul de algodón, posteriormente se visualizó en un microscopio compuesto (CARL ZEISS®). y se tomaron fotografías con la cámara fotográfica (CANNON®) integrada al microscopio.

Se identificó y se evidenció el micoparasitismo que ejerció *Trichoderma* spp. sobre los fitopatógenos. Se consideró como micoparasitismo cuando el micelio de *Trichoderma* spp. se encontró en contacto o adherido al micelio del patógeno, enrollamiento y lisis de las paredes celulares del fitopatógeno o haustorios de *Trichoderma* spp. en las hifas del fitopatógeno (Howell, 2003).

### **6.6.6. Diseño experimental y análisis estadístico**

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron por patógeno y mecanismo de acción con el programa InfoStat, versión estudiantil, por medio de un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ( $P > 0.05$ ).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp.**

De las siembras realizadas a partir de un suelo forestal de san Simonito, Tenancingo, Estado de México, México, en el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* que contenía fungicidas no se obtuvo ningún aislamiento; pero sí del medio sin fungicidas, del cual, a pesar de que desarrollaron otros hongos, se aislaron dos colonias nombradas: SS1 y SS2. De cada una de estas, se obtuvieron seis cultivos monospóricos.

### **7.2. Selección de cultivos monospóricos**

En el caso de la cepa SS1 se eligió el monospórico SS1-6 ya que la tasa de crecimiento que presentó fue de 13.992 cm<sup>2</sup>, mayor a los demás monospóricos; en lo que respecta a la esporulación, fue la segunda colonia con mayor cantidad de conidios. Para la cepa SS2 se eligió el monospórico SS2-5 ya que presentó la mayor esporulación en comparación con la de mayor crecimiento (Cuadro 3).

### **7.3. Caracterización cultural**

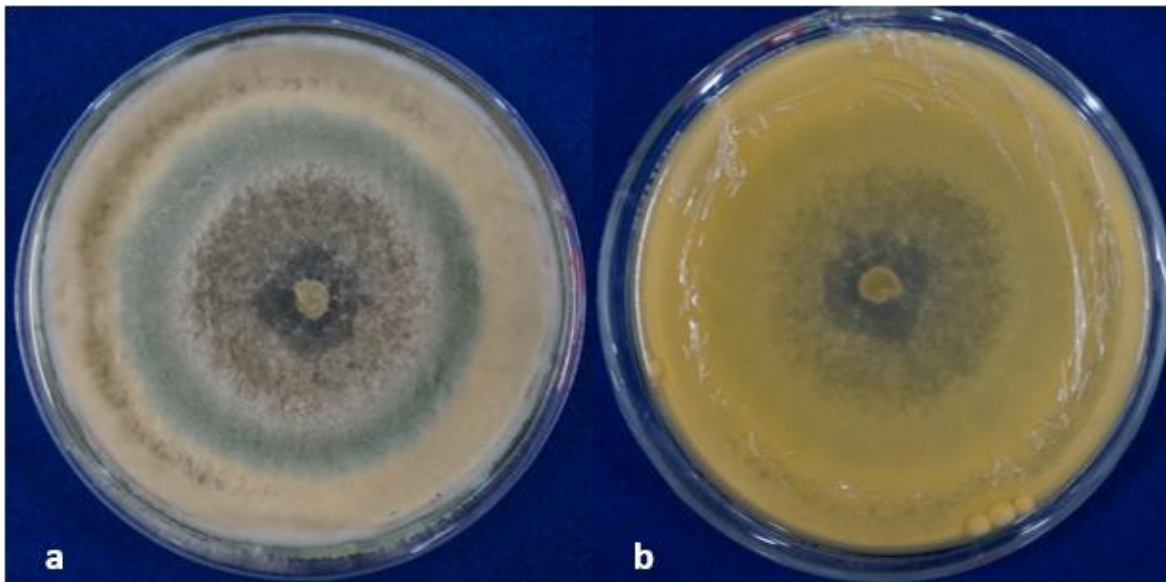
Se realizó una caracterización cultural en medio de cultivo PDA; las características que presentaron fueron: colonias con micelio blanco algodonoso y compacto conforme envejecieron; presentaron tonalidades verdosas, debido a la producción de conidios, con apariencia de anillos concéntricos debido a la producción de conidios (Windham *et al.*, 1989). En el caso de la SS1 al reverso de la caja, se puede

observar pigmentación amarillenta (Figura 4). La SS2, se caracterizó por presentar grumos en los que se presentan esporas (Figura 5).

**Cuadro 3.** Tasa de crecimiento y esporulación de los cultivos monospóricos de las colonias SS1 y SS2.

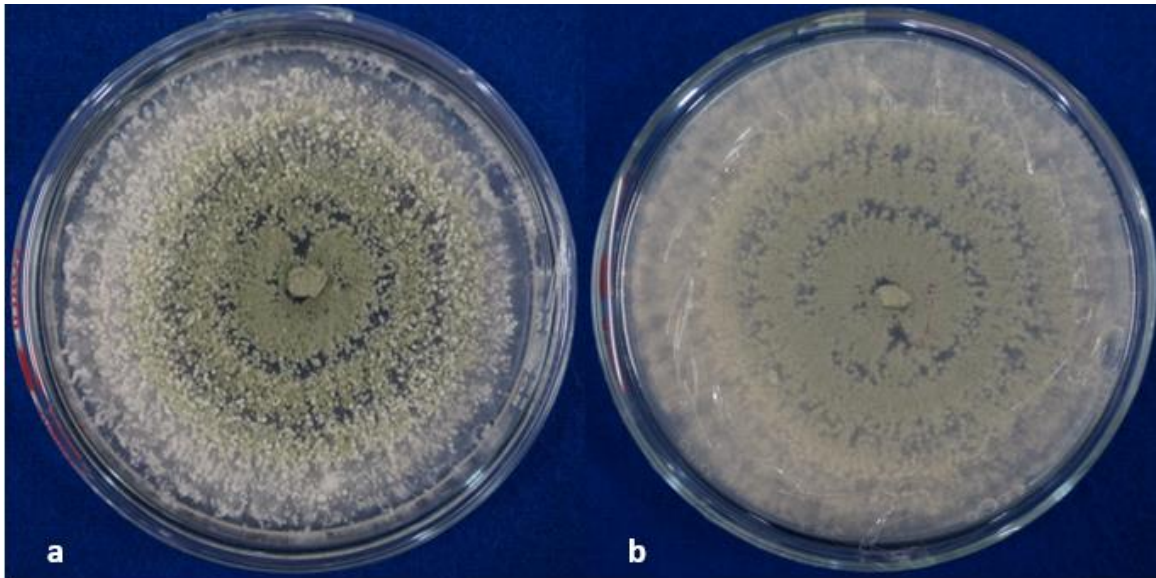
Monospórico	Tasa de crecimiento(cm <sup>2</sup> )	Esporulación
SS1-1	10.915	2.2x10 <sup>7</sup>
SS1-2	11.456	3.2x10 <sup>7</sup>
SS1-3	13.544	1.8x10 <sup>7</sup>
SS1-4	13.328	2.6x10 <sup>7</sup>
SS1-5	11.108	1.3x10 <sup>7</sup>
SS1-6*	13.992	3.1x10 <sup>7</sup>
SS2-1	10.677	1.7x10 <sup>6</sup>
SS2-2	10.488	1.5x10 <sup>6</sup>
SS2-3	10.447	1.8x10 <sup>6</sup>
SS2-4	10.473	2.2x10 <sup>6</sup>
SS2-5*	10.481	2.8x10 <sup>6</sup>
SS2-6	11.106	2.1x10 <sup>6</sup>

\* Cultivos monospóricos seleccionados.



**Figura 4.** Características culturales de la cepa SS1 en medio de cultivo PDA. a) Crecimiento micelial blanco algodonoso y anillos concéntricos verdosos

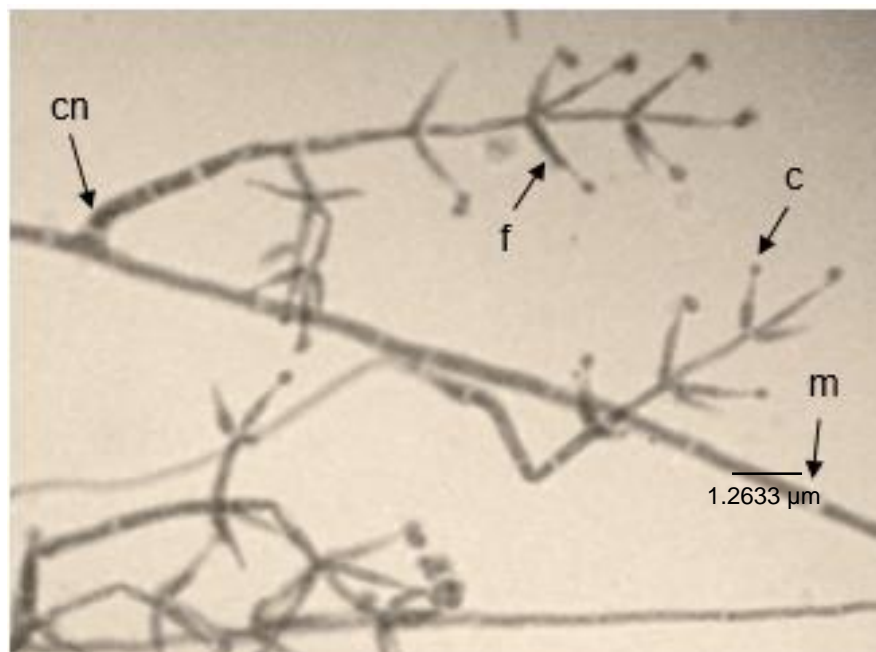
debido a la producción de conidios. b) Reverso de la caja de Petri con pigmentación amarillenta.



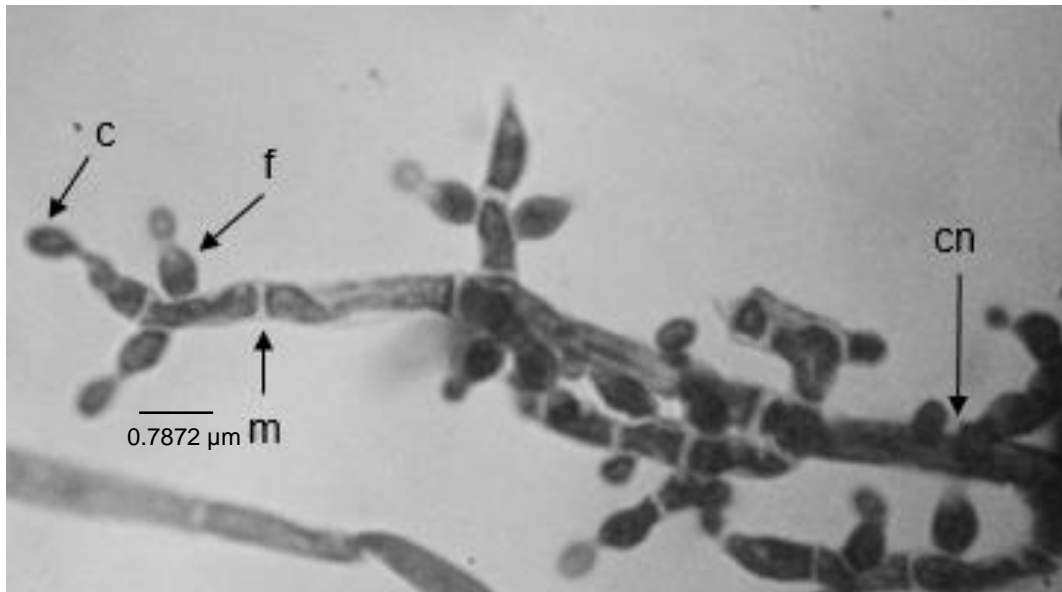
**Figura 5.** Características culturales de la cepa SS2 en medio de cultivo PDA. a) Crecimiento en forma de anillos concéntricos y crecimiento grumoso donde se agrupan las esporas. b) Reverso de la caja de Petri con pigmentación blanca.

#### 7.4. Identificación morfológica de *Trichoderma* a nivel de género

Se realizó la identificación morfológica de las dos cepas a nivel género, basándose en las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1982) y literatura especializada (Kubicek y Harman, 2002). Las características registradas para ambas cepas correspondieron a las reportadas para el género *Trichoderma*. Ambas presentaron micelio septado con pigmentación verde, conidióforos ramificados, fiálides en forma de botella y verticiladas, conidios ovalados de color verde (Figura 6 y Figura 7). En lo que respecta a las características de la SS1, se registró que los conidios en promedio median 0.232  $\mu\text{m}$  de largo y 0.161  $\mu\text{m}$  de ancho; el largo de las fiálides fue de 1.263  $\mu\text{m}$ , con una base de 0.124  $\mu\text{m}$ ; para la SS2 los conidios en promedio midieron 0.31  $\mu\text{m}$  de largo y 0.149  $\mu\text{m}$  de ancho, las fiálides 0.787  $\mu\text{m}$  de largo y 0.250  $\mu\text{m}$  en la base (Cuadro 4).



**Figura 6.** Micelio septado (m), conidióforos (cn), fiálides (f) y conidios (c) de la cepa SS1 (100x).



**Figura 7.** Micelio septado (m), conidióforos (cn), fiálides (f) y conidios (c) de la cepa SS2 (100x)

**Cuadro 4.** Identificación morfológica de *Trichoderma* spp. de las cepas SS1 y SS2 de acuerdo con el tamaño de conidios y fiálides.

Cepa	Conidios						Fiálides					
	Largo (µm)			Ancho (µm)			Largo (µm)			Base (µm)		
	Máximo	Mínimo	$\bar{x}^*$	Máximo	Mínimo	$\bar{x}^*$	Máximo	Mínimo	$\bar{x}^*$	Máximo	Mínimo	$\bar{x}^*$
<b>SS1</b>	0.35	0.09	0.232	0.24	0.04	0.161	1.76	0.86	1.263	0.25	0.06	0.124
<b>SS2</b>	0.65	0.12	0.31	0.36	0.06	0.149	1.84	0.3	0.787	0.79	0.08	0.25

\*Promedio de 30 estructuras

## 7.5. Identificación molecular a nivel de especie

Adicionalmente de las cepas SS1 y SS2 aisladas en el presente trabajo, también se realizó la identificación molecular de TA4 y TFR3 que fueron proporcionadas por el laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas y alineadas con la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica indicaron que se trata de cuatro especies del género *Trichoderma*. La cepa TFR3 corresponde a la especie *T. asperellum* Samuels, Lieckf y Nirenberg, que se alineó con los aislamientos con número de acceso MF871562.1, KU341007.1 y MF661934.1 con 100% de similitud. TA4 corresponde a *T. harzianum* Rifai con 100% de similitud con los aislamientos cuyo código de acceso son MH855833.1 y MH971264. La cepa SS1 se alineó con el aislamiento con número de acceso KR995108.1 correspondiente a *T. tomentosum* Bissett; finalmente SS2 se alineó con el aislamiento con el código de acceso MH863657.1 con 100% correspondiente a *T. barbatum* Samuels (Cuadro 5).



**Cuadro 5.** Identificación molecular de cuatro aislamientos de *Trichoderma*, utilizando los cebadores universales ITS4 e ITS5 alineados con especies mantenidas en la base de datos del NCBI.

Aislamiento	cebadores	Número de nucleótidos	Especies identificadas	Número de acceso al GenBank	Porcentaje de similitud	Datos de las accesiones	
						Hospedero/sustrato	Origen geográfico
SS1	ITS4	571	<i>T. tomentosum</i>	KR995108.1	100%	Colección	Lituania
	ITS5	571	<i>T. tomentosum</i>	KR995108.1	100%	--	--
SS2	ITS4	574	<i>T. barbatum</i>	MH863657.1	99.83%	Raíz de <i>Fragaria</i> sp.	Michigan USA
	ITS5	573	<i>T. barbatum</i>	MH863657.1	100%	--	--
TA4	ITS5	558	<i>T. harzianum</i>	MH971264.1	100%	<i>Brachycybe lecontii</i>	Arkansas USA
	ITS4	575	<i>T. harzianum</i>	MH855833.1	100%	--	--
TFR3	ITS4	555	<i>T. asperellum</i>	MF661934.1	100%	Rizosfera	
	ITS5	563	<i>T. asperellum</i>	KU341007.1	100%	Suelo	Brazil

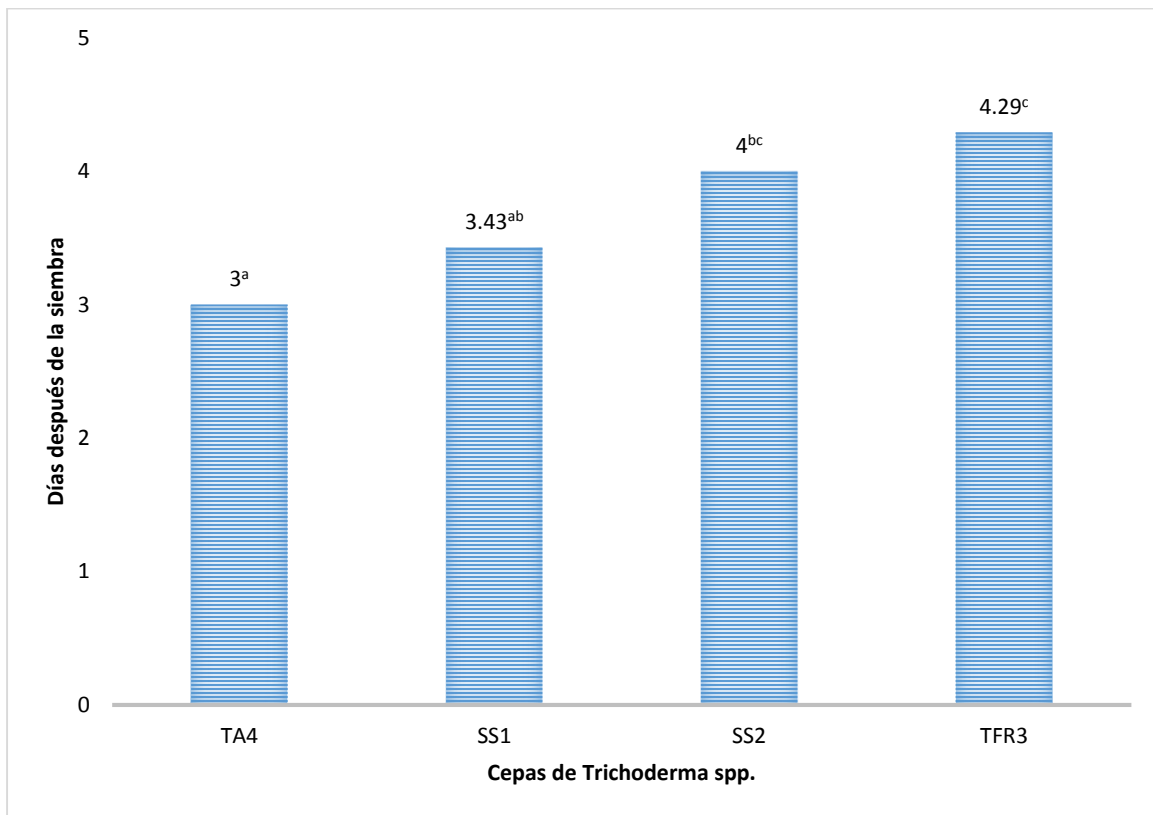
-- Información no proporcionada por la base de datos del NCBI.

## 7.6. Mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*

### 7.6.1. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. frente a *R. necatrix*

#### 7.6.1.1. Competencia

Los días al primer contacto entre el patógeno y el antagonista fueron diferentes dependiendo la cepa de *Trichoderma* spp. La velocidad de crecimiento fue mayor en TA4 y SS1 seguido por SS2 y TFR3; las cuales, en promedio los días al primer contacto fueron entre los 3 y 4 días, respectivamente (Figura 8).



**Figura 8.** Comparación de medias entre los días al primer contacto entre *R. necatrix* y *Trichoderma* spp. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ( $P > 0.05$ ).

En cuanto a la clasificación de antagonismo (Ruíz, 2010) (Cuadro 1) las cepas SS1, TA4 y TFR3 sobrecrecieron por completo al fitopatógeno, por lo que se ubicaron en la clase 1; estas cepas presentaron la mayor área de intersección, la cual fue igual al área de crecimiento de *R. necatrix*. Por su parte, la SS2 se ubicó entre las clases 4 y 5, lo que indica que el fitopatógeno resiste la invasión, e incluso que tiene la capacidad de sobrecrecer a *Trichoderma* menos de dos terceras partes (Cuadro 6, Figura 9).

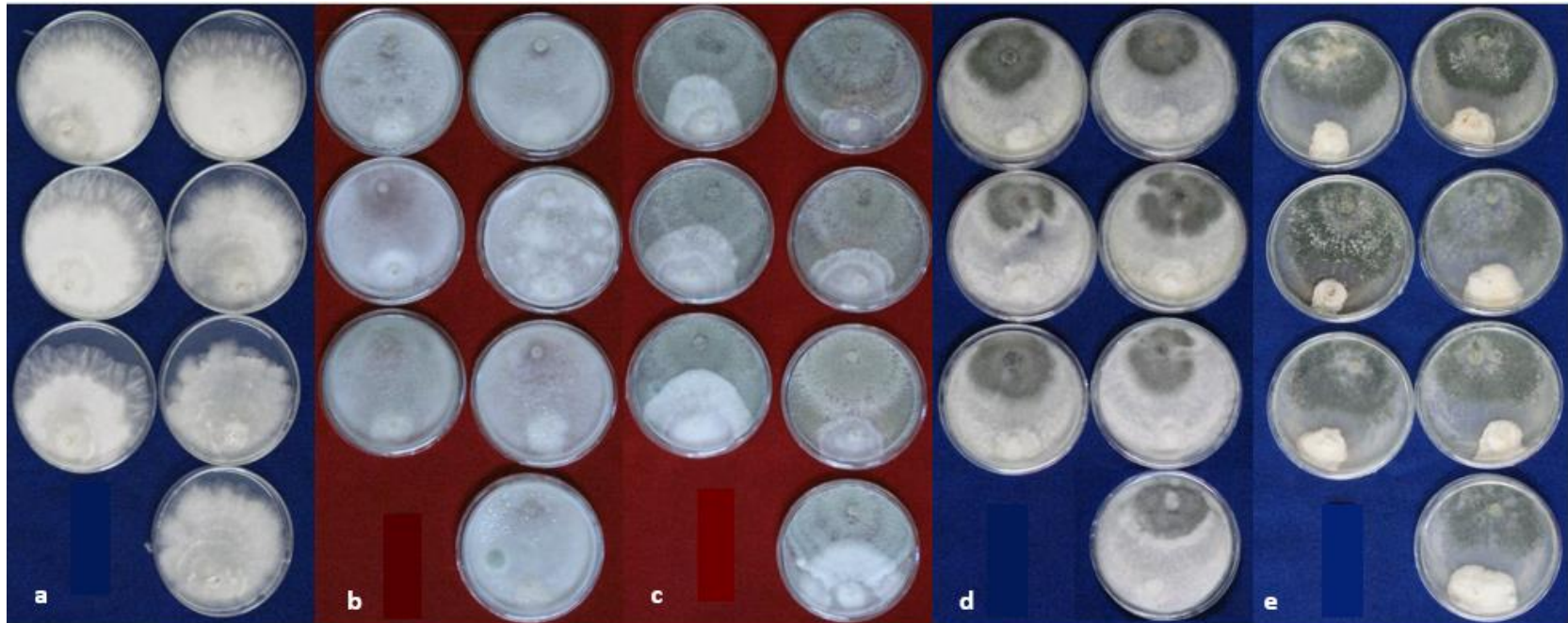
En cuanto al área de crecimiento micelial, se presentaron diferencias estadísticas significativas en las cuatro cepas respecto al testigo ( $P > 0.05$ ), donde los porcentajes de inhibición fueron los siguientes: 89, 88.4, 86.5 y 69.3%, para SS1, TA4, TFR3 y SS2, respectivamente.

**Cuadro 6.** Área de crecimiento micelial de *R. necatrix* confrontado en cultivos duales con *Trichoderma* spp., 15 días después de la siembra.

Cepa	Clasificación de antagonismo <sup>¶</sup>	Área de intersección (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*
SS1	1 <sup>a</sup>	5.51 <sup>a</sup>	5.51 <sup>a</sup>	89.0
TA4	1 <sup>a</sup>	5.79 <sup>a</sup>	5.79 <sup>a</sup>	88.4
TFR3	1 <sup>a</sup>	6.71 <sup>a</sup>	6.71 <sup>a</sup>	86.5
SS2	4.29 <sup>b</sup>	8.88 <sup>a</sup>	15.27 <sup>b</sup>	69.3
Testigo	No aplica	No aplica	49.81 <sup>c</sup>	No aplica

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

\* Respecto al testigo



**Figura 9.** Grado de competencia de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*. Disco superior corresponde a la cepa de *Trichoderma* spp. y disco inferior a *R. necatrix*. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

### 7.6.1.2. Antibiosis por metabolitos volátiles

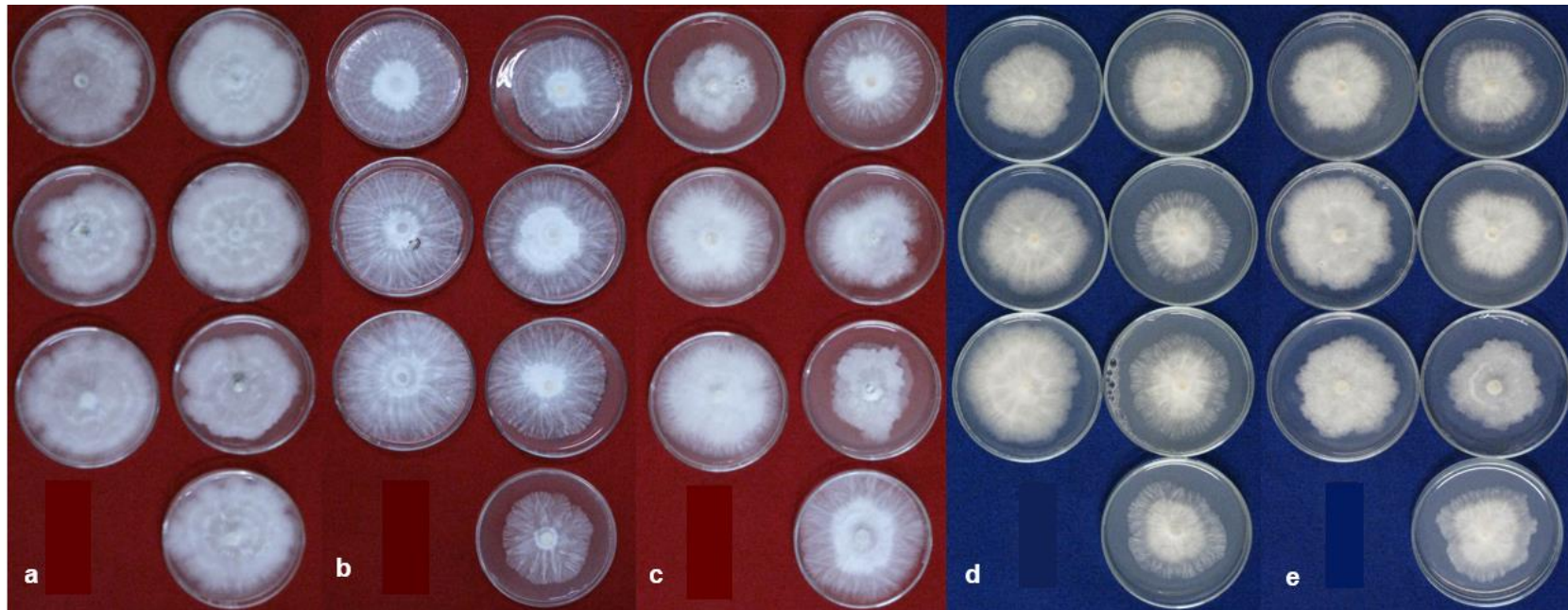
De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias estadísticas significativas en el área de crecimiento micelial de *R. necatrix* con las cuatro cepas, respecto al testigo ( $P>0.05$ ). No obstante, sobresalieron las cepas SS2 y SS1 por inhibir el 48.3 y 45.7% del crecimiento micelial, respectivamente; seguidas por TFR3V con 30% y TA4 con 28.6% de inhibición (Cuadro 7, Figura 10).

**Cuadro 7.** Área de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *R. necatrix* por efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp., siete días después de la siembra.

Cepa	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*
SS2	20.36 <sup>a</sup>	48.3
SS1	21.41 <sup>a</sup>	45.7
TFR3V	27.58 <sup>a</sup>	30.0
TA4	28.12 <sup>a</sup>	28.6
Testigo	39.4 <sup>b</sup>	No aplica

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).

\* Respecto al testigo.



**Figura 10.** Crecimiento micelial de *R. necatrix* por efecto de metabolitos volátiles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

### 7.6.1.3. Antibiosis por metabolitos difusibles

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticas significativas en el área de crecimiento micelial de *R. necatrix* con las cepas SS2, SS1 y TFR3 por efecto de metabolitos difusibles, respecto al testigo ( $P>0.05$ ). Sin embargo, se presentó una tendencia de inhibición con las cepas SS2, SS1 y TFR3, con el 13.4, 3.54 y 1.24 % de inhibición, respectivamente. Cabe destacar que con la TA4 se observó 19.53 % más crecimiento que con el testigo y además fue estadísticamente diferente ( $P>0.05$ ) (Cuadro 8, Figura 11).

**Cuadro 8.** Área de crecimiento micelial de *R. necatrix* por efecto de metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp., siete días después de la siembra.

Cepa	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de estimulación
SS2	36.89 <sup>a</sup>	13.4	0
SS1	41.08 <sup>a</sup>	3.54	0
TFR3	42.06 <sup>a</sup>	1.24	0
Testigo	42.59 <sup>a</sup>	No aplica	No aplica
TA4	50.91 <sup>b</sup>	0	19.53

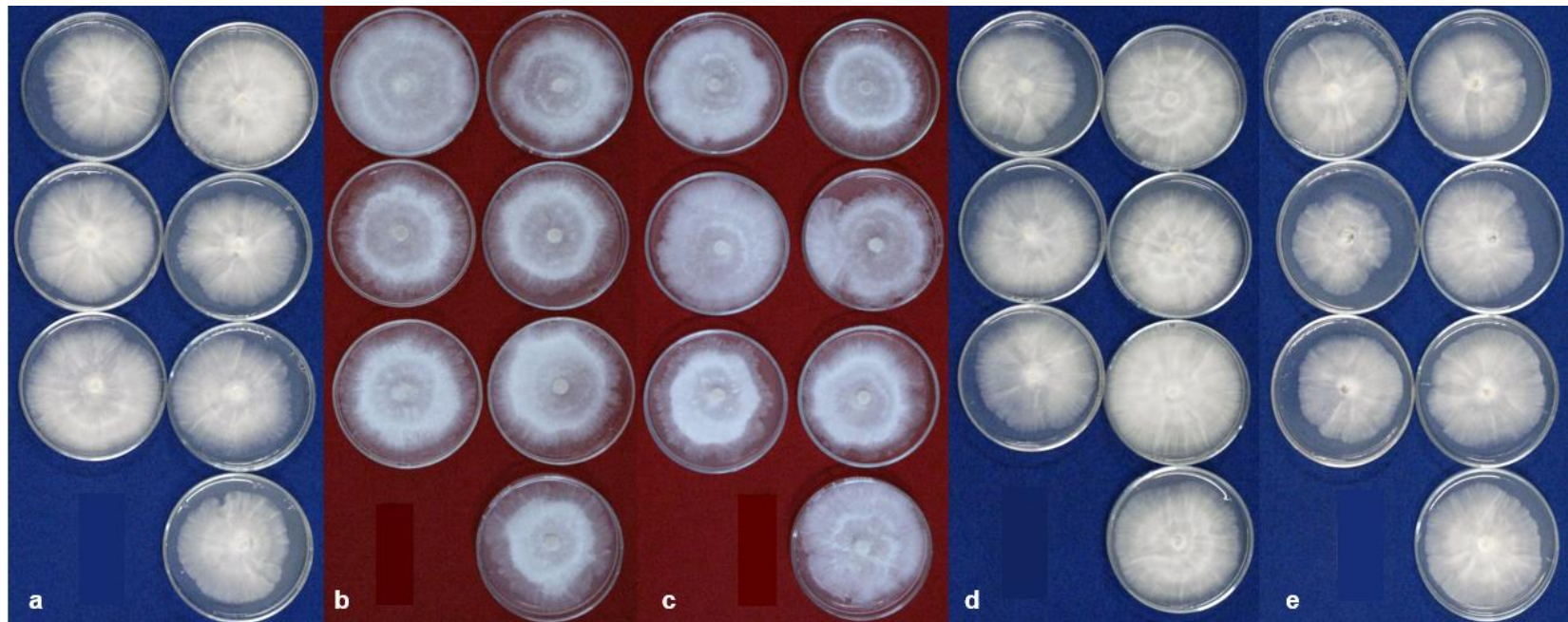
<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).

\*Respecto al testigo.



Actividad Antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa.

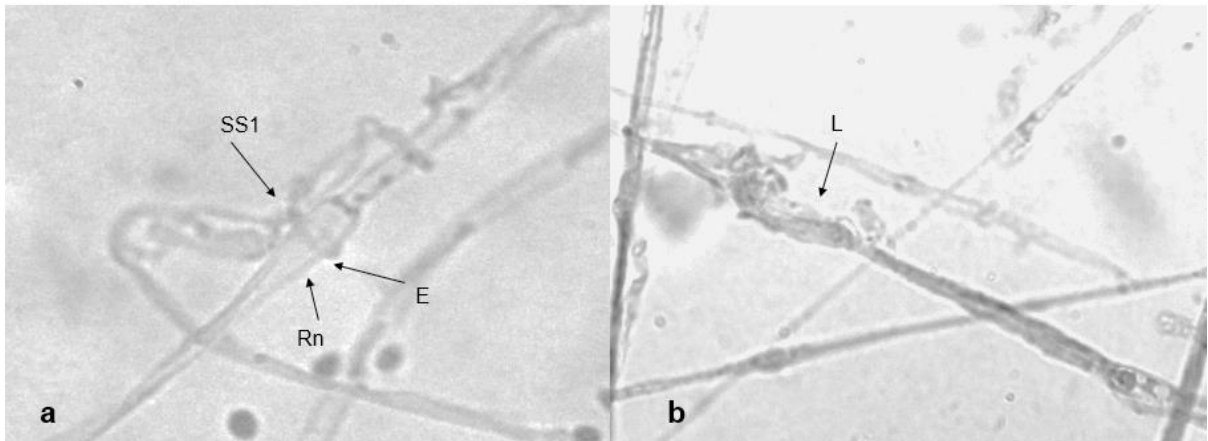
---



**Figura 11.** Crecimiento micelial de *R. necatrix* por efecto de metabolitos difusibles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

#### 7.6.1.4. Micoparasitismo

Solo se detectó micoparasitismo de la cepa SS1 sobre *Rosellinia necatrix*. Se observó que el micelio de *T. tomentosum* se encontraba enrollando el micelio de *R. necatrix*; además se presentó lisis celular (Figura 12).



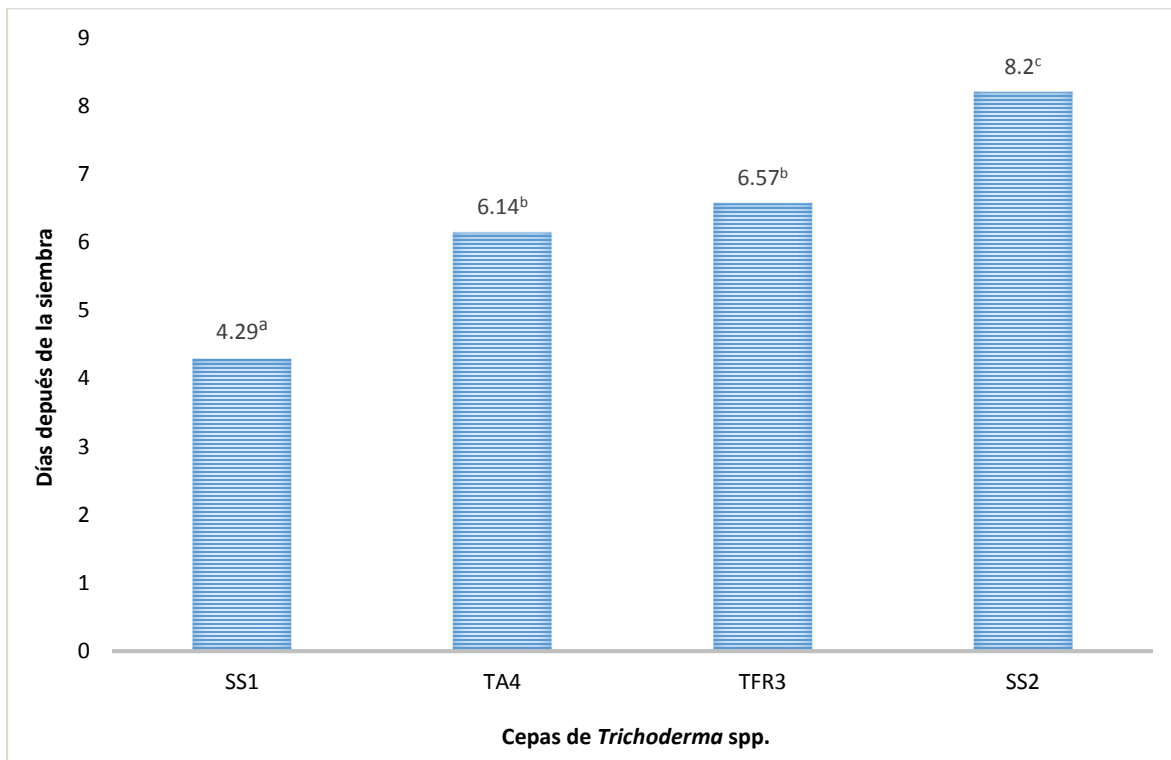
**Figura 12.** Micoparasitismo de *Trichoderma tomentosum* hacia *Rosellinia necatrix*. a) micelio de *Trichoderma tomentosum* (SS1) enrollando (E) al micelio de *R. necatrix* (Rn). b) Lisis (L) de micelio de *R. necatrix*. Objetivo 100x.

#### 7.6.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae*

##### 7.6.2.1. Competencia

De acuerdo con la comparación de medias Tukey ( $P > 0.05$ ) se presentaron diferencias estadísticas significativas en los días al primer contacto entre *V. dahliae* y las cuatro cepas de *Trichoderma* spp. La velocidad de crecimiento fue mayor en SS1, seguido de TA4, TFR3 y SS2 las cuales el primer contacto con el patógeno fue en promedio de 4.29, 6.14, 6.57 y 8.2 días después de la siembra, respectivamente (Figura 13). Cabe señalar que en el caso de la cepa SS2 en dos de las siete repeticiones no estableció contacto al final del experimento (15 dds), y

además se observó una zona de inhibición del crecimiento entre ambos organismos (Figura 14).



**Figura 13.** Comparación de medias de días al primer contacto entre *V. dahliae* y *Trichoderma* spp. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativa, comparación de medias Tukey ( $P > 0.05$ ). El promedio de la SS2, corresponde a los días al primer contacto de las cinco repeticiones en las que hubo intersección entre esta cepa y *V. dahliae*.

En lo que respecta a la clasificación de antagonismo propuesto por Ruíz (2010) (Cuadro 2), la TFR3, TA4, y SS1 se ubicaron en la clase 1 porque sobrecrecieron por completo al patógeno; a su vez estas cepas presentaron la mayor área de intersección, la cual correspondió al área total de crecimiento micelial de *V. dahliae*. Por su parte, la SS2 se ubicó entre las clases 2 y 3, lo que evidencia su baja

habilidad competitiva, debido a que no crece sobre el patógeno (Cuadro 9, Figura 14).

Cabe señalar que se presentaron diferencias estadísticas significativas en el área de crecimiento micelial de las cuatro cepas respecto al testigo ( $P>0.05$ ), de tal forma que los porcentajes de inhibición fueron los siguientes: TFR3 70.6, TA4 67.5, SS1 59.5 y SS2 49.1.

**Cuadro 9.** Área de intersección y área de crecimiento micelial de *V. dahliae* confrontado en cultivos duales con *Trichoderma* spp., 15 días después de la siembra.

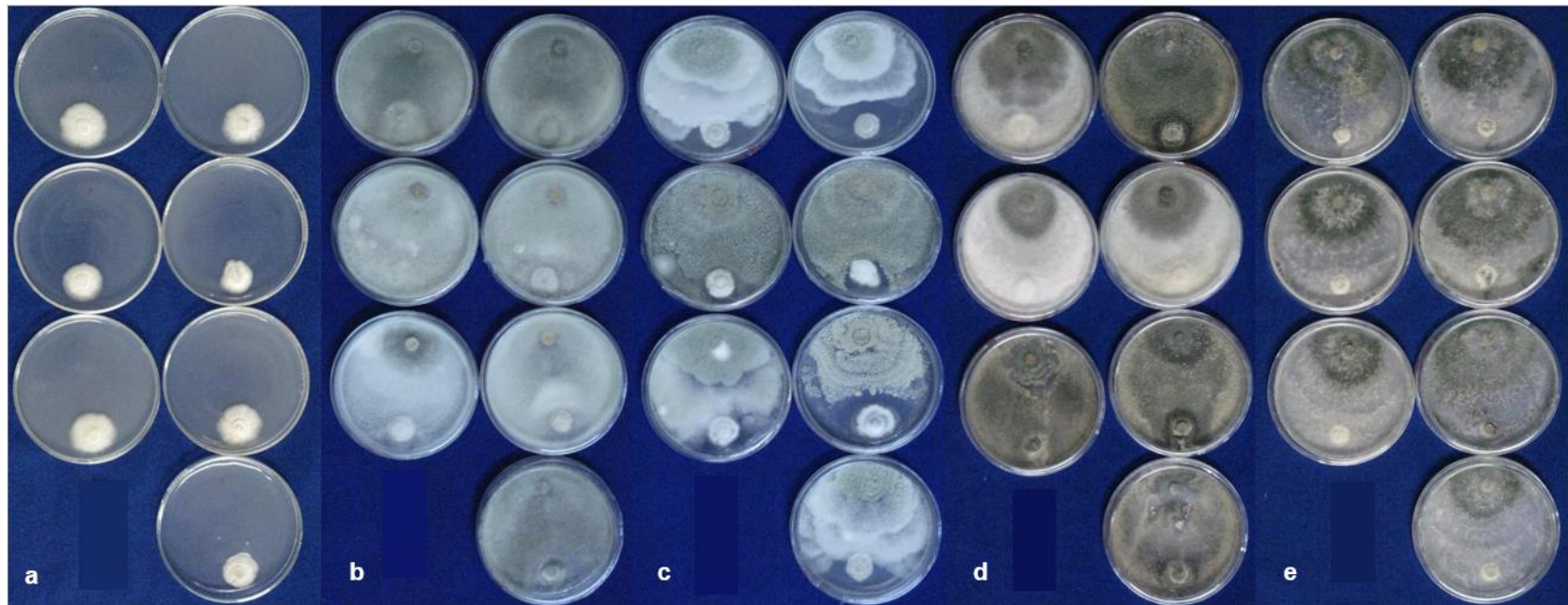
Cepa	Clasificación de antagonismo	Área de Intersección (cm <sup>2</sup> )	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*
TFR3	1 <sup>a</sup>	1.5 <sup>b</sup>	1.5 <sup>a</sup>	70.6
TA4	1 <sup>a</sup>	1.66 <sup>b</sup>	1.66 <sup>a</sup>	67.5
SS1	1 <sup>a</sup>	2.07 <sup>b</sup>	2.07 <sup>a</sup>	59.5
SS2	2.86 <sup>b</sup>	0.26 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>	49.1
Testigo	No aplica	No aplica	5.11 <sup>b</sup>	No aplica

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal, indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).

\* Respecto al testigo

Actividad Antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa.

---



**Figura 14.** Grado de competencia de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae* Disco superior corresponde a la cepa de *Trichoderma* spp. y disco inferior a *V. dahliae*. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

### 7.6.2.2. Antibiosis por metabolitos volátiles

Existen diferencias estadísticas significativas en el área de crecimiento micelial de *V. dahliae* con SS2, SS1 y TFR3, respecto al testigo. La cepa que destacó por su efecto fue SS2, la cual inhibió el 46.8%, seguido de SS1 con 42.9% de inhibición de crecimiento micelial (Cuadro 10, Figura 15).

**Cuadro 10.** Área de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *V. dahliae* por efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp., 14 días después de la siembra.

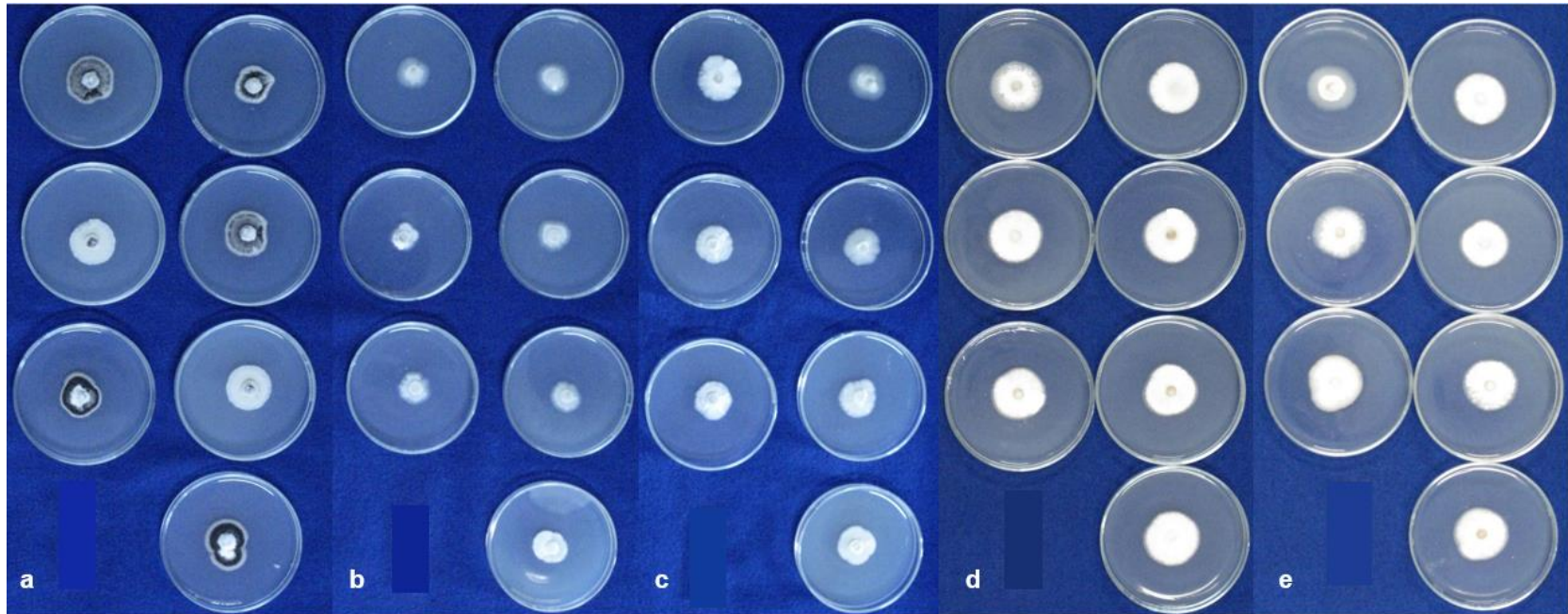
Cepa	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*
SS2	3.67 <sup>a</sup>	46.8
SS1	3.94 <sup>a</sup>	42.9
TFR3	5.92 <sup>b</sup>	14.2
TA4	6.36 <sup>bc</sup>	7.8
Testigo	6.9 <sup>c</sup>	No aplica

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

\* Respecto al testigo.

Actividad Antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa.

---



**Figura 15.** Crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos volátiles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4, y e) TFR3.

### 7.6.2.3. Antibiosis por metabolitos difusibles

Los metabolitos difusibles de las cepas SS2 y SS1 inhibieron el área de crecimiento micelial de *V. dahliae*. De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias ( $P>0.05$ ) en el área de crecimiento micelial; en contraste con el testigo la SS2 inhibió el 52.1%, y la SS1 el 48.8% (Figura 16). Por su parte con las cepas TFR3 y TA4 se registró mayor crecimiento que con el testigo, siendo este de 32.63 y 37.5%, respectivamente (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Área de crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp., 14 días después de la siembra.

Cepa	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de estimulación
SS2	4.12 <sup>a</sup>	52.1	0
SS1	4.41 <sup>a</sup>	48.8	0
Testigo	8.61 <sup>b</sup>	No aplica	No aplica
TFR3	11.42 <sup>c</sup>	0	32.63
TA4	11.84 <sup>c</sup>	0	37.5

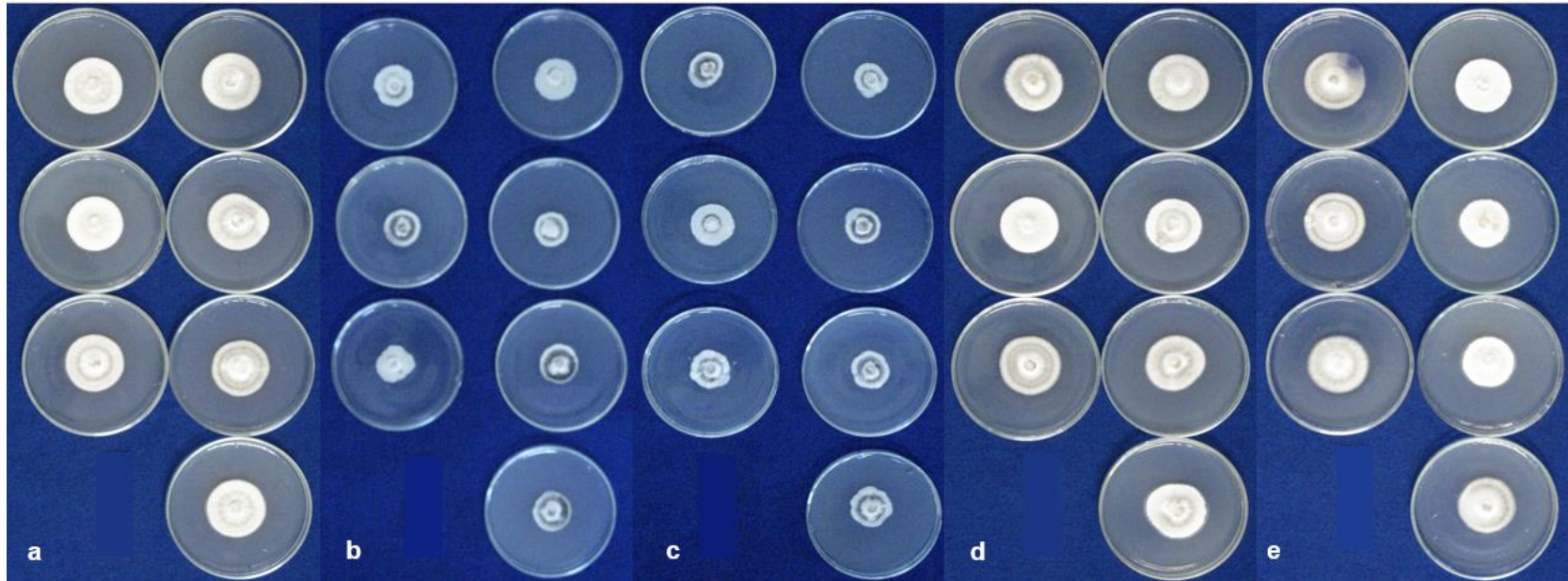
<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).

\* Respecto al testigo.



Actividad Antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa.

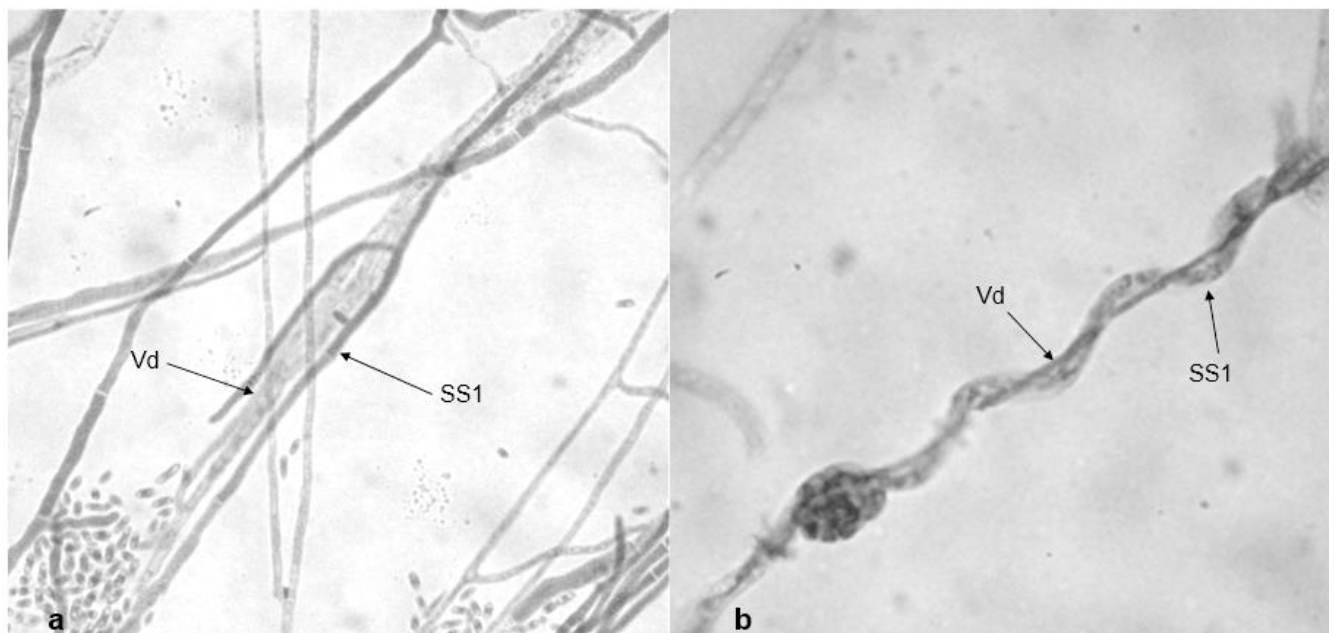
---



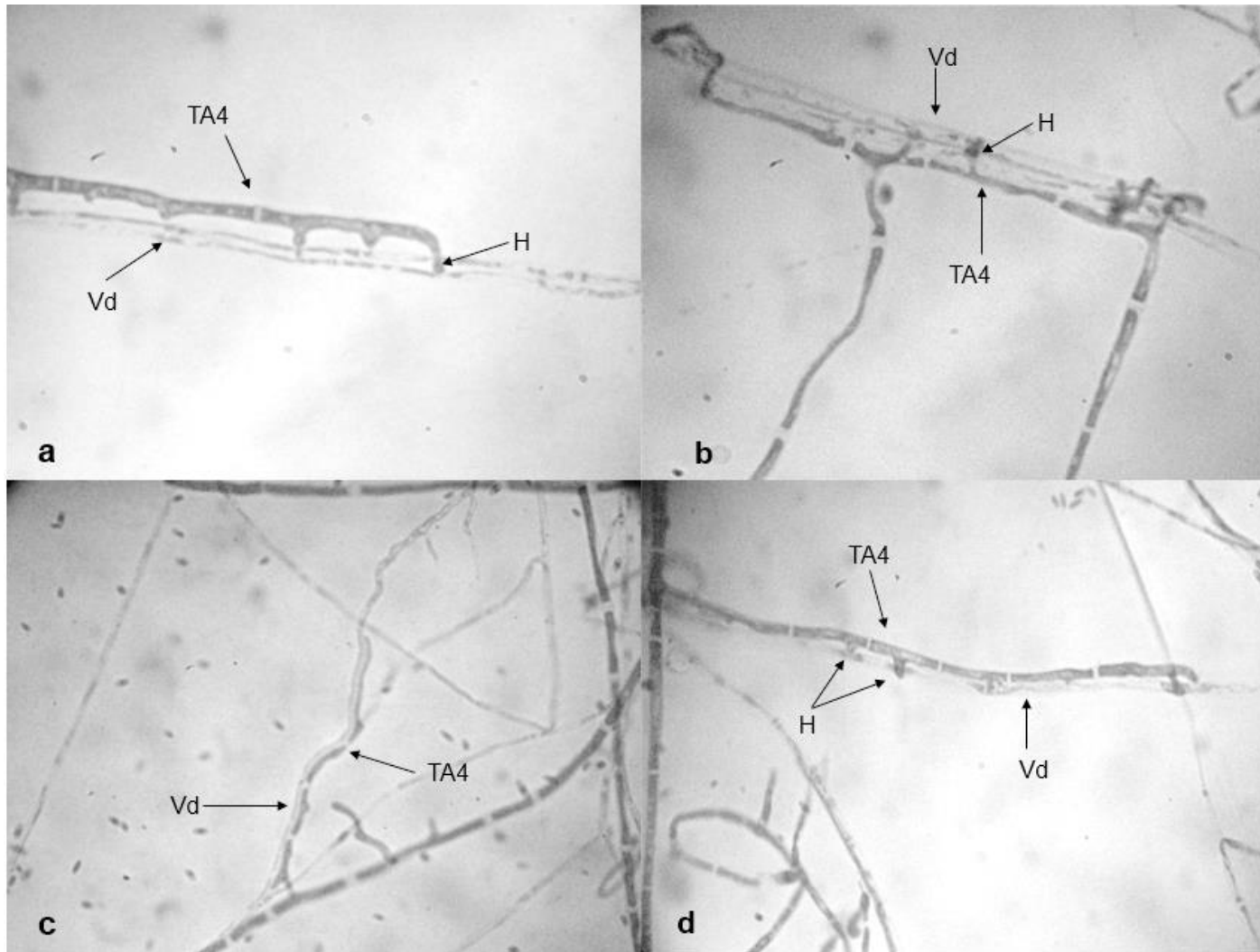
**Figura 16.** Crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos difusibles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

#### 7.6.2.4. Micoparasitismo

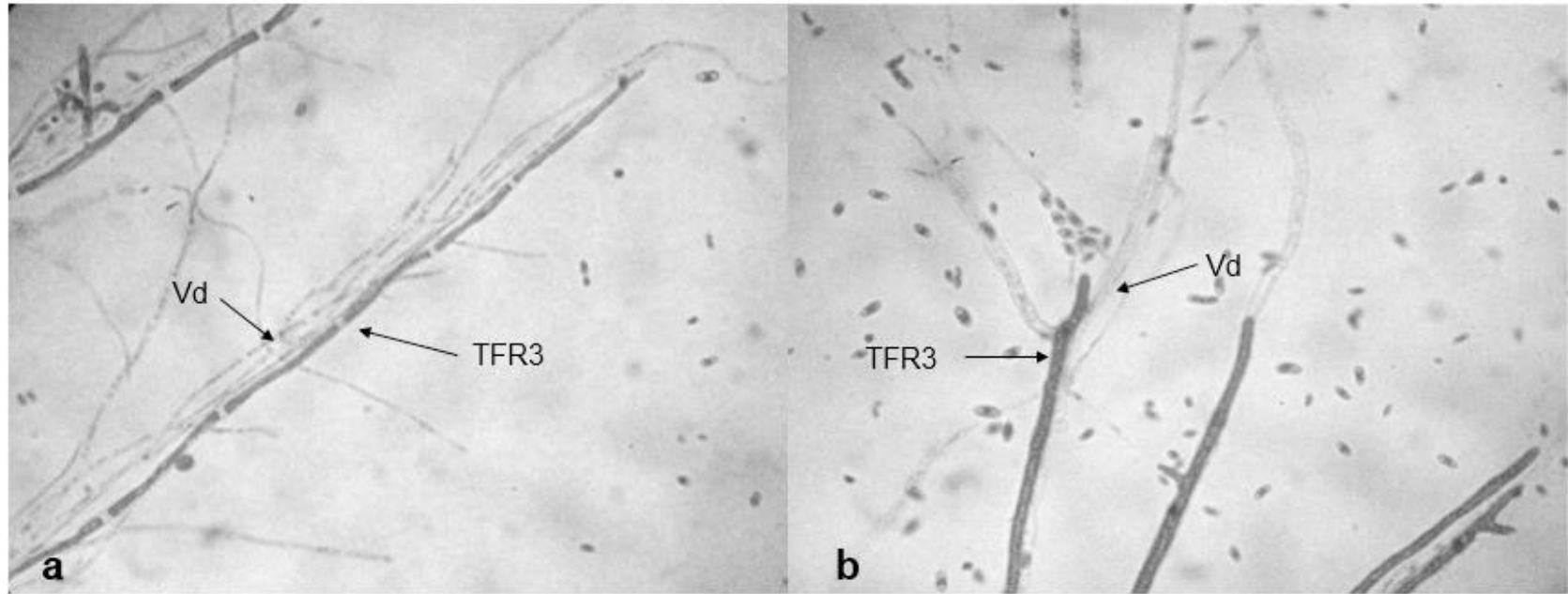
Con las cepas SS1, TA4 y TFR3 se presentó simbiosis tipo parasítica. Con la cepa SS1 se observó una interacción muy estrecha con el micelio de *Verticillium dahliae*, la cual se manifestó por medio de adhesión de las hifas y enrollamiento (Figura 17). Por su parte, la TA4 y TFR3 reconocieron al patógeno y se adhirieron a este (Figuras 18 y 19); en el caso de la TA4 fue evidente la penetración del micelio de *V. dahliae* por medio de haustorios (Figura 18).



**Figura 17.** Micoparasitismo de *Trichoderma tomentosum* hacia *Verticillium dahliae*. a) Reconocimiento y adhesión del micelio de *Trichoderma tomentosum* (SS1) a *V. dahliae* (Vd) (40x). b) Enrollamiento de *Trichoderma tomentosum* (SS1) al micelio de *V. dahliae* (V). Objetivo 100x.



**Figura 18.** Micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* hacia *Verticillium dahliae*. a, b y d) Crecimiento adyacente de *Trichoderma harzianum* (TA4) que forma haustorios (H) de penetración para alimentarse de *V. dahliae* (Vd) (100x). c) Adhesión del micelio de *Trichoderma harzianum* (TA4) al micelio de *V. dahliae* (Vd). Objetivo 40x.

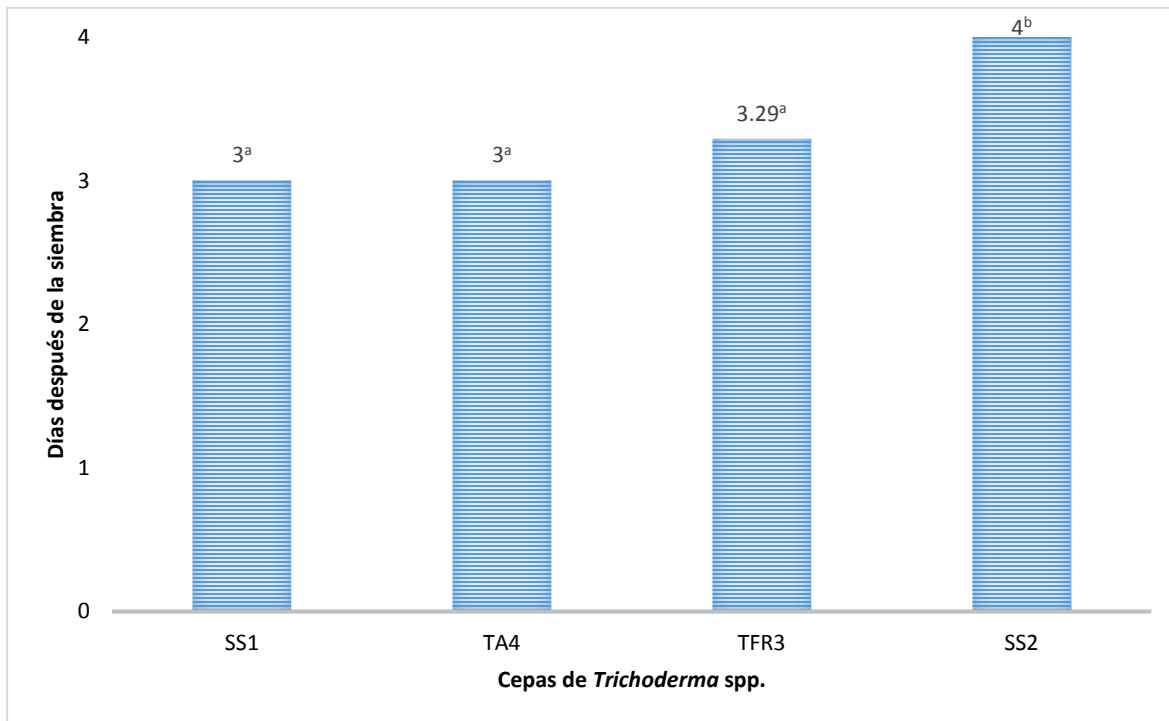


**Figura 19.** Micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* a *Verticillium dahliae*. a y b) Reconocimiento y adhesión del micelio de *Trichoderma asperellum* (TFR3) al micelio de *V.dahliae* (Vd). Objetivo 40x.

### 7.6.3. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea*

#### 7.6.3.1. Competencia

En los cultivos duales, los días al primer contacto entre las cepas de *Trichoderma* spp. y *Botrytis cinerea* se encontraron entre el tercer y cuarto dds. De acuerdo con el análisis, no existieron diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ) en el tiempo de contacto que establecieron las cepas SS1, TA4 y TFR3 con *V. dahliae* (Figura 20).



**Figura 20.** Días al primer contacto de *B. cinerea* con *Trichoderma* spp. Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).

En lo que concierne a la clasificación de antagonismo (Ruíz, 2010) (Cuadro 2), la TFR3, SS1 y TA4 sobrecrecieron completamente al patógeno, por lo que se encontraron en la clase 1, y por lo tanto presentaron la mayor área de intersección con *B. cinerea*. Por otro lado la SS2 se ubicó entre las clases 4 y 2, pues el fitopatógeno creció menos de 2/3 partes y *Trichoderma* no lo invadió, lo que evidencia su baja habilidad competitiva (Figura 21).

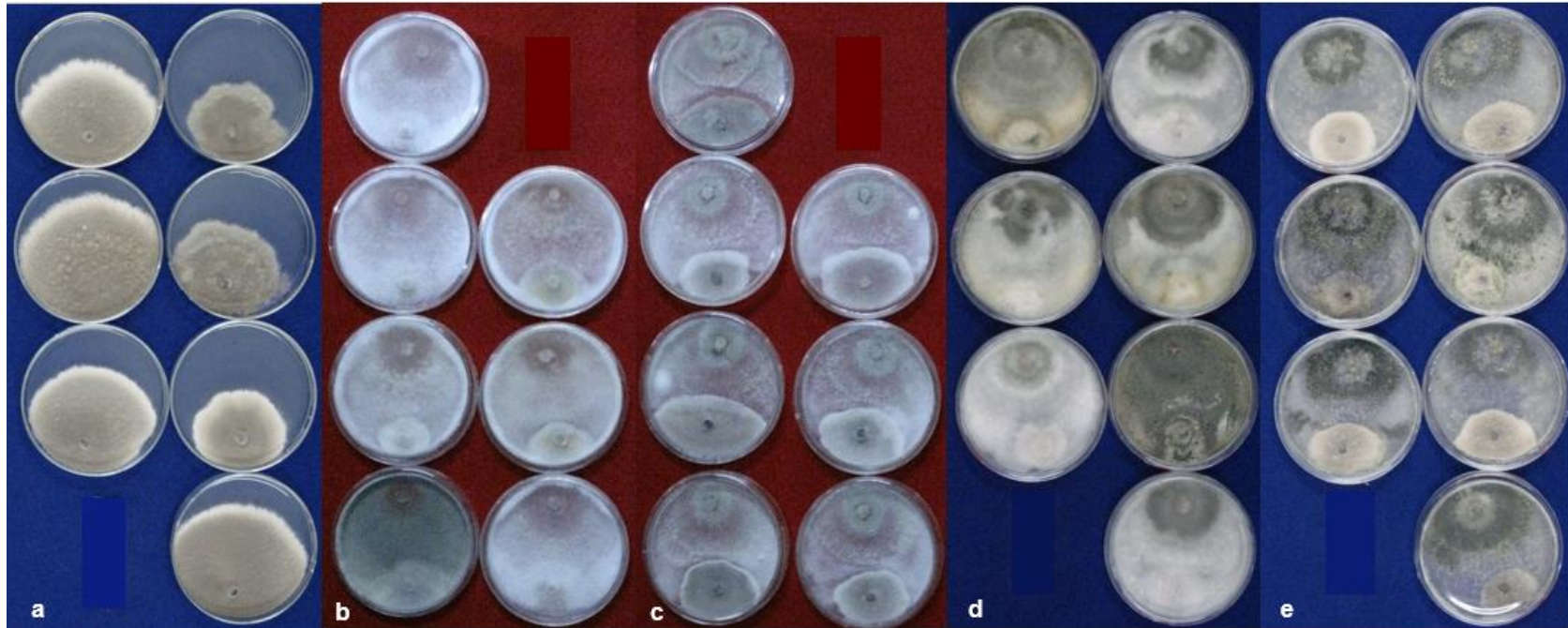
En lo que respecta al área de crecimiento micelial del patógeno, se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ), donde el testigo presentó el mayor crecimiento micelial en comparación con los tratamientos con las cepas de *Trichoderma* spp. Las cepas que inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* fueron: TFR3 con el 67.7%; seguida por SS1 con el 67.2% y finalmente TA4 con el 65.8% (Cuadro 12, Figura 21).

**Cuadro 12.** Área de crecimiento micelial de *B. cinerea* confrontado en cultivos duales con *Trichoderma* spp., 15 días después de la siembra.

Cepa	Clasificación de antagonismo <sup>¶</sup>	Área de intersección (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*
TFR3	1 <sup>a</sup>	11.05 <sup>b</sup>	11.05 <sup>a</sup>	67.7
SS1	1 <sup>a</sup>	11.22 <sup>b</sup>	11.22 <sup>a</sup>	67.2
TA4	1 <sup>a</sup>	11.67 <sup>b</sup>	11.67 <sup>a</sup>	65.8
SS2	3.14 <sup>b</sup>	2.7 <sup>b</sup>	19.36 <sup>b</sup>	43.3
Testigo	No aplica	No aplica	34.16 <sup>c</sup>	No aplica

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P > 0.05$ ).

\* Respecto al testigo.



**Figura 21.** Grado de competencia de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea*. Disco superior corresponde a la cepa de *Trichoderma* spp. y disco inferior a *B. cinerea*. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

### 7.6.3.2. Antibiosis por metabolitos volátiles

Con base en los análisis estadísticos existen diferencias en el área de crecimiento micelial de *B. cinerea* con las cepas SS1, SS2 y TA4 por efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. La cepa que sobresalió por tal efecto fue SS1, la cual inhibió el 65.2% del crecimiento micelial, seguida de SS2 con 58.3% de inhibición y finalmente la TA4 con 36%. Aunque la TFR3 no fue diferente al testigo inhibió el 5.2% (Cuadro 13, Figura 22).

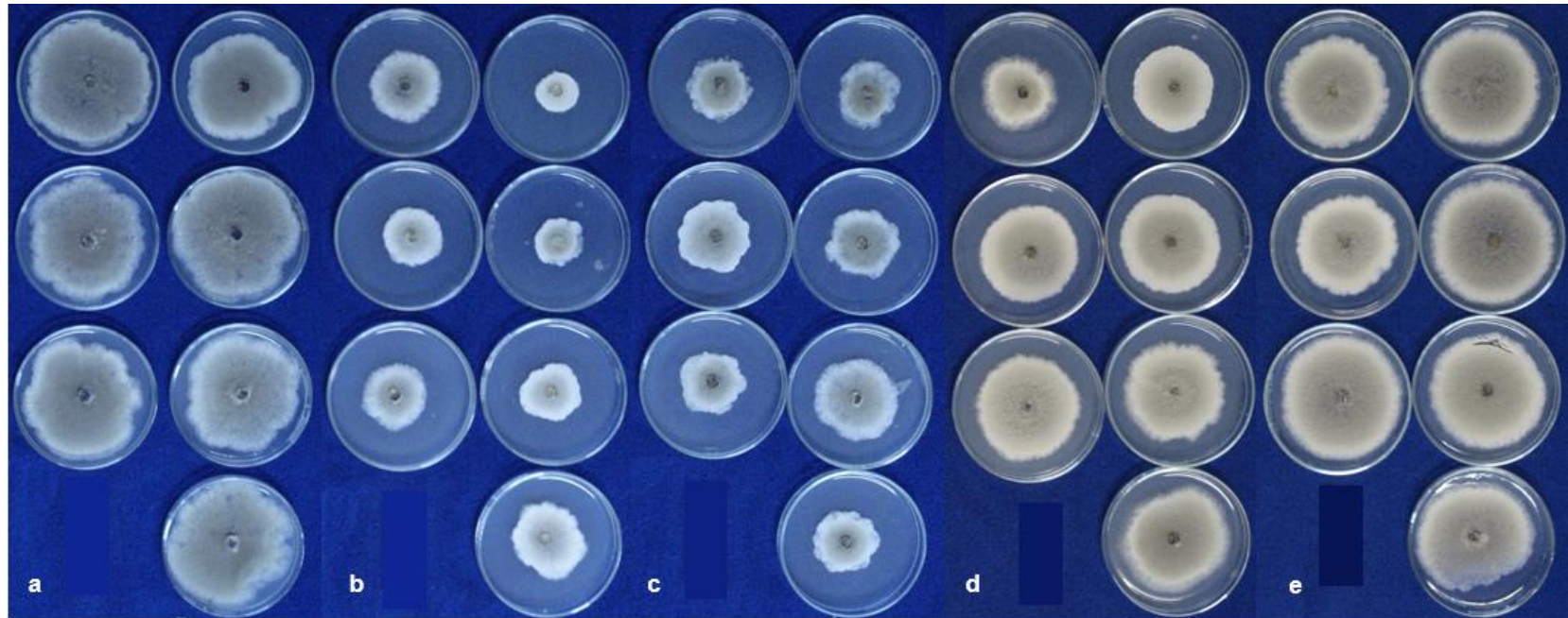
**Cuadro 13.** Área de crecimiento micelial de *B. cinerea* con metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp., cinco días después de la siembra.

Cepas	Área de crecimiento <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*
SS1	13.92 <sup>a</sup>	65.2
SS2	16.68 <sup>a</sup>	58.3
TA4	25.62 <sup>b</sup>	36.0
TFR3	37.95 <sup>c</sup>	5.2
Testigo	40.04 <sup>c</sup>	No aplica

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

\* Respecto al testigo.





**Figura 22.** Crecimiento micelial de *B. cinerea* por efecto de metabolitos volátiles. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

### 7.6.3.3. Antibiosis por metabolitos difusibles

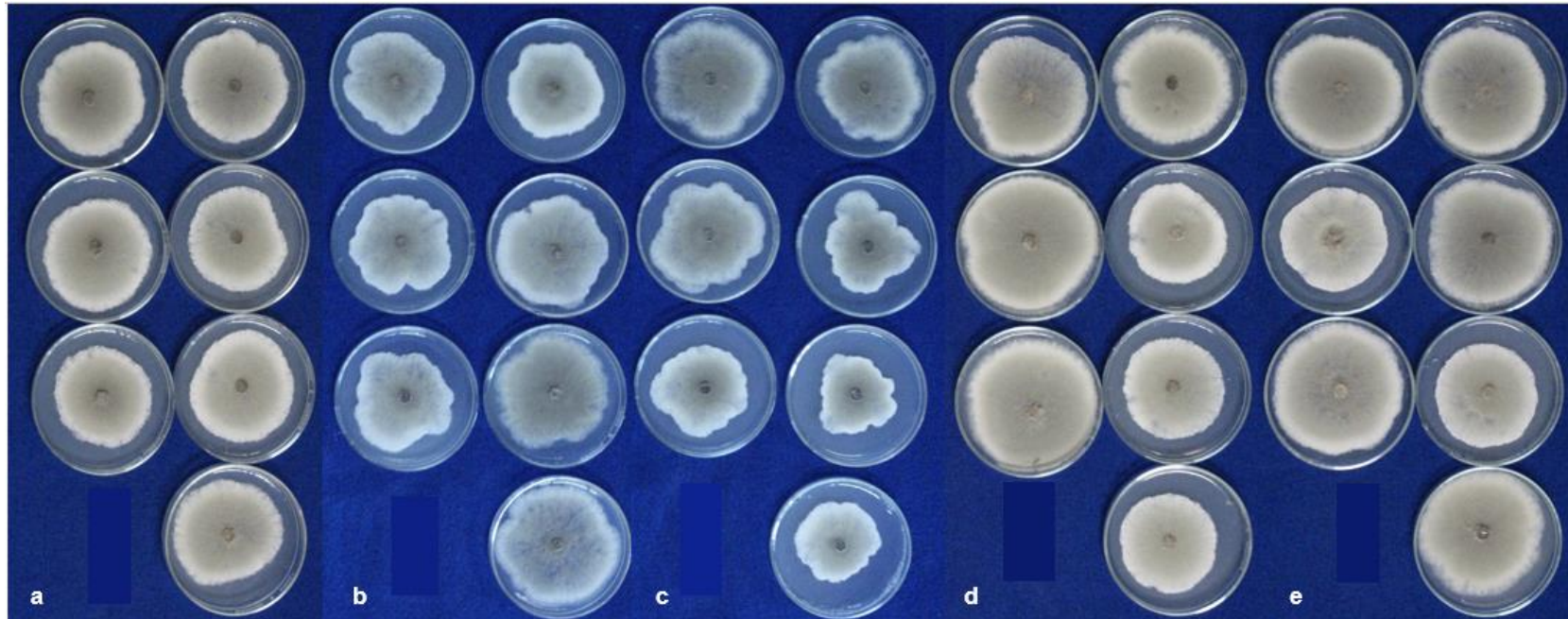
No se presentaron diferencias estadísticas ( $P>0.05$ ) con las cepas SS1, TA4 y TFR3, respecto al testigo, pero sí con la SS2, la cual disminuyó el 25.8% crecimiento debido a metabolitos difusibles. La SS1 inhibió el 7.3%, mientras que con la TA4 y TFR3 el crecimiento fue de 1.9 y 15.4 más, respecto al testigo (Cuadro 14, Figura 23).

**Cuadro 14.** Área de crecimiento micelial de *B. cinerea* con metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp., seis días después de la siembra.

Cepa	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de estimulación*
SS2	30.16 <sup>a</sup>	25.8	0
SS1	37.68 <sup>ab</sup>	7.3	0
Testigo	40.65 <sup>ab</sup>	No aplica	No aplica
TA4	41.41 <sup>ab</sup>	0	1.9
TFR3	46.9 <sup>b</sup>	0	15.4

<sup>¶</sup>Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P>0.05$ ).

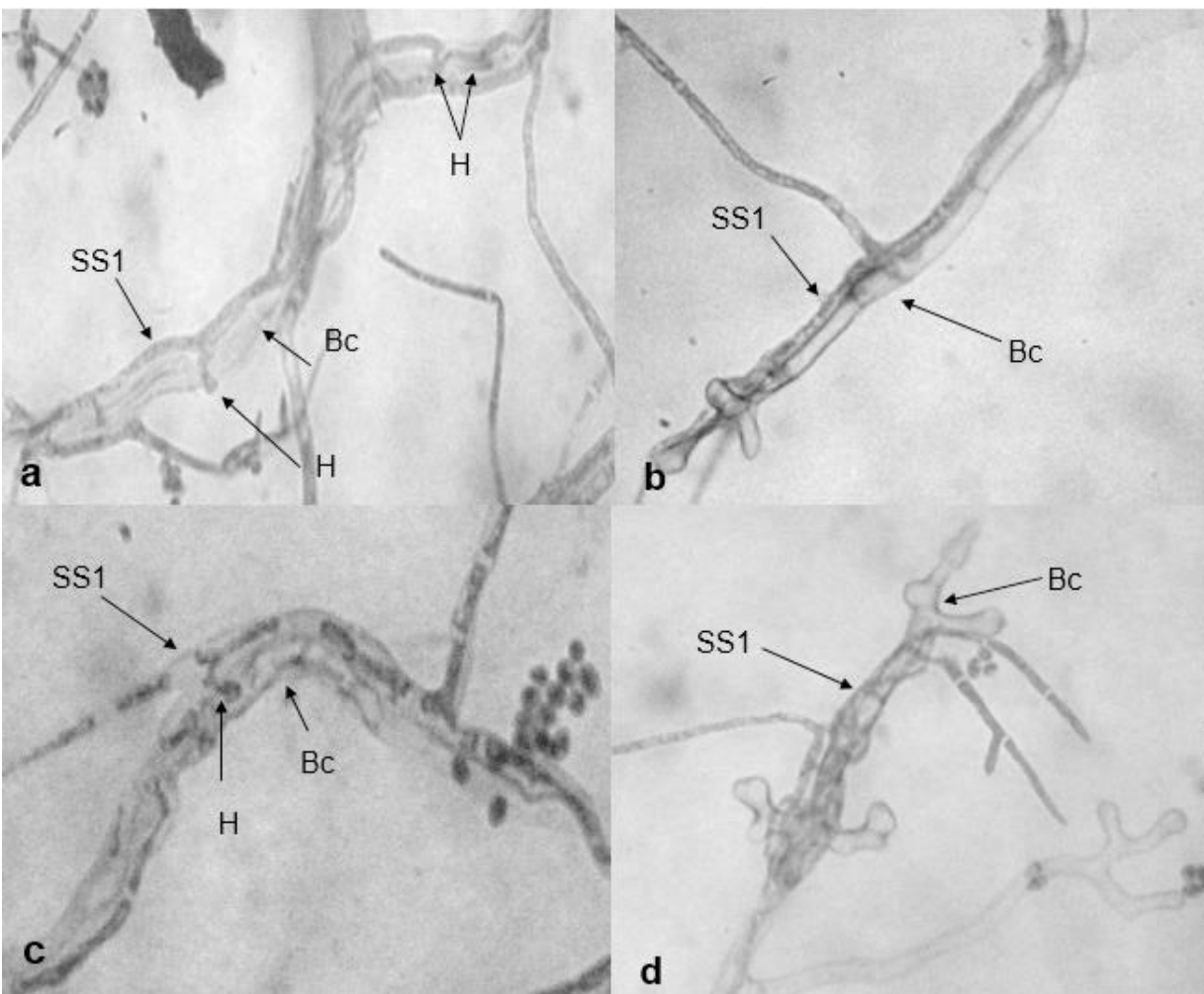
\* Respecto al testigo.



**Figura 23.** Crecimiento micelial de *B. cinerea* por efecto de metabolitos difusibles frente a las cepas. a) Testigo, b) SS1, c) SS2, d) TA4 y e) TFR3.

#### 7.6.3.4. Micoparasitismo

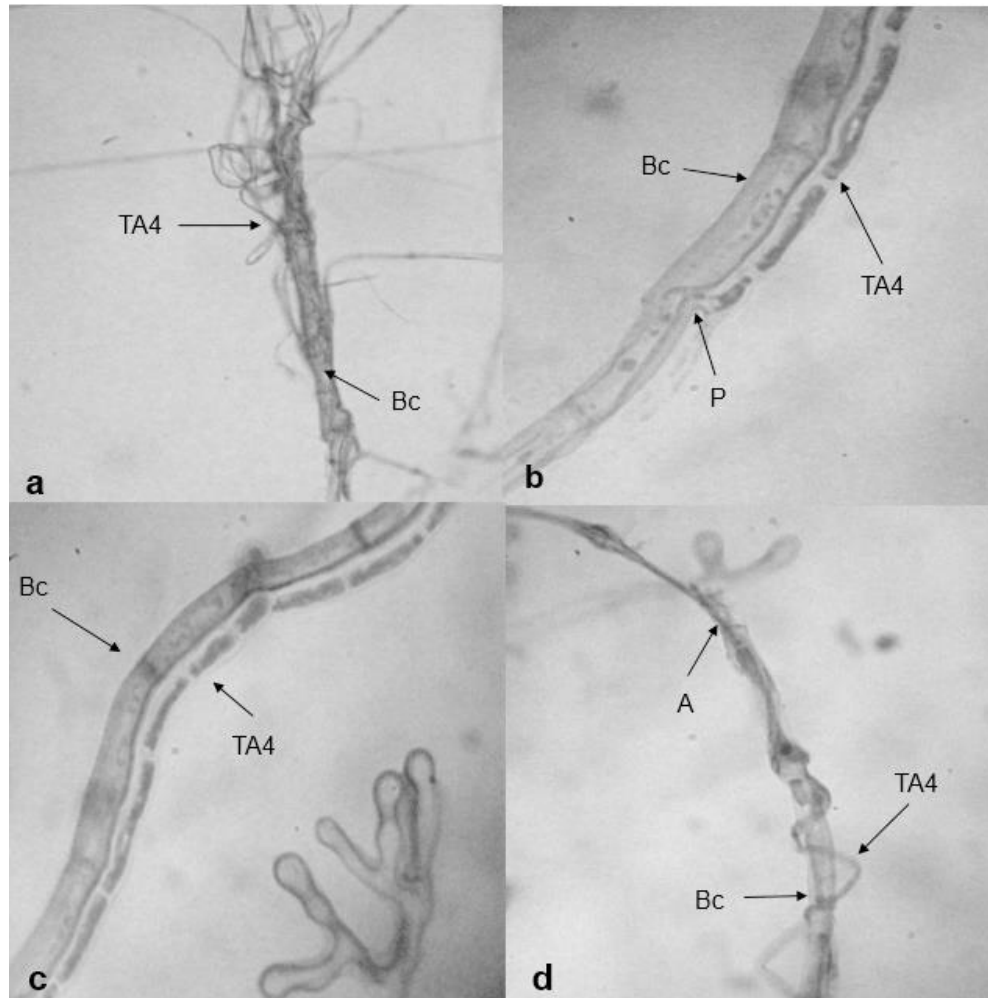
Las cuatro especies de *Trichoderma* spp. presentaron micoparasitismo; se detectó que establecieron contacto micelial, lo que condujo a la adhesión del micelio y la penetración de haustorios (Figuras 24, 25 y 27). En el caso de las cepas SS1 y TA4 se presentaron superenrollamiento al micelio de *Botrytis cinerea* (Figuras 24 y 26).



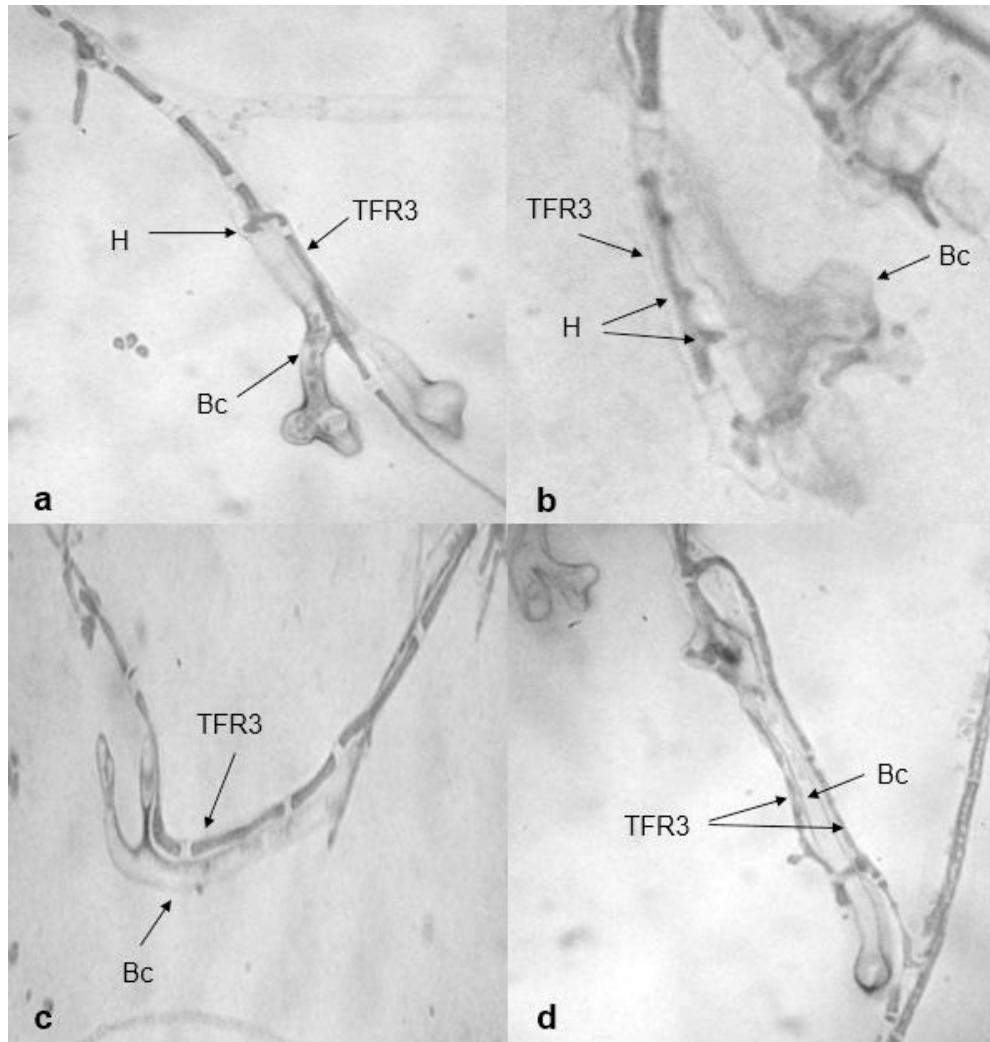
**Figura 24.** Micoparasitismo de *Trichoderma tomentosum* hacia *Botrytis cinerea*. a y c) Formación de haustorios (H) por parte de *Trichoderma tomentosum* (SS1) para alimentarse de *B. cinerea* (Bc) y ocasionarle la muerte. b) Adhesión de micelio de *Trichoderma tomentosum* (SS1) a micelio de *B. cinerea* (Bc). d) Enrollamiento de *Trichoderma tomentosum* (SS1) al micelio de *B. cinerea* (Bc). Objetivo 100x



**Figura 25.** Micoparasitismo de *Trichoderma barbatum* hacia *Botrytis cinerea*. Crecimiento micelial y formación de haustorios (H) por parte de *Trichoderma barbatum* (SS2) para alimentarse de *B. cinerea* (Bc). Objetivo 100x.



**Figura 26.** Micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* hacia *Botrytis cinerea*. a) Enrollamiento de *Trichoderma harzianum* (TA4) al micelio de *B. cinerea* (Bc) (40x). b) Penetración (P) de *Trichoderma harzianum* (TA4) al micelio de *B. cinerea* (Bc) (100x). c) Reconocimiento y adhesión del micelio de *Trichoderma harzianum* (TA4) al micelio de *B. cinerea* (Bc) (100x). d) Enrollamiento y absorción del contenido celular (A) por parte de *Trichoderma harzianum* (TA4) al micelio de *B. cinerea* (Bc). Objetivo 40x.



**Figura 27.** Micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* hacia *Botrytis cinerea*. a y b) Crecimiento y formación de haustorios de penetración (H) de *Trichoderma asperellum* (TFR3) que provocan la muerte de *B. cinerea* (Bc). c y d) crecimiento y adhesión de micelio de *Trichoderma asperellum* (TFR3) al micelio del patógeno (Bc). Objetivo 100x.

## 8. DISCUSIÓN

Se obtuvieron las cepas de *Trichoderma* SS1 y SS2 de un suelo forestal de la localidad de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México, aisladas a través de la técnica de diluciones seriadas en medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* (MST) (Askew y Lang, 1993) sin fungicidas. Cabe destacar que existen otras técnicas de aislamiento, entre estas el uso de trampas a base de arroz cocido o directamente en medio de cultivo PDA (Samaniego-Fernández *et al.*, 2018; Ávila *et al.*, 2014).

En lo que respecta al aislamiento en MST con fungicidas (captan 0.04 g L<sup>-1</sup> y PCNB 0.2 g L<sup>-1</sup>), Guigón-López *et al.* (2004) reportan la obtención de seis aislamientos a partir de cultivos comerciales: la cepa TC74 de chile (*Capsicum annuum* L.), las cepas TvVA y TbVA de nogal (*Juglans regia* L.), las cepas TvB y TbB de menta (*Mentha* Borbás ex Heinr. Braun) y la cepa TS01 de durazno (*Prunus persica* L. Stokes). Aunque en el presente estudio no fue posible aislar a *Trichoderma* en medio de cultivo adicionado con fungicidas, no se puede atribuir esto a su sensibilidad a los ingredientes activos, ya que pueden interferir algunos otros factores como la competencia con microorganismos presentes en el suelo, que además también crecieron en el medio de cultivo. En este sentido, Peláez-Álvarez *et al.* (2016), reportan que especies como *T. asperellum* no presenta sensibilidad a captan; ya que con 0.5 g L<sup>-1</sup> se inhibió el 6% del crecimiento micelial. Cabe señalar que el comportamiento de una misma especie es diferente dependiendo de las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrolla.



De acuerdo con la identificación molecular, la cepa SS1 pertenece a la especie *Trichoderma tomentosum* y la SS2 a *Trichoderma barbatum*. Adicional a estas cepas, se realizó la identificación de las proporcionadas por el laboratorio de fitopatología, correspondiendo la TA4 a *Trichoderma harzianum* y TFR3 a *Trichoderma asperellum* (Cuadro 5). En la literatura se reportan alrededor de 348 especies de este género (Kirk *et al.*, 2018); sin embargo, las más utilizadas como agentes de control biológico se limitan a pocas especies, entre estas: *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* (Duarte-Leal *et al.*, 2018; Hajieghrari *et al.*, 2008), *T. viridae*, *T. hamantum*, *T. reesei* y *T. koningii* (Martínez *et al.*, 2013; Hajieghrari *et al.*, 2008).

En la literatura se encuentran pocos estudios relacionado con *Trichoderma tomentosum* y *T. barbatum*; algunos de estos son los desarrollados por Herrera-Jiménez *et al.* (2018) en México, quienes obtuvieron un aislamiento de *T. tomentosum* a partir de raíces de plantas de maíz y el cual estimuló el crecimiento de esta gramínea. Respecto a *T. barbatum*, en un estudio realizado por Hicks *et al.* (2014) en Nueva Zelanda, en papa (*Solanum tuberosum* Bert. ex Walp.) cultivada bajo invernadero, se demostró que inhibe la enfermedad producida por *Rhizoctonia* y, además, promueve el crecimiento de las plantas. En otros estudios como el de Fernandes *et al.* (2013), se ha evaluado *in vitro* a *Trichoderma tomentosum*, *T. arzianum*, *T. asperellum* y *T. ghanese* contra: *Fusarium solani* Mart, *Rhizoctonia solani* A. B. Frank y *Sclerotinia sclerotiorum* Lib.; entre los resultados reportan que los patógenos fueron micoparasitados por las cuatro cepas de *Trichoderma* y demostraron la presencia de metabolitos secundarios; sin embargo, los mejores

resultados se obtuvieron con *T. harzianum* y *T. asperellum*, ya que lograron inhibir el crecimiento de *S. sclerotiorum* en 66% y 17%, el de *F. solani* entre 33% y 71% y el de *R. solani* del 41% al 66%, respectivamente.

En las evaluaciones *in vitro* de la presente investigación se obtuvo que por efecto de competencia las cepas de *T. tomentosum*, *T. harzianum* y *T. asperellum* inhibieron 89%, 88.4% y 86.5% del área de crecimiento micelial de *R. necatrix* (Cuadro 6). Sanabria y Graboswaski (2016), reportaron que 19 aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos de macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden y Betché) en Paraguay inhibieron el crecimiento *in vitro* de este patógeno en un intervalo de 42.8 a 80.2%. En cuanto a metabolitos secundarios, solo las cepas *T. harzianum* y *T. asperellum* lograron inhibir el crecimiento de *R. necatrix*, siendo los porcentajes de inhibición 32.3 y 33.6%, respectivamente (Cuadro 7). Al respecto Arjona-Guirona *et al.* (2014), por medio de cultivo líquido, extrajeron metabolitos secundarios de una cepa de *T. atroviride*, los cuales correspondieron a: 6PP, T39 butenólido, cerinolactona, harzianolida, dehydroharzianolidede; en los estudios *in vitro* demostraron que 6PP, cerinolactona y T39 butenólido tienen alta efectividad contra *R. necatrix* inhibiendo entre el 25 y 91% de crecimiento micelial.

De las cuatro cepas evaluadas solo se observó micoparasitismo con *T. tomentosum*; se detectó enrollamiento y lisis celular (Figura 11). En investigaciones como las de Arjona-Guirona *et al.* (2014), se reporta crecimiento paralelo de *Trichoderma* spp. a las hifas de *R. necatrix*, el cual consideraron como micoparasitismo.

Otro aspecto de suma importancia relacionado con *R. necatrix*, es que en la zona florícola del Estado de México se han reportado cepas insensibles al fungicida quintozeno (Domínguez, 2008); por lo que *T. tomentosum*, *T. harzianum* (TA4) y *T. asperellum* pueden ser de gran utilidad para el manejo de dicho fitopatógeno.

Con *Verticillium dahliae* se encontró que por efecto de competencia, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. tomentosum* inhibieron el 70.6, 67.5 y 59.5% del crecimiento micelial, respectivamente (Cuadro 9). En una investigación desarrollada por Xiojun *et al.* (2014), se obtuvieron 33 aislados de *Trichoderma* spp. a partir de cultivos de papa en China; al confrontarlos *in vitro* con *V. dahliae* se registró un porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de 24.7 a 38.3%; cabe resaltar que en la presente investigación la inhibición de crecimiento micelial por competencia fue más alta (Cuadro 9). Jiménez *et al.* (2009), reporta que con la aplicación de un producto comercial (Bioten®) que contiene *T. asperellum* y *T. gamsii* reduce en 30% la severidad de síntomas causados por *V. dahliae* en cultivo de olivo (*Olea europea* L). Comparando resultados obtenidos en la presente investigación, las cepas de *T. barbatum* y *T. tomentosum* inhibieron el 46.8 y 43% de crecimiento micelial por efecto de metabolitos volátiles y con metabolitos difusibles el 52.2 y 42.8%, respectivamente (Cuadro 10, Cuadro 11). Cabe destacar que los productos comerciales no son aptos para todas las regiones ni para todos los cultivos, pues al utilizar organismos vivos, las condiciones ambientales son determinantes en su acción como antagonistas.

En lo que respecta a micoparasitismo de *V. dahliae*, fue detectado con las cepas de *Trichoderma tomentosum*, *T. harzianum* y *T. asperellum*; en las que se observó enrollamiento y penetración de las hifas (Figuras 16 y 17).

En términos generales, las especies que lograron inhibir el crecimiento micelial de *V. dahliae* fueron *T. tomentosum* por efecto de competencia, metabolitos volátiles y difusibles; y *T. barbatum* por efecto de metabolitos volátiles y difusibles, lo que estas son las más recomendadas para el manejo de dicho patógeno.

En lo que respecta a los experimentos de competencia de *B. cinerea*, se obtuvo que *T. asperellum*, *T. tomentosum* y *T. harzianum* inhibieron el 67.7, 67.1 y 65.8% del crecimiento, respectivamente (Cuadro 12). Por efecto de metabolitos volátiles *T. tomentosum* y *T. barbatum* inhibieron el crecimiento en 65.2 y 42.2%; y por medio de metabolitos difusibles solo *T. barbatum* tuvo efecto con 25.8% de inhibición de crecimiento micelial (Cuadro 13, Cuadro 14). Villalpando *et al.* (2016) reporta que 11 aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos de Argentina, inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* en un intervalo de 46% a 36% en cultivos duales; además, dicho autor reporta que por efecto de metabolitos volátiles las cepas inhibieron del 78 al 39%, y por efecto de metabolitos difusibles un porcentaje de inhibición del 93 al 68%. En contraste con estos reportes, en el presente estudio el porcentaje de inhibición por competencia fue mayor; y menor con metabolitos secundarios.

En el caso de micoparasitismo, las cuatro cepas evaluadas presentaron este mecanismo frente a *B. cinerea*. Se observaron haustorios penetrando a las hifas del patógeno (Figuras 23, 24 y 26), al respecto Howell (2002) ha reportado que especies

de *Trichoderma* spp. pueden micoparasitar; esto se debe a que *Trichoderma* penetra al micelio del hospedante y forma haustorios, para consecutivamente alimentarse del patógeno y provocarle la muerte.

Se sabe que *Botrytis cinerea* ha desarrollado resistencia a tiabendazol (Manzanos-Ayala *et al.*, 2019; López, 2019) y que ha perdido sensibilidad a procloraz e iprodiona (Camacho, 2009), lo que hace conveniente la incorporación de las cepas SS1, SS2 y TA4 para el manejo de dicha enfermedad.

## 9. CONCLUSIONES

Se aislaron las cepas SS1 y SS2, a partir de suelos forestales de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México; las cuales de acuerdo con la identificación molecular corresponden a *Trichoderma tomentosum* y *Trichoderma barbatum*. En lo que respecta a la TA4 y la TFR3 se identificaron como *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum*, respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el mecanismo de acción por competencia, las cepas que destacaron son: *T. tomentosum*, *T. harzianum* y *T. asperellum* debido a que sobrecrecieron a los tres patógenos e inhibieron el crecimiento micelial.

En cuanto al efecto de metabolitos volátiles sobre *R. necatrix*, las cepas que sobresalieron fueron *T. barbatum* y *T. tomentosum* las cuales inhibieron 48.3 y 45.7% del crecimiento micelial, respectivamente; seguidas por *T. asperellum* con 30% y por *T. harzianum* con 28.6%. Por metabolitos difusibles la cepa que inhibió el mayor crecimiento fue *T. barbatum* con un 13.4%.

*Trichoderma barbatum* y *T. tomentosum*, por efecto de metabolitos volátiles inhibieron el 46.8 y 42.9% del crecimiento micelial de *V. dahliae* y por metabolitos difusibles el 52.1 y 48.8%, respectivamente.

*Trichoderma tomentosum*, *T. barbatum* y *T. harzianum*, inhibieron por metabolitos volátiles el 65.2, 58.3 y 36%, respectivamente, del crecimiento micelial de *B. cinerea* y por metabolitos difusibles *T. barbatum* inhibió el 25.8%.

En cuanto a micoparasitismo destacó *T. tomentosum* ya que se observó con los tres fitopatógenos. *T. harzianum* y *T. asperellum* micoparasitaron a *V. dahliae* y *B. cinerea* y *T. barbatum* a *B. cinerea*.

De acuerdo con lo anterior, se concluye que la actividad antagónica *in vitro* de *T. tomentosum*, *T. barbatum*, *T. harzianum* y *T. asperellum* depende del fitopatógeno.

## 10. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar las cuatro cepas de *Trichoderma* en campo, ya que los resultados obtenidos en la presente investigación arrojan resultados prometedores para el manejo de *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*.

Realizar investigaciones encaminadas a determinar otros mecanismos de acción de *Trichoderma tomentosum*, *Trichoderma barbatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum*, como pueden ser: la inducción de resistencia sistémica y la estimulación de crecimiento vegetal.

Determinar la compatibilidad de *Trichoderma tomentosum* (SS1), *Trichoderma barbatum* (SS2), *Trichoderma harzianum* (TA4) y *Trichoderma asperellum* (TFR3) con fungicidas químicos, utilizados para el manejo de los hongos fitopatógenos estudiados en esta investigación.

Determinar la actividad antagónica o sinérgica entre las cepas de *Trichoderma tomentosum* (SS1), *Trichoderma barbatum* (SS2), *Trichoderma harzianum* (TA4) y *Trichoderma asperellum* (TFR3).



## 11. LISTA DE REFERENCIAS

- Allori, S. E., Yasem, M. G. y Ploper, D. L. (2014). Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del genero *Trichoderma*. Revista Agronómica del Noroeste Argentino, 34(2), 197-199.
- Altomare, C., Norvell, A. W., Björkman, T. and Harman, G. E. (1999). Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. American Society for Microbiology, 1295.
- Arjona-Girona, I., Vinale, F., Ruano-Rosa, D., Lorito, M. and López-Herrera, C. J. (2014). Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado White root rot. Eur J Plant Pathol, 140 (2), 385-397.
- Askew, D. J. and Lang, M. D. (1993). An adapted selective médium for the quatitative isolayion of *Trichoderma* species. Plant Pathology, 42 (5), 686-690.
- Ávila, C. C., Goretti, M. R. y Lizcano, T. R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp. en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la Angostura de Campoalegre (Huila). Revista Agropecuria y Agroindustrial la Angostura, 1 (1), 15-20.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed). Mac Millan Publishing Co. New York, USA. 218 p.

- Bell, D., Wells, H. and Markaham, C. (1982). *In vitro* Antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72, 379-382.
- Benítez, T., Rincón, A. M. and Codón. (2004). Biocontrol of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7 (4), 249-260.
- Camacho, L. M. D. (2009). Aislamiento de cepas de *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa* sp. en la zona de Villa Guerrero, Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Tenancingo.
- Chérif, M. and Benhamou, N. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp. on *Fusarium oxysporum* f.sp.radicis-lycopersici. *Phytopathology*, 80, 1406-1414.
- Dennise, C., and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: I. Production of volatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society*, 57, 25-39.
- Domínguez, A. G. (2008). *Rosellinia necatrix* Prill. Asociado a la pudrición blanca de la raíz en *Rosa* sp. y su evaluación a sensibilidad de fungicidas en la zona de Villa Guerrero, Estado de México: Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Tenancingo.

- Duarte-Leal, Y., Pozo-Martínez, L. y Martínez-Coca, B. (2018). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislados de *Fusarium* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 33 (1), 1-10.
- Fernandes, Q. T., Cardoso, L. F., Stecca, S. A., Silva, B. R., Amorim, J. R. and Uihoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol lett*, 35 (9), 1461-1468.
- Figuroa, B. S., González, C. F. V., Cid del Prado, V. I., Alvarado, R. D., Mora, A. G., Llanderal, C. C., y Alatorre, R.R. (2002). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Enfermedades de origen fungosa en ornamentales. 97-105p.
- García-Velasco, R., Domínguez-Arizmendi, G., Chavarro-Carrero E. A. and Mora-Herrera, M. E. (2017). Pathogenicity of *Verticillium dahliae* klebahn in rootstock rose cv. Manetti. APS. Annual Meeting, August 5-9. San Antonio, Texas.
- García-Velasco, R., González-Díaz, J., Domínguez-Arizmendi, G., Ayala-Escobar, V. y Aguilar-Medel, S. (2012). *Rosellinia necatrix* sp. y su evaluación a sensibilidad de Fungicidas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18 (1), 39-54.
- GenBank (2019) GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, EE. UU.) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado 19 de Mayo de 2019.
- Guigón-López, C. y González-González, P. (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 annum* L). Revista Mexicana de Fitopatología, 22 (1), 117-124.
- Hajieghrari, B., Torabi-Gciglou, M. and Reza-Mohamadi, M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology, 7 (8), 697-972.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium, 41, 95–98.
- Harman, G. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. The American Phytopathological Society, 84 (4), 377-393.
- Herrera-Jiménez, E., John, L. A., Ferrera-Carretero, R., Cruz-Izquierdo, S. and Ferrera-Rodríguez, M. (2018). Comparative effects of two índole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan. Journal of soil science and plant nutrition, 18 (1), 188-201.
- Hicks, E., Bienkowski, B., Braithwatte, M., Mclean, K., Fallon, R. and Stewart A. (2014). *Trichoderma* strains suppress *Rhizoctonia* diseases and promote growth of potato. Phytopathologia Mediterranea, 53 (3), 502-514.
- Horst, R. K. and Cloyd, R. A. (2007). Compendium of rose diseases and pests. 2nd Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

- Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R. and Puckhaber, L. (2000). The History and Evolution of Current Concepts of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90 (3), 248-252.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87 (1), 4-10.
- Infante D., Martínez B., Gonzáles N. y Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección vegetal*, 24 (1), 14-21.
- Jiménez, D. R., Trapero, C. J., Boned, B. B., Landa, J. A. y Navas, C. (2009). Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. Departamento de protección de cultivos. *Bol. Sanidad Vegetal de Plagas*, 35, 295-615.
- Ju, Y. M. and Rogers, J. (2019). Xylariaceae: Home of the Xylariaceae (version Oct 2017). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist* (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J. Penev L., eds.). Recuperado de [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X
- Kirk P. M. (2019). *Species Fungorum* (version Oct 2017). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist* (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van,

- Zarucchi J. Penev L., eds.). Recuperado de [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.
- Kirk, P. M., Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Bourgoign, T. and De Wever, A. (2018). Catalogue of life, 2018 Annual Checklist. Recuperado de: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2018/search/all>.
- Kenneth, H. and Cloyd, A. (2007). Compendium of Rose Diseases and Pests. Infectious Disease. USA: APS. 5-40 p.
- Kubicek, C. and Harman, G. (2002). *Trichoderma* and *Gliocladium* Volume 1. (Ed), TAYLOR y FRANCIS 1798-1998 (pp. 9-29). Recuperado de <https://www.crcpress.com/TrichodermaAndGliocladiumVolume1BasicBiologyTaxonomyandGenetics/HarmanKubicek/p/book/9780748405725#googlePreviewContainer>. Consultado 12 de Agosto de 2018.
- Lisboa, B., Bochese, C., Vargar, L., Pfeifer, J., Radin, B. y Rota, A. (2007). Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. Ciencia Rural, 37 (5), 1255-1260.
- López, A. N. (2019). Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. FR. Estado de México: Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México Centro Universitario UAEM Tenancingo, 66 p. 86.

- Manzanos-Ayala, D., López-Aguilar, N., Domínguez-Arizmendi, G., y García-Velasco, R. (2019). Efectividad *in vitro* de tiabendazol frente a *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología, 37 (1), 29.
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en cultivos. Protección vegetal, 28 (1), 1-9.
- Martinn-Corder, M. y de Mole, I. (1998). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. Ciencias Agrícolas, 55 (1), 1-9.
- Merchán-Gaitán, J., Ferrucho, R. y Álvarez-Herrera, J. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* spp en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto (*Fragaria* sp). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 8 (1), 44-56.
- Michel-Aceves, A., Otero-Sánchez, M. y Salano-Pascacio, L. (2008). Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes causales de la “Escoba de bruja” del Mango (*Mangifera indica* L). Revista Mexicana de Fitopatología, 27 (1)18-26.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P., Horwitz, B., Zachow, C., Berg, G. and Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. Indian Journal of Microbiology., 52 (4), 522-529.
- NCBI, (2019). GenBank Resources. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Consultado 9 de mayo de 2019.

- Peláez-Álvarez, A., Santos-Villalobos, S., Yépez, E., Parra-Cota, F. y Reyes-Rodríguez, R. (2016). Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50<sup>®</sup> contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (6), 1401-1412.
- Ramírez-Gama R. M., Urzúa H. M. C., Camacho C. A., Tsuzuki R. G. y Esquivel-Cote R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento*. Editorial Trillas. México. 375 p.
- Ruiz, R. A. (2010). Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum*- *Sclerotium rolfsii*. Yautepec, Morelos. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.
- Salazar, A. L., Aponte, Y. G., Alcano, M., Sanabria, H. N. y Guzmán, J. J. (2012). Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Agragua, Venezuela. *Agronomía Tropical*, 62 (1-4), 7-16.
- Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J. y Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33 (3), 1-11.



- Sanabria, A., y Graboswaski, C. (2016). Control biológico de *Rosellinia* sp. causantes de la muerte súbita de macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp. *Investigación Agraria*, 18 (2), 77-86.
- Sánchez, M. I. (2011). Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativo del norte de Tamaulipas. Tamaulipas México. (Tesis de maestría no publicada). Instituto Politécnico Nacional Centro de Biotecnología Genómica. Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/jspui/handle/123456789/8464>. Consultado 10 de Agosto del 2019.
- Santamarina, M. P., García B. F. y Roselló, J. (2005) *Trichoderma*: mecanismos de control. Póster técnico. Recuperado de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/172-octubre-2005/trichoderma-mecanismos-de-control>. Consultado 15 de Julio de 2018.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7), 2883-2894.
- SIAP, (2019). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado 5 de Agosto de 2019.
- SIAP (2018). Avance de siembra y cosechas resumen por estado. Recuperado de: [http://infosiap.siap.gob.mx/Agricola\\_siap/AvanceNacionalCultivo.do](http://infosiap.siap.gob.mx/Agricola_siap/AvanceNacionalCultivo.do). Consultado 11 de Agosto de 2018.
- SIAMI, (2018). Sistema de información arancelaria vía internet. Recuperado de: <http://www.economia-snci.gob.mx/>. Consultado 20 de Noviembre de 2018.

SIAMI, (2019). Sistema de información arancelaria vía internet. Recuperado de: <http://www.economia-snci.gob.mx/>. Consultado 22 de Octubre de 2019.

Soto, B., Osorio, A., Muñoz, M., Galindo, R. y Marymount, C. (2002). El uso de *Trichoderma harzianum* como agente mejorados de plantas ornamentales. *Métodos de Investigación*, 12, 1-10.

Vera, D., Pérez, H. y Vallencia, H. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfato de la rízosfera Arazá (*Eugenia stipitata* Myrtaceae). *Acta Biológica colombiana*, 7 (1), 33-40.

Villalpando, C., Murillo, B., Zapata, S. R., Buerrero, E. E. F., y Monaco, C. (2016). Comparación *in vitro* de *Trichoderma* sp. como control biotecnológico de *Botrytis cinerea*. *Avance en energía y medio ambiente*, 20, 29-36.

Villamil-Carvagal, J. E., Viterio-Rosero, S. E., y Villegas-Orozco, W. L. (2015). Aplicación de antagonistas microbianas para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo condiciones de campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68 (1), 7442-7450.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, L., Lorito, M. and Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two comercial *Trichoderma* strains active against different phytopatogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43 (2), 143-148.

White T. J., Bruns T, Lee S and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In M.A. Innis, D.H.

Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.). PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, CA, USA.

Windham, M.T., Elod, Y. and Baker, R. (1989). Effects of *Trichoderma* spp. on Maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease, 73, 493-494.

Xiaojun, C., Wongkaew, S., Jie, Y., Haiyong, H., Shiping, W., Quigqun, T., Buensateai, N. (2014). *In vitro* inhibition of pathogenic *Verticillium dahliae*, causal agent of potato wilt disease in China by *Trichoderma* isolates. African Journal of Bacteriology, 13 (33), 3402-3411.