



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo

**SENSIBILIDAD *in vitro* DE CINCO AISLADOS DE *Trichoderma* spp.,
A FUNGICIDAS**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

P R E S E N T A

GUSTAVO ROJAS TAPIA

DIRECTORES

M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi

Dr. en C. Rómulo García Velasco

Tenancingo, Estado de México

Marzo 2020

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	VII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Distribución mundial de <i>Trichoderma</i> spp.	3
2.2 El género <i>Trichoderma</i>	3
2.3 Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp.	4
2.4 Características morfológicas del género <i>Trichoderma</i>	4
2.5 Generalidades de <i>Trichoderma</i> spp.	6
2.6 Condiciones óptimas de desarrollo	7
2.7 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	8
2.7.1 Competencia por espacio y nutrientes	8
2.7.2 Antibiosis	9
2.7.3 Micoparasitismo.....	10
2.7.4 Estimulación de crecimiento vegetal.....	12
2.7.5 Inducción de resistencia sistémica.....	12
2.8 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico	13
2.9 Producción de inóculo de <i>Trichoderma</i> spp. para el manejo de enfermedades.....	14
2.10 Fungicidas utilizados para el manejo de patógenos del suelo	14
2.10.1 Tiofanato metílico	15
2.10.2 Thiram	15
2.10.3 Benomilo	15
2.10.4 Captan.....	16
2.10.5 Quintozeno	16
2.10.6 Fluazinam.....	16
2.11 Compatibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. con fungicidas	19

3	JUSTIFICACIÓN	21
4	HIPÓTESIS	22
5	OBJETIVOS	22
5.1	Objetivo general	22
5.2	Objetivos específicos	22
6	MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1	Ubicación de la investigación	23
6.2	Aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
6.3	Fungicidas y dosis evaluadas	24
6.4	Tratamientos	25
6.5	Preparación del medio de cultivo PDA con fungicidas.....	25
6.6	Siembra de los aislados de <i>Trichoderma</i> sobre el medio PDA más fungicida	26
6.7	Variables evaluadas.....	26
6.8	Diseño experimental y análisis estadístico	27
6.9	Determinación del efecto fungicida o fungistático de los ingredientes activos evaluados	27
7	RESULTADOS	28
7.2	Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. asperellum</i> (Cut-B) a fungicidas.....	33
7.3	Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. tomentosum</i> (SS1) a fungicidas	36
7.4	Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. barbatum</i> (SS2) a fungicidas	40
7.5	Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. asperellum</i> (TFR3) a fungicidas	43
7.6	Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. harzianum</i> (TA4) a fungicidas	46
7.7	Comparación de la respuesta de sensibilidad a fungicidas entre los cinco aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	49
7.8	Comparación de la respuesta de sensibilidad a benomilo	49
7.9	Comparación de la respuesta de sensibilidad a captan.....	50
7.10	Comparación de la respuesta de sensibilidad a fluazinam	52
7.11	Comparación de la respuesta de sensibilidad a quintozeno + thiram.....	53
7.12	Comparación de la respuesta de sensibilidad a tiofanato metílico.....	54
8	DISCUSIÓN	55
9	CONCLUSIONES	60
10	RECOMENDACIONES	62
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

12 ANEXOS 71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los diferentes principios activos usados según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (FRAC, 2019).	18
Cuadro 2. Producto comercial, ingrediente activo, concentración y dosis del ingrediente activo de los fungicidas evaluados.....	24
Cuadro 3. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y fungicidas confrontados en los tratamientos para la evaluación de sensibilidad.	25
Cuadro 4. Área de crecimiento micelial (cm ²) de las réplicas 1 y 2, de <i>Trichoderma</i> spp. con fungicidas.	31
Cuadro 5. Promedio del área de crecimiento micelial (cm ²) de las réplicas 1 y 2, de <i>Trichoderma</i> spp. con fungicidas.....	32
Cuadro 6. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>Trichoderma asperellum</i> (Cut-B) en medio de cultivo PDA con fungicidas.	34
Cuadro 7. Área de crecimiento micelial de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) en medio de cultivo PDA con fungicidas.	38
Cuadro 8. Área de crecimiento micelial de <i>Trichoderma barbatum</i> (SS2) en medio de cultivo PDA con fungicidas.....	41
Cuadro 9. Área de crecimiento micelial de <i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3) en medio de cultivo PDA con fungicidas.	44
Cuadro 10. Área de crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) en medio de cultivo PDA con fungicidas.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Días transcurridos desde la siembra de <i>Trichoderma</i> spp., hasta el llenado de las cajas de Petri con medio de cultivo PDA. <i>T. asperellum</i> (Cut-B), <i>T. harzianum</i> (TA4), <i>T. tomentosum</i> (SS1), <i>T. barbatum</i> (SS2) y <i>T. asperellum</i> (TFR3).	29
Figura 2. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> en medio de cultivo PDA sin fungicida de a) <i>Trichoderma asperellum</i> (Cut-B), b) <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1), c) <i>Trichoderma barbatum</i> (SS2), d) <i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3), e) <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4).	30
Figura 3. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma asperellum</i> (Cut-B) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.	35
Figura 4. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma asperellum</i> (Cut-B) transferido a medio de cultivo PDA sin fungicidas, a partir de los tratamientos de: a) quintozeno + thiram, b) tiofanato metílico.	36
Figura 5. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.	39
Figura 6. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) transferido a medio de cultivo PDA sin fungicidas, a partir de los tratamientos de: a) quintozeno + thiram y b) benomilo.	40
Figura 7. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma barbatum</i> (SS2) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.	42

Figura 8. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (TFR3) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico. 45

Figura 9. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (TA4) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico. 48

Figura 10. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (CUT-B), *T. harzianum* (TA4) y *T. asperellum* (TFR3), en medio de cultivo PDA adicionado con benomilo. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P>0.05). 50

Figura 11. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3), *T. asperellum* (CUT-B), *T. harzianum* (TA4) y *T. tomentosum* (SS1), en medio de cultivo PDA adicionado con captan. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P>0.05). 51

Figura 12. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (CUT-B), *T. asperellum* (TFR3), *T. harzianum* (TA4) y *T. tomentosum* (SS1), en medio de cultivo PDA adicionado con fluazinam. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P>0.05). 52

Figura 13. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. asperellum* (CUT-B), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4), en medio de cultivo PDA adicionado con quintozeno + thiram. Barras con letra en

común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P>0.05$). 53

Figura 14. Área de crecimiento micelial (cm^2) de *T. asperellum* (CUT-B), *T. asperellum* (TFR3), *T. harzianum* (TA4), *T. barbatum* (SS2) y *T. tomentosum* (SS1), en medio de cultivo PDA adicionado con tiofanato metílico. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P>0.05$). 54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>T. asperellum</i> (Cut-B) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.	71
Anexo 2. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>T. tomentosum</i> (SS1) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.	72
Anexo 3. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>T. barbatum</i> (SS2) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.	73
Anexo 4. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>T. asperellum</i> (TFR3) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.	74
Anexo 5. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>T. harzianum</i> (TA4) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.	75
Anexo 6. Crecimiento micelial (cm ²) de <i>Trichoderma asperellum</i> (Cut-B) en medio de cultivo PDA con fungicidas.	76
Anexo 7. Crecimiento micelial de <i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1) en medio de cultivo PDA con fungicidas.	76
Anexo 8. Crecimiento micelial de <i>Trichoderma barbatum</i> (SS2) en medio de cultivo PDA con fungicidas.	77

Anexo 9. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3) en medio de cultivo PDA con fungicidas.....	77
Anexo 10. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> (TA4) en medio de cultivo PDA con fungicidas.....	78
Anexo 11. Efecto del ingrediente activo sobre los aislados; <i>T. asperellum</i> (Cut-B y TFR3), <i>T. tomentosum</i> (SS1), <i>T. barbatum</i> (SS2) y <i>T. harzianum</i> (TA4).....	79

RESUMEN

Los fungicidas utilizados para el control de enfermedades causan problemas de contaminación al ambiente y en algunos casos daño a la biota del suelo, incluyendo microorganismos benéficos, por tal motivo se deben utilizar métodos alternativos, siendo uno de estos el control biológico. *Trichoderma* spp. es un hongo que se encuentra en diferentes zonas como habitante natural del suelo, siendo uno de los antagonistas más exitosos para el manejo de fitopatógenos en el suelo, debido a que presenta diversos mecanismos de acción, como son: antibiosis, micoparasitismo, competencia, estimulación del crecimiento vegetal y la inducción de resistencia sistémica. La utilización combinada de fungicidas a la dosis mínima recomendada por el fabricante y el uso de aislados de *Trichoderma* spp. tolerantes a los fungicidas es una estrategia sostenible, por tal motivo en el presente estudio se planteó el objetivo de evaluar la sensibilidad *in vitro* de cinco aislados de *Trichoderma* spp. a fungicidas, donde se utilizaron cinco aislados monospóricos de *Trichoderma* spp.: *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4), frente a los fungicidas tiofonato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram y fluazinam, a las dosis 0.42 g, 0.15 g, 1 g, 0.75 g y 0.25 g de i. a. L⁻¹, respectivamente, donde se evaluó el área de crecimiento micelial, así como la comparación de la sensibilidad para cada uno de los tratamientos. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento y dos replicas. Los resultados obtenidos demuestran que los aislados de *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2),

y *T. harzianum* (TA4), presentan tolerancia a los fungicidas captan y fluazinam, pero con el fungicida benomilo *T. tomentosum* (SS1) fue sensible; no obstante, los otros cuatro aislados presentaron baja tolerancia la cual fue evidente debido al porcentaje de crecimiento micelial que se encontró entre 0.24 y 0.13 % respecto al testigo sin fungicida, además con tiofanato metílico el aislado *T. asperellum* (Cut-B) también presentó sensibilidad; en contraste con el testigo, *T. tomentosum* (SS1) creció 0.38 %, *T. barbatum* (SS2) 0.24 %, *T. harzianum* (TA4) 0.18 % y *T. asperellum* (TFR3) 0.08 %. Por otro lado, con el fungicida quintozeno + thiram, *T. asperellum* (Cut-B) y *T. tomentosum* (SS1) fueron sensibles, sin embargo, el efecto fue fungistático. Por lo que se concluye que las especies de *Trichoderma* evaluadas en este estudio presentan potencial para ser incluidas en el manejo integral y sustentable de los cultivos.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha despertado gran interés por el manejo biológico de patógenos de las plantas debido a la creciente preocupación de la sociedad por el uso de agroquímicos (Castillo *et al.*, 2017). En numerosos países, tanto los gobiernos como los agricultores y los consumidores de productos agrícolas, son cada día más conscientes de la problemática que generan diversos productos químicos en términos de su impacto en la inocuidad de los alimentos, en el ambiente, recursos naturales y la biodiversidad (Chiriboga *et al.*, 2015).

Por décadas, la práctica agrícola mayormente utilizada para el manejo de enfermedades fungosas en las plantas ha sido la aplicación de fungicidas sintéticos, los cuales se incluyen en el uso cotidiano contribuyendo a la crisis de la agricultura dificultando la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afectando la salud de las comunidades rurales y de los consumidores (Peres *et al.*, 2004). La búsqueda de la productividad a corto plazo en la agricultura ha dejado excesiva contaminación ambiental, por las constantes aplicaciones. Sin embargo, los patógenos desarrollan resistencia; por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas, siendo una de estas el manejo biológico

El uso de microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp., ha sido utilizado para el control de enfermedades teniendo gran éxito, debido a que actúan a través de diversos mecanismos de acción, como son: antibiosis, micoparasitismo, competencia, estimulación del crecimiento vegetal y la inducción de resistencia

sistémica, impidiendo el desarrollo de hongos causantes de enfermedades en las plantas (Infante *et al.*, 2009).

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 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 (Salazar *et al.*, 2012). Sin embargo, la distribución de algunas especies como *T. polysporum* y *T. minutisporum* se encuentran en tierras frías, *T. viride* y *T. aureovirida* están limitadas al Reino Unido y al norte de Europa, *T. pseudokoningii* abarca en el suroeste de Oceanía, *T. reesei* limitada a una banda ecuatorial estrecha, *T. stromaticum* su distribución está restringida solo en América del Sur, *T. longibrachiatum* se encontró en América del Norte y Sur, Europa, África e India, *T. citrinoviride* se encuentra en América del Norte y Sur, Europa, el sureste de Asia y al suroeste de Oceanía, y *T. harzianum* y *T. asperellum* son verdaderamente cosmopolitas (Samuels, 2006).

2.2 El género *Trichoderma*

Persoon en 1794, propuso por primera vez como género a *Trichoderma* spp. siendo un hongo microscópico, filamentoso. Después Rifai en 1969 realizó el primer agrupamiento de especies agregadas que en nuestros días se sigue utilizando Samuels (2006). Actualmente se conocen 355 especies registradas (Kirk, 2019). Cabe señalar que su aislamiento es relativamente sencillo en medio de cultivo PDA (Howell, 2003).

2.3 Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp.

De acuerdo con el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI) (2019), el género *Trichoderma* spp. se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

- Reino: Fungi
- Filo: Ascomycota
- Subdivisión: Pezizomycotina
- Clase: Sordariomycetes
- Orden: Hypocreales
- Familia: Hypocreaceae
- Género: *Trichoderma*

2.4 Características morfológicas del género *Trichoderma*

Samuels (2006), señala que los rasgos útiles para la caracterización e identificación en otros géneros de hongos con frecuencia no son tan útiles para diferenciar especies de *Trichoderma*, generalmente debido al estrecho rango de variación de la morfología o porque los términos descriptivos para discernir la variación de color o patrón no son lo suficientemente precisos. Sin embargo, las observaciones morfológicas son a menudo suficientes para la identificación de especies del hongo, al menos en la medida en que los taxones se han diferenciado morfológicamente de manera adecuada y se describen en la literatura existente.

Los caracteres de ADN del género *Trichoderma* se convirtieron en una herramienta para los análisis filogenéticos, por lo que las secuencias de múltiples genes se usan para inferir filogenias de taxones en todos los niveles, permitiendo el reconocimiento de especies. Sin embargo, no todas las especies que caen dentro del concepto filogenético del género son morfológicamente similares (Samuels, 2006).

Trichoderma spp. en sus primeras etapas de crecimiento presenta apariencia aterciopelada de color blanco, en el desarrollo del micelio se torna a un blanco verdoso para posteriormente permanecer con una tonalidad verde oliva y produce la formación de anillos concéntricos siendo estos característicos de dicho hongo (Acurio y España, 2017). Sin embargo, Blaszczyk *et al.* (2014) menciona que algunas especies del género *Trichoderma* producen varios pigmentos, que van desde un amarillo verdoso hasta un tinte rojizo, gris o marron, aunque también pueden ser incoloras.

T. viride forma pústulas algodonosas de un color blanco que posteriormente se compactan y esporulan tomando un color verde de textura granular, con conidióforos ramificados alrededor de la pústula y desprende un olor a coco mientras que *T. harzianum* torna un color blanco verdoso hasta dar una tonalidad verde oliva, además se produce la formación de anillos concéntricos los mismos que son característicos del género (Acurio y España, 2017).

Este hongo produce tres tipos de estructuras: hifas, clamidosporas y conidios, siendo estos últimos los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol (Chiriboga *et al.*, 2015), de tal modo que se caracterizan por poseer

una pared gruesa exterior, constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) protectoras del protoplasto. Las hifas y clamidosporas se diferencian de los conidios por poseer de una pared celular mucho más delgada y no está formada por capas constitutivas. La ventaja del conidio de poseer una pared celular gruesa es la posibilidad de aislarlo de su medio natural y que sobreviva a condiciones adversas, manteniéndolo en dormancia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación. En consecuencia, los conidios son verdaderas semillas que utiliza el hongo para colonizar nuevos sustratos (Agamez *et al.*, 2008).

Trichoderma spp. es capaz de degradar sustratos complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su crecimiento gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras). Así mismo, asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio. Es un hongo con una alta capacidad de tolerar un amplio intervalo de temperaturas y, por lo tanto, amplia distribución ecológica (Agamez *et al.*, 2008).

2.5 Generalidades de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo, sobre todo con abundante materia orgánica y alta densidad de raíces, también se puede encontrar asociado a la superficie de plantas y corteza de madera descompuesta (Pineda *et al.*, 2017). Además, presenta rápido crecimiento y desarrollo en una amplia gama de sustratos, tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitats donde se desarrollan fitopatógenos (Chiriboga *et al.*, 2015).

Trichoderma spp. ha sido el hongo micoparásito más exitoso entre los organismos biocontroladores para el manejo de enfermedades producidas por patógenos del suelo, por lo que Agamez *et al.* (2008), describen que este género se encuentra en un número importante de los suelos agrícolas, ya que su desarrollo se ve favorecido por rápida colonización. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos le confiere la posibilidad de encontrarse en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos para su multiplicación.

No obstante, Blaszczyk *et al.* (2014), mencionan que las especies fúngicas del género *Trichoderma* se caracterizan por tener una producción abundante de conidios, así como por la capacidad de producir esclerocios.

2.6 Condiciones óptimas de desarrollo

Los valores óptimos para su crecimiento y esporulación oscilan alrededor de los 25 °C, un factor importante en dicho género a tener en cuenta durante la multiplicación fundamentalmente en la esporulación es la conveniencia de periodos alternados de luz y oscuridad, que favorecen su colonización sobre diferentes sustratos sólidos (Agamez *et al.*, 2008).

El género *Trichoderma* requiere temperaturas en un intervalo de 15 a 35 °C, siendo la óptima de 25°C, en algunos casos ciertas 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 %. Pueden crecer en suelos con pH desde 5,5 a 8,5 siendo

el óptimo de 5.5 a 6.5, pero pueden sobrevivir en intervalos mayores, ya que tiene la capacidad de acidificar el medio (Martínez *et al.*, 2013).

2.7 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el manejo de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas y a su facilidad para ser aisladas y cultivadas (Papavizas *et al.*, 1982). Además, está biológicamente adaptado para colonizar de manera eficaz los sustratos y sobrevivir en condiciones adversas, fundamentalmente, en forma de clamidosporas (Agamez, 2009).

Sivila y Jujuy (2013), señalan que *Trichoderma* spp. presenta distintos mecanismos de acción para ejercer su antagonismo, dependiendo de las características de la cepa, del patógeno y las condiciones ambientales. Puede actuar por medio de competencia, antibiosis, micoparasitismo, inducción de resistencia sistémica y estimulación de crecimiento vegetal (Rajesh *et al.*, 2016).

2.7.1 Competencia por espacio y nutrientes

La competencia se define como el crecimiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes, luz, etc.), siempre y cuando su utilización reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás organismos. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características que posee *Trichoderma* spp., como su capacidad cosmopolita, velocidad de crecimiento,

desarrollo y resistencia a fungicidas, así mismo por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Ahmad y Baker, 1987).

Infante *et al.* (2009), afirman que la evidencia de la plasticidad ecológica de *Trichoderma* spp. es su presencia en diferentes tipos y usos de suelo, es excelente competidor por espacio y nutrientes, aunque la competencia depende de la especie. Adicionalmente Agamez (2009), menciona que dicho hongo está biológicamente adaptado para tener alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, esto se debe a que posee amplia riqueza de enzimas que hacen que sea eficiente como saprófito del suelo.

2.7.2 Antibiosis

Es una interacción biológica que consiste en la imposibilidad de vivir de unos organismos en las inmediaciones de otros, debido a que éstos segregan sustancias llamadas antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas de los patógenos resistentes al antibiótico. Algunas cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico y tales sustancias inhibitoras son consideradas antibióticos (Infante *et al.*, 2009).

Rodríguez *et al.* (2010), mencionan que el efecto de antibiosis se debe a la producción de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser volátiles o difusibles; pero que, en cualquiera de los casos, sin entrar en contacto físico con el patógeno, pueden inhibir o restringir su crecimiento. Sin embargo, Vinale *et al.* (2006) afirman que algunas cepas de *Trichoderma* spp. producen trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticina, richotoxina, metabolitos que son responsables del mecanismo antagónico.

Martínez *et al.* (2008) reiteran la desactivación de los factores de patogenicidad de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos que constituye un mecanismo de antagonismo indirecto poco estudiado; sin embargo, Howell (2003) explica que es posible que el potencial enzimático de *Trichoderma* spp. actúe como antibiótico para detener el proceso infeccioso de los patógenos y que este sea mucho mayor, debido a que dicho hongo secreta más de 70 metabolitos, entre ellos sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas.

2.7.3 Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis de tipo parasitismo entre organismos, generalmente están implicadas enzimas extracelulares como la quitinasa y celulasa, que son parte de la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parásitos (Infante *et al.*, 2009).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotróficamente hacia el micelio del hospedante, se adhieren a las hifas del

mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en estados tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Infante *et al.*, 2009). Durante el proceso complejo de la interacción antagonista-patógeno ocurren cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión-enrollamiento y actividad lítica (Infante *et al.*, 2009):

A) Crecimiento quimiotrófico

El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico en el que se da una etapa de localización del hospedante y se ha demostrado que *Trichoderma* spp. puede detectarlo a distancia, y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico Chet y Inbar (1994).

B) Reconocimiento

Se da un reconocimiento molecular entre *Trichoderma* spp. y el hospedante, el cual se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Infante *et al.*, 2009).

C) Adhesión y enrollamiento

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 y apresorios, se enrollan alrededor de éstas, estando mediado por procesos enzimáticos (Peres, 2004).

D) Actividad lítica

En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Infante *et al.*, 2009).

2.7.4 Estimulación de crecimiento vegetal

Trichoderma spp. promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas debido a la producción de metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal, además la capacidad de multiplicarse en el suelo y adherirse a las raíces de las plantas para liberar hormonas de crecimientos como auxinas, giberelinas y citoquininas que inducen el desarrollo y crecimiento de las plantas (Vera *et al.*, 2002).

2.7.5 Inducción de resistencia sistémica

Trichoderma spp., se encarga de activar el sistema de defensa de la planta, por flujos de iones, para inducir el sistema enzimático oxidativo o activando el sistema de resistencia inducida, seguido de deposición de callos y síntesis de polifenoles. Induce 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 ciertos niveles de tolerancia a la invasión de patógenos (Mukherjee *et al.*, 2012; Howell *et al.*, 2003).

2.8 *Trichoderma* spp. como agente de control biológico

El empleo de microorganismos antagónicos competitivos para la protección de cultivos de patógenos fúngicos del suelo es una realidad; en particular, especies del género *Trichoderma* que han acaparado la atención como agentes de biocontrol (Stefanova, 2007). Ciertas especies de *Tichoderma* spp. se han manipulado, para hacerlas más competitivas en la rizosfera, lo que ha sido observado en algunas cepas que han mostrado tener una mejor capacidad de biocontrol hacia el fitopatógeno del suelo (Guazzone *et al.*, 2016).

Algunas de las especies más utilizadas de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico son: *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. hamantum*, *T. reesei* y *T. koningii* (Pineda *et al.*, 2017). *T. asperellum* tiene potencial de biocontrol por la inhibición y antagonismo sobre *Fusarium* sp., y es reconocido por su efectividad en la reducción de enfermedades causadas por *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea* Pers. y los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* y *Phytophthora*, entre otras (Michel *et al.*, 2013).

2.9 Producción de inóculo de *Trichoderma* spp. para el manejo de enfermedades

Las cepas de *Trichoderma* spp. crecen rápidamente cuando se inoculan en suelo ya que son naturalmente resistentes a diversos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas, fungicidas y compuestos fenólicos (Chet y Inbar 1994). De manera masiva el inóculo de *Trichoderma* se produce por fermentación; y para uso comercial es preferido el material seco, las hifas son poco resistentes al secado por lo que en formulaciones se trabaja con conidios y clamidosporas; cabe señalar que los conidios son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad por diferentes vías: soporte sólido y en cultivos líquidos estáticos y agitados (Carballo *et al.*, 2004).

2.10 Fungicidas utilizados para el manejo de patógenos del suelo

El uso de fungicidas no es una práctica económica y ambientalmente sustentable, ya que el uso excesivo de estos ha conducido a fuertes problemas de contaminación ambiental (Wu *et al.*, 2009). Infante *et al.* (2009) mencionan que el control químico es uno de los más utilizados y, en la mayoría de los casos, causa severos daños al ambiente, su costo es elevado debido a que su control no es selectivo; esto afecta la sobrevivencia de microorganismos antagonistas.

Entre los fungicidas que más se utilizan para el manejo de fitopatógenos del suelo se encuentran: tiofanato metílico, thiram, benomilo, captan, quintozeno y fluazinam (Cuadro 1).

2.10.1 Tiofanato metílico

Pertenece al grupo químico de los tiofanatos, con movimiento por xilema y floema, y actividad fungicida, preventiva y curativa, por vía sistémica y contacto. Actúa impidiendo el crecimiento micelial y la germinación de conidios, siendo altamente tóxico para el hongo e inhibe la formación de tubulina en la mitosis. En la superficie de la planta se transforma en bencimidazol metilcarbamato (carbendazim), compuesto que es absorbido y transportado fácilmente por la savia (De Liñán, 2012).

2.10.2 Thiram

Pertenece al grupo químico de los ditiocarbamatos con actividad fúngica por contacto, no sistémica, preventivo, de amplio espectro. Inhibe las enzimas de radical metálico y las sulfhídricas e interfiere en la respiración celular del hongo. Reacciona fácilmente con los tioles incluida la coenzima A, por un mecanismo de intercambio de radicales interfiriendo en la transducción de señales osmóticas. Actúa sobre los sistemas enzimáticos provocando la acumulación de ácido pirúvico que impide la germinación de las esporas. Es un inhibidor multisitio (actúa directamente sobre el hongo) (De Liñán, 2012).

2.10.3 Benomilo

Pertenece al grupo químico de los bencimidazoles, es sistémica de absorción radical y foliar, translocación principalmente acrópetala y actividad fungicida por contacto preventivo y curativo. Dentro de la célula del hongo el ingrediente activo

bencimidazol se transforma en metilbencimidazol-2il carbamato (carbendazimm, MBC) y posteriormente a un mononucleótido activo. MBC actúa interfiriendo en la síntesis del DNA, inhibe la formación de tubulina en la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del DNA al RNA (De Liñán, 2012).

2.10.4 Captan

Pertenece al grupo químico de las dicarboxamidas, es de actividad fungicida, preventiva y curativa, de amplio espectro y absorción por vía radical y foliar. Reacciona con las enzimas sulfhídricas con producción de tiofosfano, sustancia tóxica para las células del hongo, e interfiere el proceso de respiración celular de los hongos por lo que inhibe la germinación de esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelial. Es un inhibidor multisitio (actúa directamente sobre el hongo) (De Liñán, 2012).

2.10.5 Quintozeno

Pertenece al grupo químico de los clorobencenos con actividad fúngica de contacto, actuando negativamente en la célula del hongo de tal modo que interfiere con la división mitótica y también causa lisis de la membrana mitocondrial causando de este modo un daño en general (De Liñán, 2012).

2.10.6 Fluazinam

Pertenece al grupo químico de las 2,6-dinitroanilinas, actúa como desacoplador de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, por tanto, se

inhibe la producción de ATP al no generarse el gradiente de pH, lo que afecta la respiración de las células del hongo, y por ende a los estadios previos a la infección de las plantas, la movilidad de las zoosporas y la esporulación (De Liñán, 2012).

Cuadro 1. Clasificación de los diferentes principios activos usados según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (FRAC, 2019).

Modo de acción	Código y punto de acción	Nombre del grupo	Grupo químico	Nombre común
1.- Citoesqueleto 2.- Proteínas motoras	Ensamblaje de la β -tubulina en mitosis	Fungicidas MBC (metil benzimidazol carbamatos).	Tiofanatos	Tiofanato metílico
Actividad multisitio 1.- Citoesqueleto 2.- Proteínas motoras 3.- Respiración celular	Inhibidor multisitio	Disulfuro de tetrametil tiuram	Ditiocarbamatos	Thiram
1.- Citoesqueleto 2.- Proteínas motoras	Ensamblaje de la β -tubulina en mitosis	Metil 1-butilcarbamoil-2-bencimidazol-carbamato	Benzimidazoles	Benomilo
Actividad multisitio 1.- Citoesqueleto 2.- Proteínas motoras 3.- Respiración celular	Inhibidor multisitio	ftalimidas (electrófilos)	Ftalimidas	Captan
1.- Transporte o síntesis de lípidos 2.- Integridad de la membrana	Peroxidación de la célula	Pentacloronitrobenceno	Hidrocarburo aromático	Quintozeno
1.- Respiración celular	Desacopladores de la fosforilación oxidativa	Qil - fungicidas (Inhibidores internos de la quinona)	2,6-dinitro-anilinas	Fluazinam

2.11 Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con fungicidas

La compatibilidad del género *Trichoderma* con fungicidas es objeto de estudio de algunos autores debido a la interrogante que surge sobre su posible inhibición por estos plaguicidas (Franco y Orrego 2013). Sin embargo, Muiño *et al.* (2001) habla acerca de un estudio realizado de compatibilidad de *Trichoderma* spp. con fungicidas, donde se demuestra que benomilo posee a una alta mortalidad del hongo, por lo que fue considerado como toxico, sin embargo, thiram provocó una mortalidad considerable a las 48 horas, pero retomo su crecimiento a los 5 días, por lo que se consideró moderadamente toxico y compatible.

Trichoderma spp. es incompatible con benomilo, carbendazim, imazalil, propiconazol, tebuconazol y triflumizol (De Liñán, 2012). Khirallah *et al.* (2016), mostraron que la sensibilidad de *Trichoderma harzianum* a varios fungicidas era variable dependiendo de la concentración y los ingredientes activos, por lo que Barakat y Almasri (2017), demostraron la compatibilidad de *Trichoderma harzianum* con fungicidas tolerados a nivel *in vitro*, *in vivo* e invernadero.

Esta práctica de compatibilidad de fungicidas y microorganismos promete ventajas, tales como reducción del uso de fungicidas, menor incidencia de patógenos, en especial los de difícil control; mayores rendimientos en los cultivos y la disminución del impacto ambiental (Castillo *et al.*, 2017).

El conocimiento de dicha compatibilidad de los agentes de control biológico con fungicidas es indispensable para mejorar la efectividad en el manejo de enfermedades y la reducción de las altas concentraciones de los fungicidas, evitando de este modo generar un daño al ambiente (Monte, 2001).

3 JUSTIFICACIÓN

Trichoderma spp. es un hongo que habita en el suelo y que es utilizado como agente de control biológico contra varios fitopatógenos, su efectividad se debe a que presenta diversos mecanismos de acción, entre estos: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, estimulación de crecimiento vegetal e inducción de resistencia sistémica en las plantas.

En la región florícola del Estado de México se han desarrollado estudios dirigidos al aislamiento de este microorganismo antagonista y a la determinación de sus mecanismos de acción contra hongos fitopatógenos de importancia en la floricultura, tal es el caso de los aislados *T. asperellum* (Cut-B y TFR3) *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4) Martínez-Tapia *et al.* (2019) y Alonso (2020), los resultados obtenidos son prometedores debido a que el hongo actúa como agente de control biológico, por lo que representa una alternativa viable para disminuir el uso de productos químicos que dañan al ambiente. Por otro lado, se ha reportado que *Trichoderma* spp. posee resistencia a algunos fungicidas; dicha información es sumamente valiosa porque a partir de ello, se puede proponer la incorporación de métodos químicos y biológicos en el manejo de fitopatógenos en campo. Por lo que en el presente trabajo de investigación se planteó por objetivo: determinar la sensibilidad *in vitro* de cinco aislados de *Trichoderma* spp. a fungicidas.

4 HIPÓTESIS

Con base en las evidencias de compatibilidad de *Trichoderma* spp. con fungicidas, cinco aislados del género *Trichoderma* correspondientes a las especies de *Trichoderma asperellum* (Cut-B y TFR3) *Trichoderma tomentosum* (SS1), *Trichoderma barbatum* (SS2) y *Trichoderma harzianum* (TA4) no presentarán sensibilidad a los fungicidas: tiofonato metílico, benomilo, captan, fluazinam y quintozeno + thiram, a las dosis mínimas recomendables por el fabricante.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la sensibilidad *in vitro* de cinco aislados de *Trichoderma* spp. a fungicidas.

5.2 Objetivos específicos

Determinar la sensibilidad *in vitro* de los aislados *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4), a los fungicidas tiofonato metílico, benomilo, captan, fluazinam y quintozeno + thiram, a las dosis mínimas recomendadas por los fabricantes del producto.

Comparar la respuesta de sensibilidad entre los aislados de *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4), a los fungicidas tiofonato metílico, benomilo, captan, fluazinam y quintozeno + thiram, a las dosis mínimas recomendadas por los fabricantes del producto.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación de la investigación

El trabajo de investigación se desarrolló en el “Laboratorio de Fitopatología” del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado sobre la Carretera Tenancingo - Villa Guerrero Km. 1.5, C.P. 52400 Tenancingo, Estado de México, México.

6.2 Aislados de *Trichoderma* spp.

Se utilizaron cinco aislados monospóricos de *Trichoderma* spp. aislados e identificados por Alonso (2019) como: *T. asperellum* (CUT-B), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4), los cuales se encuentran bajo resguardo del laboratorio de fitopatología conservados en trigo (*Triticum* spp.) refrigerado a 6-8 °C.

El aislado Cut-B se obtuvo a partir de muestras de suelo de un invernadero cultivado con rosa, ubicado en el Centro Universitario UAEM Tenancingo; los aislados SS1 y SS2 se obtuvieron de muestras de suelo de una zona forestal de la localidad de San Simonito, Tenancingo, Estado de México; TFR3 fue aislado de un cultivo de rosa afectado por *Rosellinia necatrix* en el municipio de Tenancingo, Estado de México; y TA4 se aisló de plantas de alstroemeria (*Alstroemeria*) con síntomas de marchitez, provenientes del municipio de Villa Guerrero (Alonso-Bahena *et al.*, 2018; Alonso, 2020).

Para la activación de aislados se preparó medio de cultivo papa, dextrosa y agar (PDA, marca BDBioxon®), para esto se utilizaron 39 g de medio de cultivo mezclado con 1000

mL de agua destilada. El pesaje del medio de cultivo se llevó a cabo en una balanza analítica (Explorer® Pro), una vez realizada la mezcla se esterilizó en autoclave (All American®) a temperatura de 121 °C y presión de 1.5 kg/cm² durante 15 minutos. Una vez estéril se vació en cajas de Petri de cristal (Kimax®), en cuanto solidificó el medio de cultivo se procedió a la siembra colocando un grano de trigo en el medio de cultivo para promover su crecimiento y desarrollo.

6.3 Fungicidas y dosis evaluadas

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* de los ingredientes activos: tiofanato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram y fluazinam. Las dosis evaluadas correspondieron a la recomendación mínima de la etiqueta, las cuales se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Producto comercial, ingrediente activo, concentración y dosis del ingrediente activo de los fungicidas evaluados.

Producto Comercial	Ingrediente activo (i. a.)	Concentración de i. a.	Dosis del producto* por litro	Dosis i. a.
Cercobim M®	Tiofanato metílico	70 %	0.6 g	0.42 g
Promilo 50 P.H.®	Benomilo	50 %	0.3 g	0.15 g
Captan 50 WP®	Captan	50 %	2 g	1 g
Interguzan 30-30®	Quintozeno+Thiram	30 %+30 %	1.25 g	0.75 g
Shogun 500FW®	Fluazinam	50 %	0.5 mL	0.25 mL

*Dosis mínima recomendada por el fabricante del producto comercial.

6.4 Tratamientos

Los tratamientos evaluados se conformaron como se indica en el Cuadro 3., donde cada aislamiento fue evaluado con los cinco fungicidas, cada uno con su respectivo testigo.

Cuadro 3. Aislados de *Trichoderma* spp. y fungicidas confrontados en los tratamientos para la evaluación de sensibilidad.

Cepas	Fungicidas
<i>Trichoderma asperellum</i> (CUT-B)	Tiofonato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram, fluazinam
<i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3)	Tiofonato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram, fluazinam
<i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1)	Tiofonato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram, fluazinam
<i>Trichoderma barbatum</i> (SS2)	Tiofonato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram, fluazinam
<i>Trichoderma harzianum</i> (TA4)	Tiofonato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram, fluazinam

6.5 Preparación del medio de cultivo PDA con fungicidas

Para el desarrollo de la prueba se utilizó medio de cultivo PDA, por otro lado, los fungicidas a la respectiva dosis fueron pesados en una balanza analítica utilizando material estéril (papel aluminio y espátulas) y en el caso del medio de cultivo líquido se dosificó con el uso de una micropipeta (Boeco®).

Una vez estéril el medio de cultivo se mantuvo a una temperatura constante de 50 °C y se le adicionó la respectiva dosis de fungicida. Enseguida se colocó sobre un termoagitador orbital (Thermo Scientific®) hasta que el fungicida se disolvió por completo y se vació en cajas de Petri.

6.6 Siembra de los aislados de *Trichoderma* sobre el medio PDA más fungicida

Por separado para cada aislado de *Trichoderma*, con un sacabocados se cortaron círculos de 0.8 cm de diámetro de medio PDA con crecimiento de *Trichoderma* spp. de siete días de edad, estos se colocaron en el centro de las cajas de Petri con el respectivo fungicida y se mantuvieron en una incubadora (LINDBERG/BLUEM®) a temperatura de 24 °C ± 1°C y luz natural.

6.7 Variables evaluadas

Por cada tratamiento se determinó el área de crecimiento micelial; para esto, cuando al menos una repetición del testigo de cada aislado de *Trichoderma* alcanzó crecimiento del 100% en la caja de Petri se marcaron todos los tratamientos con un marcador indeleble de punto fino bajo un contador de colonias (Felisa®) a contra luz para verificar el margen del crecimiento y evitar errores en el trazado. Posteriormente se tomaron fotografías y se determinó el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43).

6.8 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento (Cuadros 2 y 3). Los datos se analizaron por aislado y fungicida con el programa InfoStat, versión estudiantil, por medio de un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($P > 0.05$).

6.9 Determinación del efecto fungicida o fungistático de los ingredientes activos evaluados

De las siembras de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre medio PDA más fungicida (tratamientos), en los que no se presentó crecimiento micelial se determinó el efecto fungicida o fungistático que estos presentaron; para lo cual, los cortes circulares de 0.8 cm de diámetro que fueron sembrados sobre los tratamientos se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo PDA y se mantuvieron en una incubadora (LINDBERG/BLUEM®) a temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y luz natural. Se registró la presencia o ausencia de crecimiento micelial.

7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente ensayo indican que los tratamientos testigo de todos los aislados de *Trichoderma* spp. mostraron rápido crecimiento micelial. El momento en el que al menos una repetición de estos cubrió el 100 % del medio de cultivo PDA dependió del aislado; para el caso de Cut-B y TA4 el llenado se presentó a los tres días, mientras que SS1, SS2 y TFR3 cubrieron por completo la caja de Petri a los cuatro días después de la siembra (Figuras 1 y 2).

El análisis de varianza muestra que no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en las dos réplicas de cada tratamiento en el área de crecimiento micelial de los cinco aislados de *Trichoderma* spp. (Cuadro 4, Anexos 1 al 5). Derivado de lo anterior, por tratamiento se obtuvo el promedio del área de crecimiento micelial de cada repetición y con esto los análisis correspondientes (Cuadro 5).

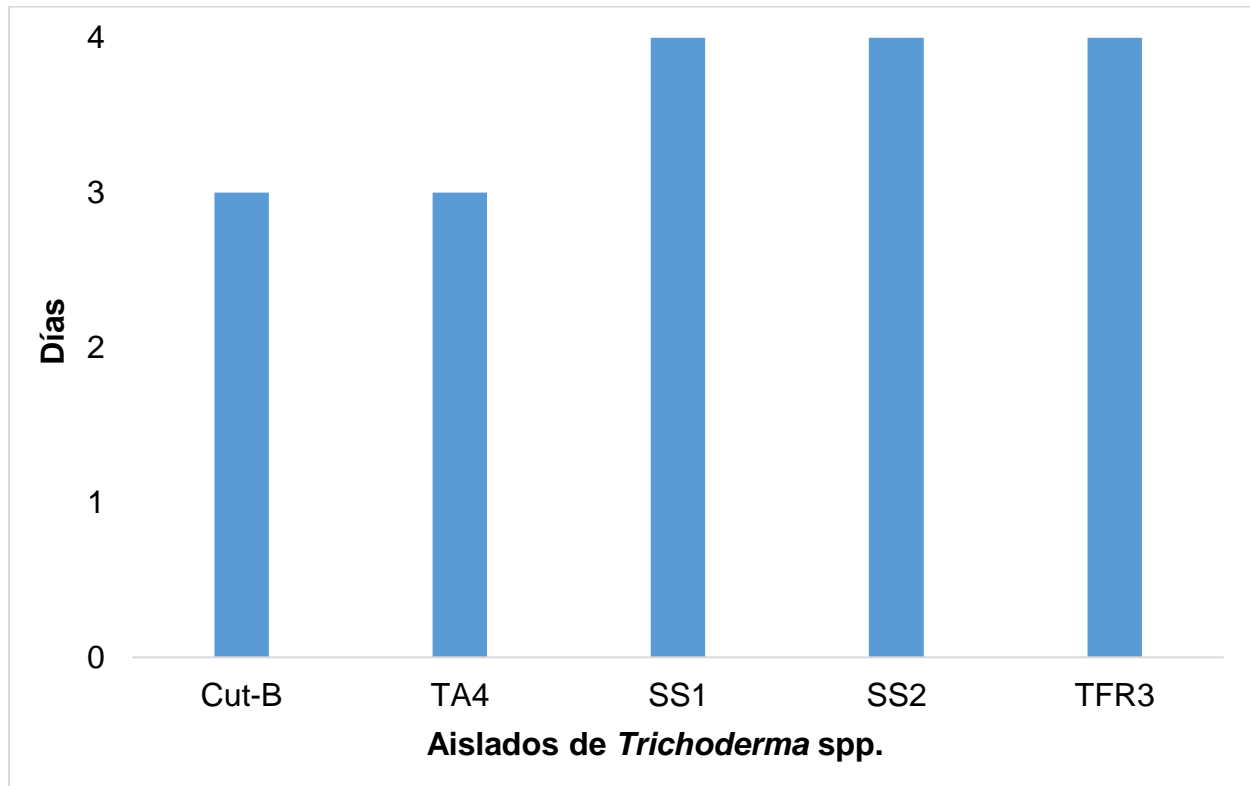


Figura 1. Días transcurridos desde la siembra de *Trichoderma* spp., hasta el llenado de las cajas de Petri con medio de cultivo PDA. *T. asperellum* (Cut-B), *T. harzianum* (TA4), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. asperellum* (TFR3).

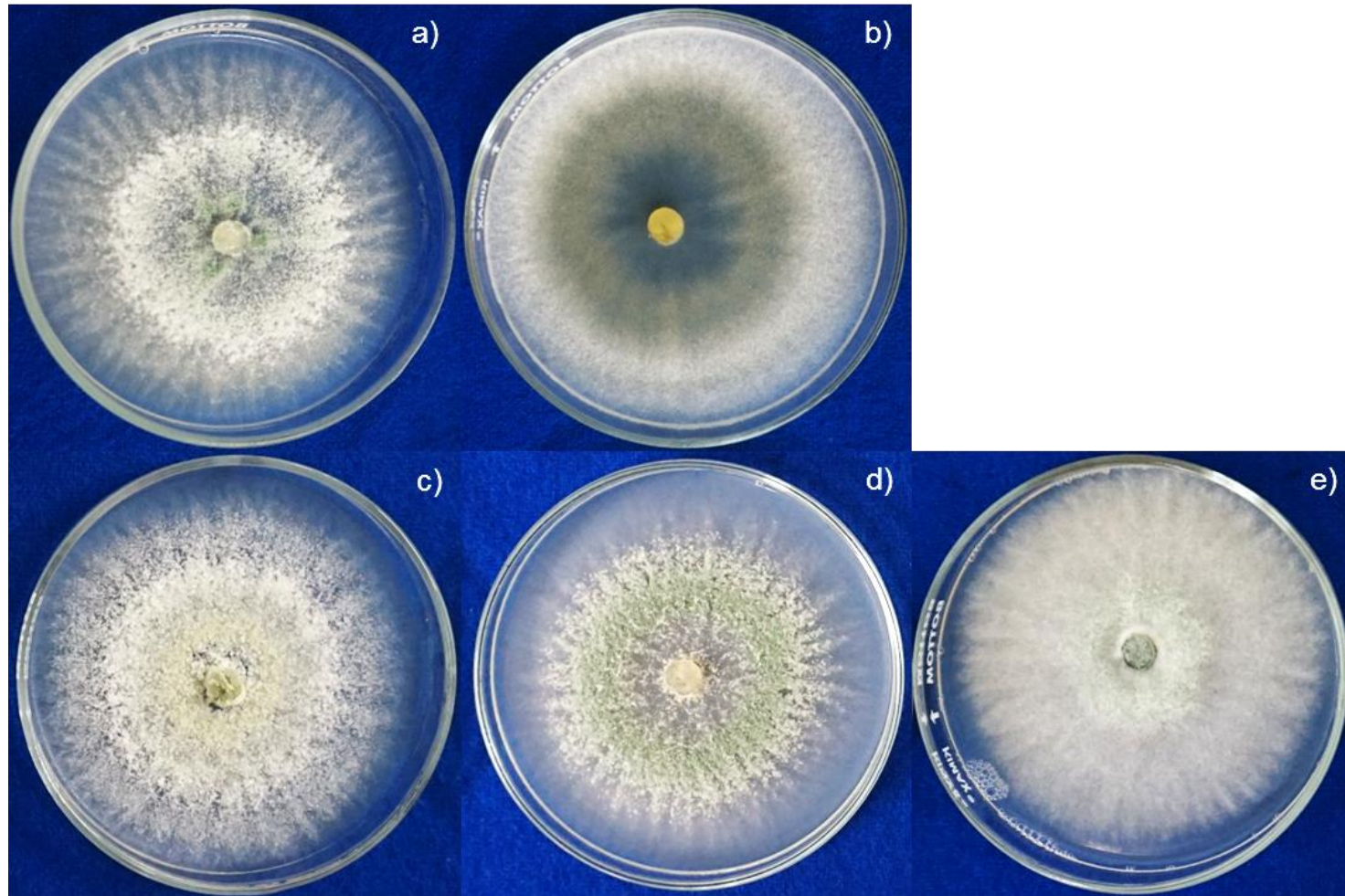


Figura 2. Crecimiento micelial *in vitro* en medio de cultivo PDA sin fungicida de a) *Trichoderma asperellum* (Cut-B), b) *Trichoderma tomentosum* (SS1), c) *Trichoderma barbatum* (SS2), d) *Trichoderma asperellum* (TFR3), e) *Trichoderma harzianum* (TA4).

Cuadro 4. Área de crecimiento micelial (cm²) de las réplicas 1 y 2, de *Trichoderma* spp. con fungicidas.

Fungicida	<i>Trichoderma asperellum</i> (Cut-B)		<i>Trichoderma tomentosum</i> (SS1)		<i>Trichoderma barbatum</i> (SS2)		<i>Trichoderma asperellum</i> (TFR3)		<i>Trichoderma harzianum</i> (TA4)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Testigo	56.243	56.243	56.243	56.243	45.834	44.274	41.401	41.199	30.425	28.633
Benomilo	0.101	0.086	0	0	0.034	0.0968	0.147	0.113	0.118	0.073
Captan	1.197	1.181	2.797	1.015	0.632	0.423	1.163	0.897	1.143	1.311
Fluazinam	0.649	0.530	5.541	6.927	1.008	0.164	1.149	1.084	1.596	1.768
Quintozeno + thiram	0	0	0	0	0.429	0.178	0.415	0.235	0.431	0.329
Tiofanato metílico	0	0	0.411	0	0.164	0.106	0.078	0	0.171	0.028

Cuadro 5. Promedio del área de crecimiento micelial (cm²) de las réplicas 1 y 2, de *Trichoderma* spp. con fungicidas.

Aislado	<i>T. asperellum</i> (Cut-B)	<i>T. tomentosum</i> (SS1)	<i>T. barbatum</i> (SS2)	<i>T. asperellum</i> (TFR3)	<i>T. harzianum</i> (TA4)
Tratamiento	promedio	promedio	promedio	promedio	promedio
Testigo	56,24	56,24	45,05	41,30	29,53
Benomilo	0,09	0,00	0,07	0,13	0,10
Captan	1,19	1,91	0,53	1,03	1,23
Fluazinam	0,59	6,23	0,59	1,12	1,68
Quintozeno + thiram	0,00	0,00	0,30	0,33	0,38
Tiofanato metílico	0,00	0,21	0,14	0,00	0,10

7.2 Sensibilidad *in vitro* de *T. asperellum* (Cut-B) a fungicidas

El área de crecimiento micelial *in vitro* de *T. asperellum* (Cut-B) con los fungicidas fue estadísticamente diferente al testigo ($P>0.05$). Por otro lado, no se presentaron diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos con quintozeno + thiram, tiofanato metílico y benomilo, en los cuales al término del experimento fue evidente que el hongo fue sensible, ya que los tratamientos con quintozeno + thiram y tiofanato metílico inhibieron el 100 % del crecimiento, y benomilo el 99.83 % (Cuadro 6).

Entre los tratamientos con fluazinam y captan se presentaron diferencias estadísticas ($P>0.05$) en el área de crecimiento micelial, siendo esta de 0.59 y 1.19 cm², respectivamente. De acuerdo con los datos anteriores, el área de inhibición de los fungicidas respecto al testigo fue de 98.95 y 97.88 %, respectivamente, lo que indica que a las dosis evaluadas *T. asperellum* (Cut-B) presenta tolerancia (Cuadro 6).

En cuanto a las características culturales de cada uno de los tratamientos, *T. asperellum* (Cut-B) tratado con captan presentó crecimiento irregular y abundante esporulación, lo cual fue evidente debido a la coloración verdosa y textura granular que se presentó en el centro de la caja de Petri; en contraste, con fluazinam el crecimiento micelial fue irregular y de consistencia compacta, sin evidencia de la formación de esporas debido a la colocación blanca del micelio (Figura 3).

Respecto al efecto fungicida y/o fungistático de los tratamientos con quintozeno + thiram, tiofanato metílico, al resembrar a *T. asperellum* (Cut-B) en medio de cultivo sin fungicidas retomó su crecimiento a los nueve días en el caso de quintozeno + thiram, por lo que el

efecto fue fungistático; con tiofanato metílico no hubo crecimiento por lo que el efecto fue fungicida (Cuadro 6, Figura 4, Anexo 6).

Cuadro 6. Área de crecimiento micelial (cm²) de *Trichoderma asperellum* (Cut-B) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Efecto
Quintozeno + thiram	0 ^a	100	Fungistático
Tiofanato metílico	0 ^a	100	Fungicida
Benomilo	0.09 ^a	99.83	No aplica
Fluazinam	0.59 ^b	98.95	No aplica
Captan	1.19 ^c	97.88	No aplica
Testigo	56.24 ^d	---	No aplica

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

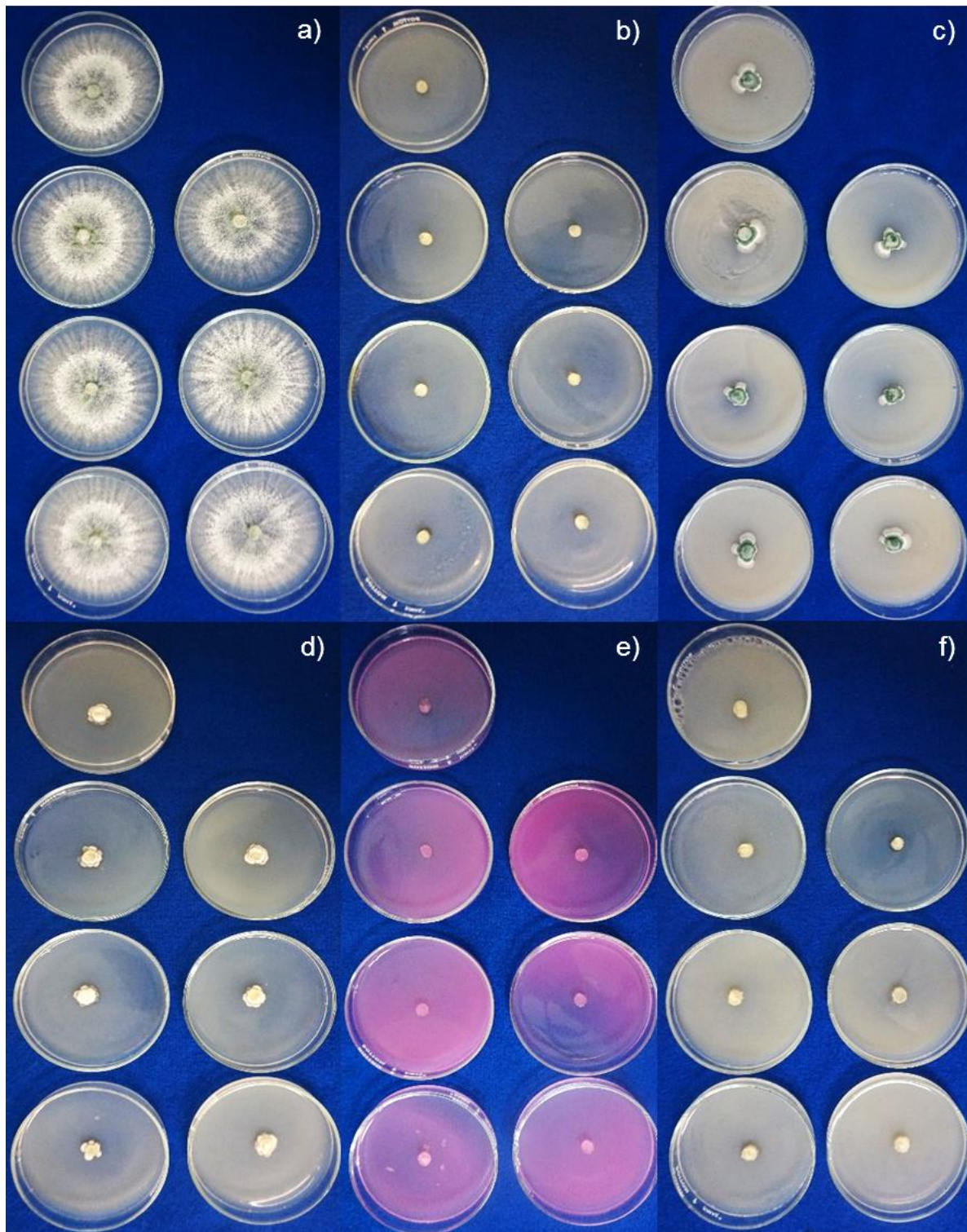


Figura 3. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (Cut-B) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.

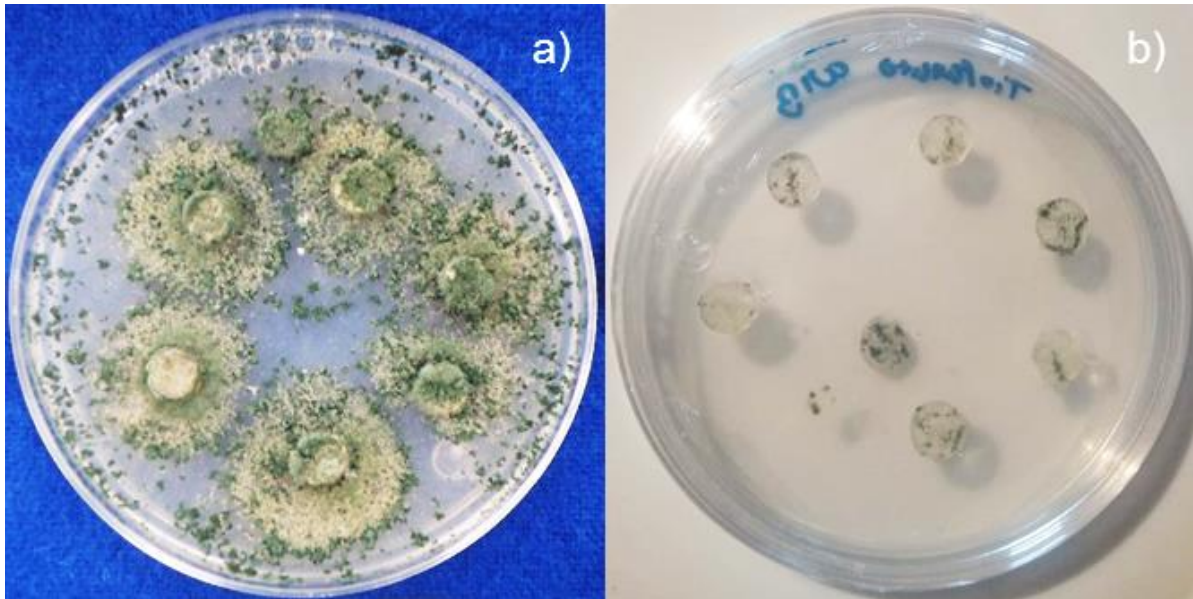


Figura 4. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (Cut-B) transferido a medio de cultivo PDA sin fungicidas, a partir de los tratamientos de: a) quintozeno + thiram, b) tiofanato metílico.

7.3 Sensibilidad *in vitro* de *T. tomentosum* (SS1) a fungicidas

El área de crecimiento micelial de *T. tomentosum* (SS1) con los fungicidas fue estadísticamente diferente ($P > 0.05$) al testigo. Por otro lado, no se presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos con quintozeno + thiram, benomilo y tiofanato metílico. Cuando *T. tomentosum* (SS1) se encontró expuesto al tratamiento con quintozeno + thiram y benomilo el crecimiento fue nulo, por lo que fue considerado sensible; mientras que con tiofanato metílico presentó un área de crecimiento de 0.21 cm^2 , lo que equivale a inhibición del 99.62 % (Cuadro 7).

Se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en el crecimiento con los tratamientos con captan y fluazinam; el hongo presentó mayor crecimiento con fluazinam y en menor

medida con captan, siendo este de 6.23 y 3.42 cm²; en este caso, los porcentajes de inhibición fueron de 93.91 y 88.92 %, respectivamente, lo que indica que a las dosis evaluadas *T. tomentosum* (SS1) tolera la presencia de estos fungicidas (Cuadro 7).

En el medio de cultivo del tratamiento con captan, *T. tomentosum* (SS1) presentó crecimiento irregular de coloración blanca en los extremos del crecimiento y amarillenta en el centro; con los tratamientos con fluazinam y tiofanto metílico presentó crecimiento micelial irregular y de consistencia compacta de color amarillo, sin evidencia de la formación de esporas (Figura 5).

Cuando se transfirió a *T. tomentosum* (SS1) del medio de cultivo con los tratamientos con quintozeno + thiram, tiofanato metílico y benomilo a PDA sin fungicida, retomó su crecimiento a los cuatro días en el caso de quintozeno + thiram, por lo cual se consideró que efecto fue fungistático. En el caso de la transferencia a partir de las cajas con benomilo, el efecto fue fungicida debido a que el hongo no se desarrolló en el medio PDA (Cuadro 7, Figura 6, Anexo 6).

Cuadro 7. Área de crecimiento micelial de *Trichoderma tomentosum* (SS1) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Efecto
Quintozeno + thiram	0 ^a	100	Fungistático
Benomilo	0 ^a	100	Fungicida
Tiofanato metílico	0.21 ^a	99.62	No aplica
Captan	3.42 ^b	93.91	No aplica
Fluazinam	6.23 ^c	88.92	No aplica
Testigo	56.24 ^d	---	No aplica

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

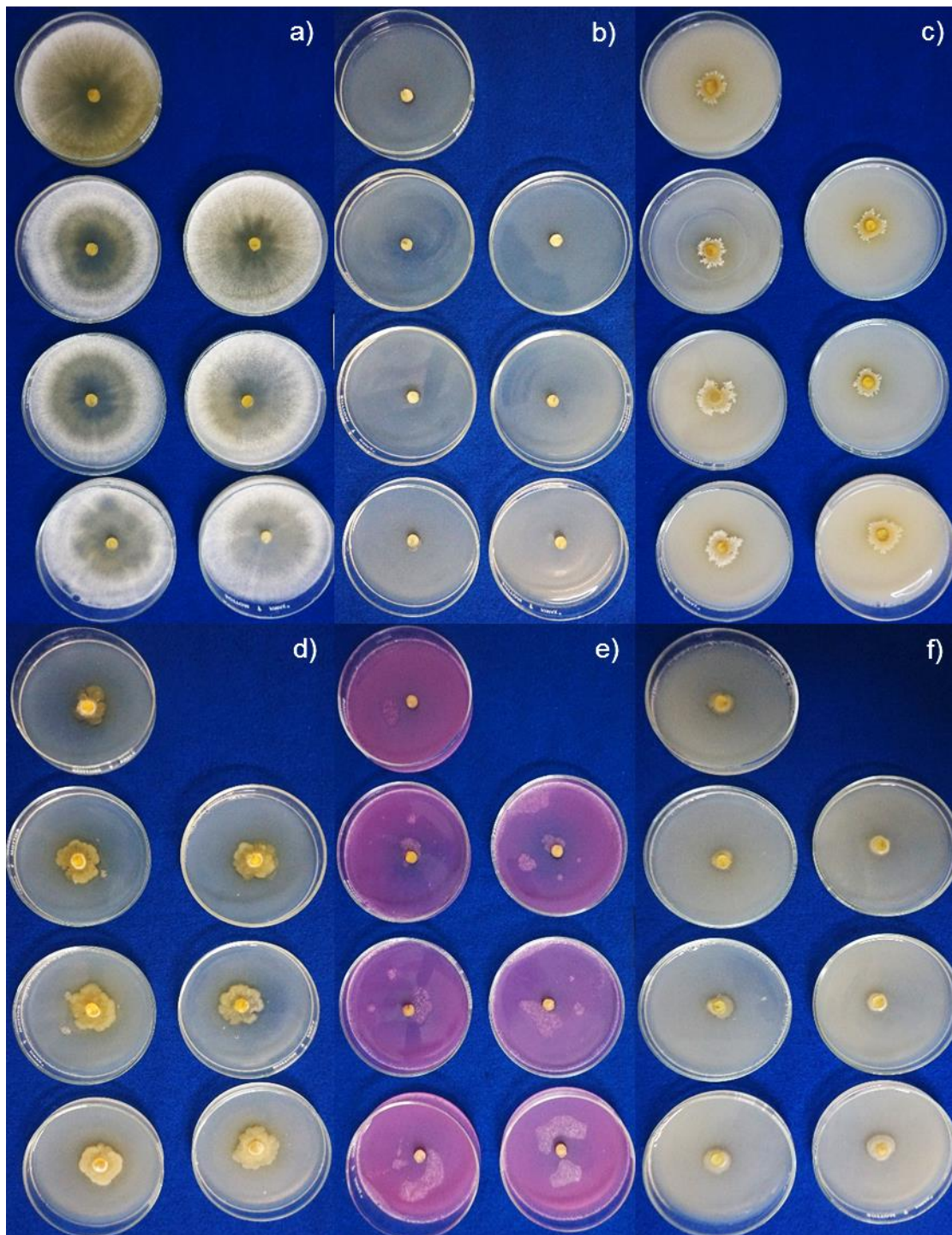


Figura 5. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma tomentosum* (SS1) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.

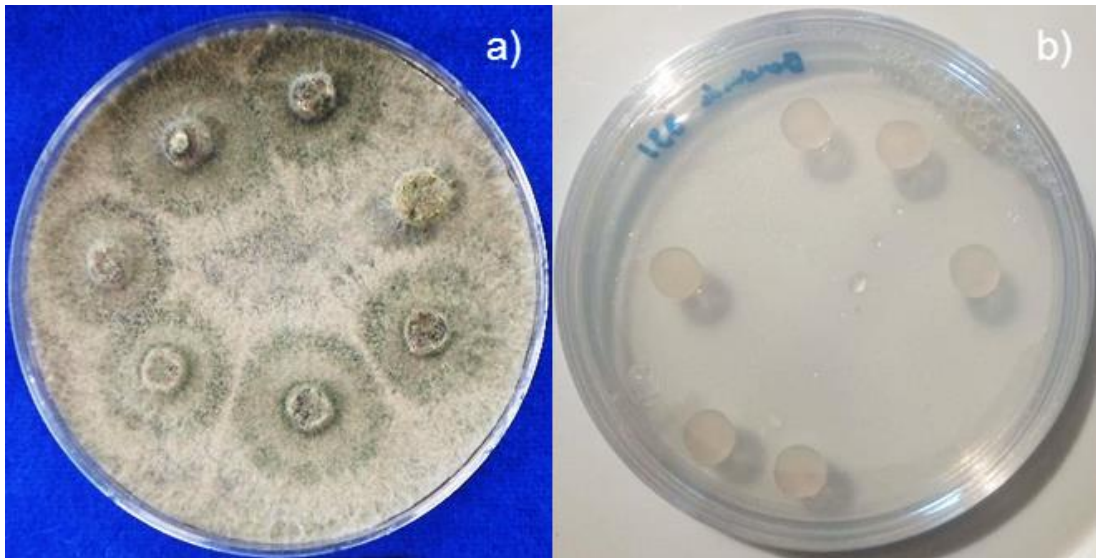


Figura 6. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma tomentosum* (SS1) transferido a medio de cultivo PDA sin fungicidas, a partir de los tratamientos de: a) quintozeno + thiram y b) benomilo.

7.4 Sensibilidad *in vitro* de *T. barbatum* (SS2) a fungicidas

El área de crecimiento micelial de *T. barbatum* (SS2) con los fungicidas fue estadísticamente diferente al testigo ($P > 0.05$). Por otro lado, no se presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos con benomilo, tiofanato metílico, quintozeno + thiram, captan y fluazinam, con los cuales al término del experimento el hongo desarrolló crecimiento de micelio en promedio 0.07, 0.13, 0.3, 0.53 y 0.59 cm², respectivamente. Como es evidente, *T. barbatum* (SS2) tolera en mayor medida la presencia de captan y fluazinam, con los cuales el porcentaje de inhibición fue de 99.05 y 98.95 %, respectivamente (Cuadro 8).

En el medio de cultivo del tratamiento con captan, se presentó crecimiento irregular de consistencia algodonosa; en contraste, los tratamientos con fluazinam y quintozeno + thiram se presentó crecimiento micelial irregular en el borde del disco, sin evidencia de la formación de esporas (Figura 7).

Cuadro 8. Área de crecimiento micelial de *Trichoderma barbatum* (SS2) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*
Benomilo	0.07 ^a	99.87
Tiofanato metílico	0.13 ^a	99.76
Quintozeno + Thiram	0.30 ^a	99.46
Captan	0.53 ^a	99.05
Fluazinam	0.59 ^a	98.95
Testigo	45.05 ^b	---

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

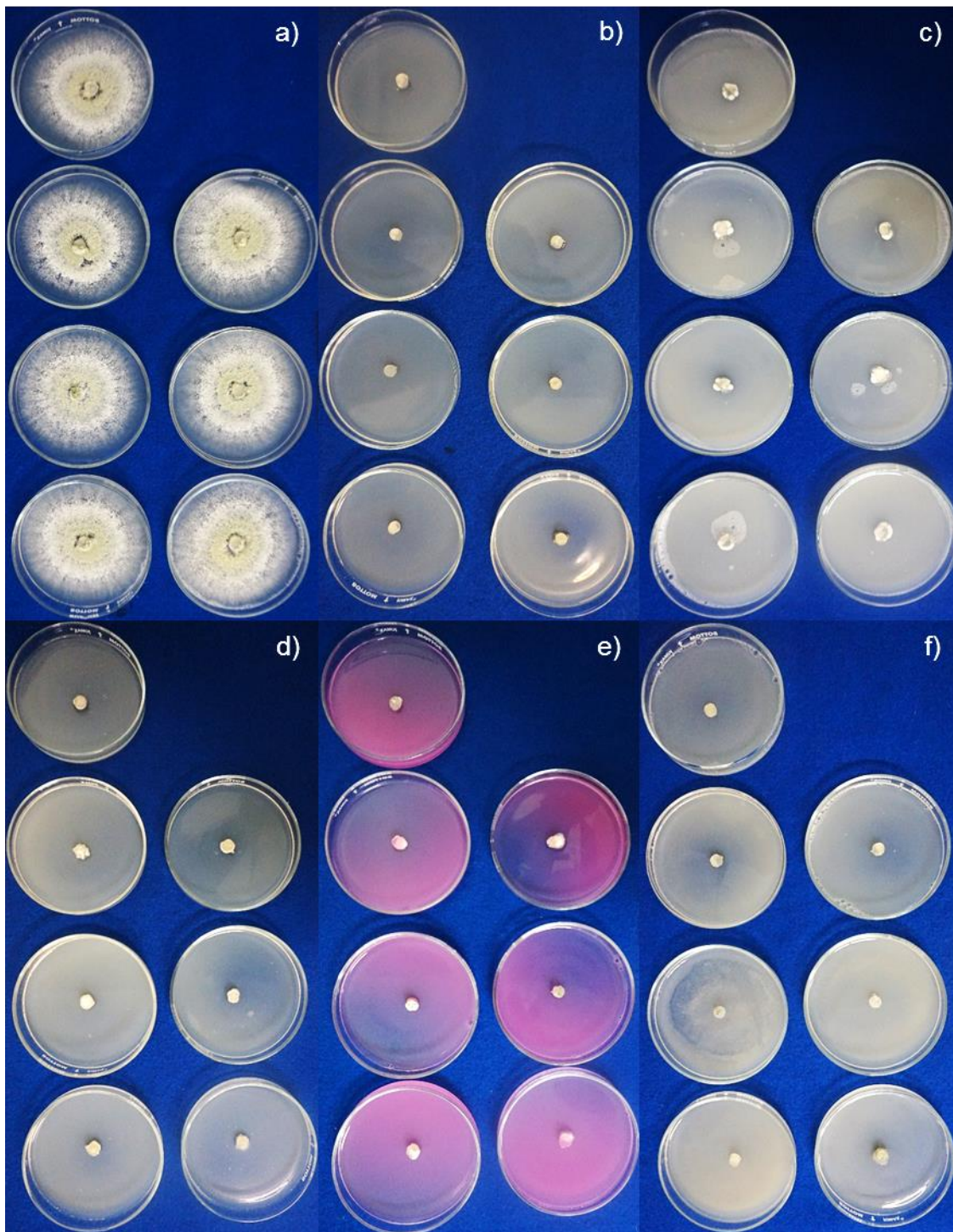


Figura 7. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma barbatum* (SS2) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.

7.5 Sensibilidad *in vitro* de *T. asperellum* (TFR3) a fungicidas

El área de crecimiento micelial de *T. asperellum* (TFR3) con fungicidas fue estadísticamente diferente al testigo ($P > 0.05$). En lo que respecta a tiofanato metílico, benomilo, quintozeno + thiram, captan y fluazinam no se presentaron diferencias entre ellos ($P > 0.05$), en los cuales al término del experimento el hongo presentó crecimiento de 0.04, 0.13, 0.32, 1.03 y 1.12 cm², respectivamente. Evidentemente *T. asperellum* (TFR3) presentó mayor tolerancia a captan y fluazinam, con los cuales el porcentaje de inhibición fue de 98.16 y 98 % (Cuadro 9).

En cuanto a las características culturales, en el medio de cultivo de los tratamientos con captan, el antagonista presentó crecimiento irregular y esporulación en el centro de la caja de Petri; con fluazinam el crecimiento micelial fue irregular de consistencia algodonosa, sin evidencia de la formación de esporas; con quintozeno + thiram, el crecimiento sobre el medio de cultivo fue blanco algodonoso con indicios de la formación de esporas (Figura 8).

Cuadro 9. Área de crecimiento micelial de *Trichoderma asperellum* (TFR3) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*
Tiofanato metílico	0.04 ^a	99.92
Benomilo	0.13 ^a	99.76
Quintozeno + Thiram	0.32 ^a	99.43
Captan	1.03 ^a	98.16
Fluazinam	1.12 ^a	98.00
Testigo	41.3 ^b	---

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

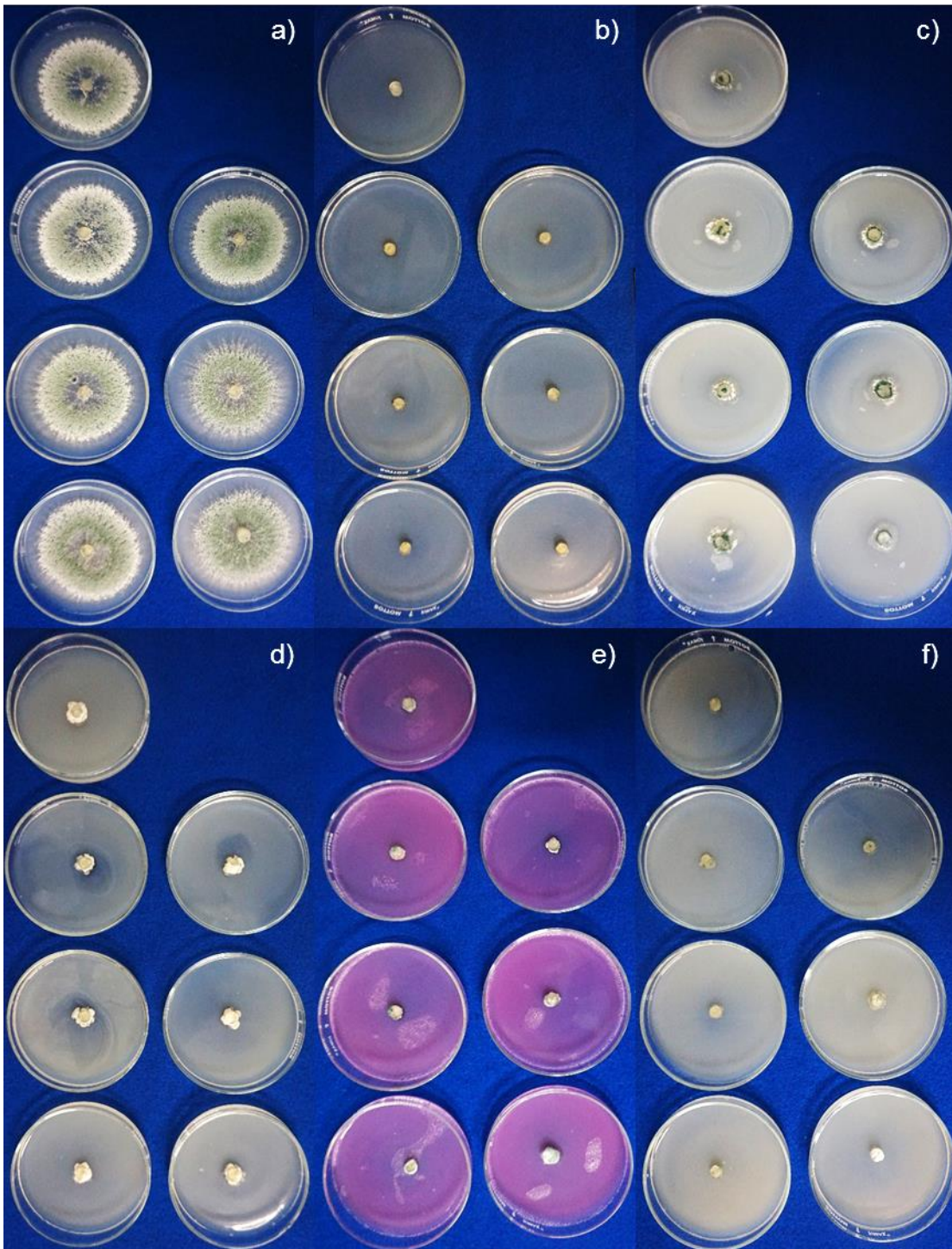


Figura 8. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (TFR3) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.

7.6 Sensibilidad *in vitro* de *T. harzianum* (TA4) a fungicidas

El área de crecimiento micelial de *T. harzianum* (TA4) **con** los fungicidas fue estadísticamente diferente ($P>0.05$) al testigo. En términos generales, de acuerdo con el análisis estadístico no se presentaron diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos de benomilo, tiofanato metílico, quintozeno + thiram y captan, con los cuales al término del experimento el área de crecimiento micelial de *T. harzianum* (TA4) fue de 0.09, 0.10, 0.38 y 1.23 cm². Cabe señalar que la mayor área de crecimiento se presentó con fluazinam, en el que el área de crecimiento del hongo antagonista fue de 1.68 cm². Tales resultados demuestran que *T. harzianum* (TA4) toleró la presencia de estos fungicidas (Cuadro 10).

En el medio de cultivo de *T. harzianum* (TA4) los tratamientos con captan el aislado presentó crecimiento irregular con apariencia algodonosa de color verde en el centro de la colonia, lo que indica que el hongo ha producido esporas y con fluazinam se presentó crecimiento micelial irregular y de apariencia algodonosa de color blanco, sin evidencia de la formación de esporas (Figura 9).

Cuadro 10. Área de crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* (TA4) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*
Benomilo	0.09 ^a	99.83
Tiofanato metílico	0.10 ^a	99.82
Quintozeno + Thiram	0.38 ^{ab}	99.32
Captan	1.23 ^{ab}	98.95
Fluazinam	1.68 ^b	97.81
Testigo	29.53 ^c	---

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

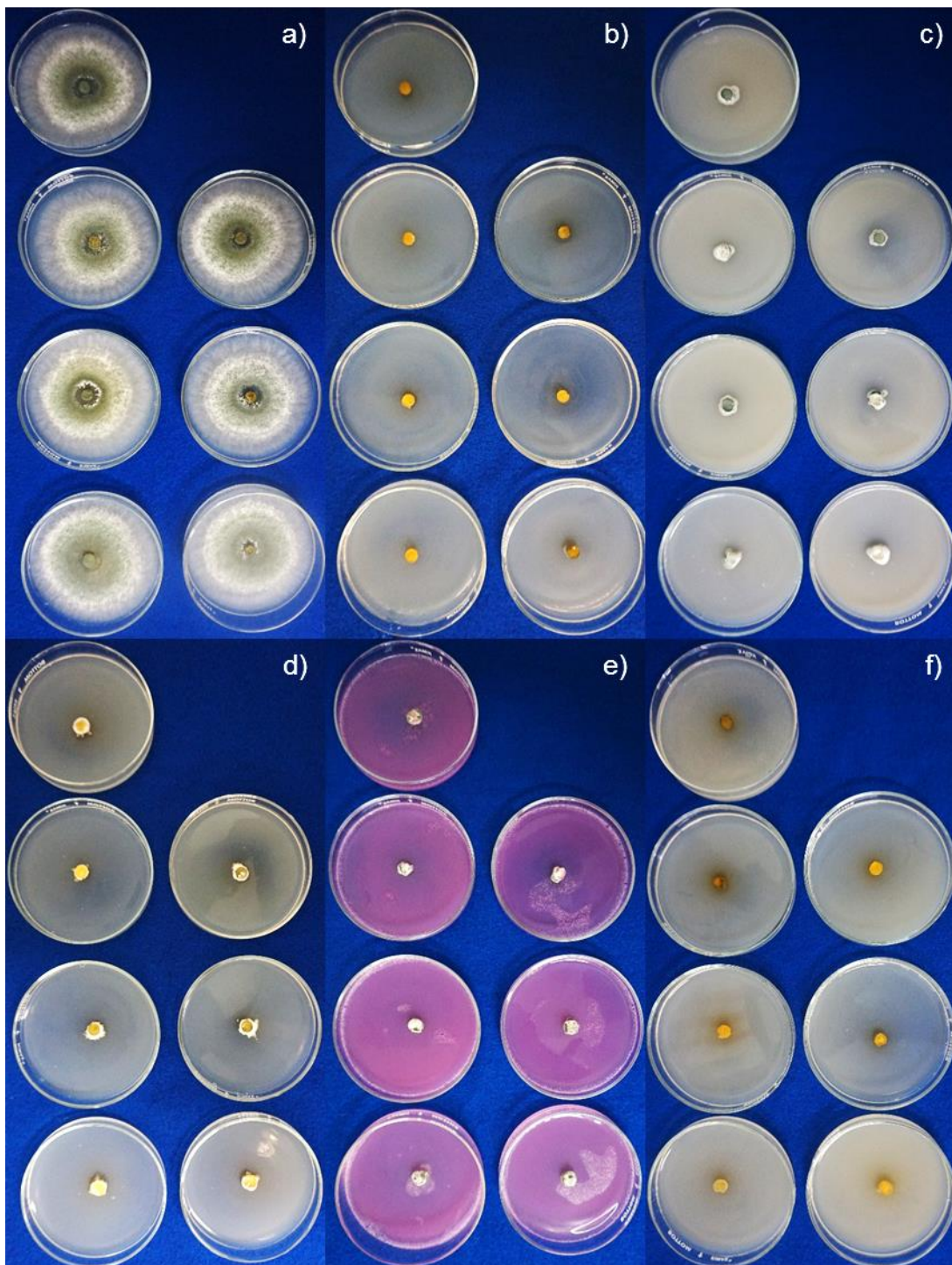


Figura 9. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (TA4) en medio de cultivo PDA con fungicidas. a) Testigo, b) benomilo, c) captan, d) fluazinam, e) quintozeno + thiram y f) tiofanato metílico.

7.7 Comparación de la respuesta de sensibilidad a fungicidas entre los cinco aislados de *Trichoderma* spp.

Al comparar la respuesta de los cinco aislados de *Trichoderma* spp. frente a los fungicidas benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico, se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en el área de crecimiento micelial dependiendo del fungicida con el que se encontraron expuesto.

7.8 Comparación de la respuesta de sensibilidad a benomilo

El área de crecimiento micelial *in vitro* de *T. tomentosum* (SS1) con benomilo fue estadísticamente diferente ($P > 0.05$) a *T. asperellum* (TFR3) siendo esta de 0.0 y 0.13 cm², respectivamente. Por otro lado, no se presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre los aislados de *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (Cut-B), *T. harzianum* (TA4) y *T. asperellum* (TFR3). De acuerdo con lo anterior, *T. tomentosum* (SS1) es el único aislado que presenta sensibilidad a dicho fungicida (Figura 10).

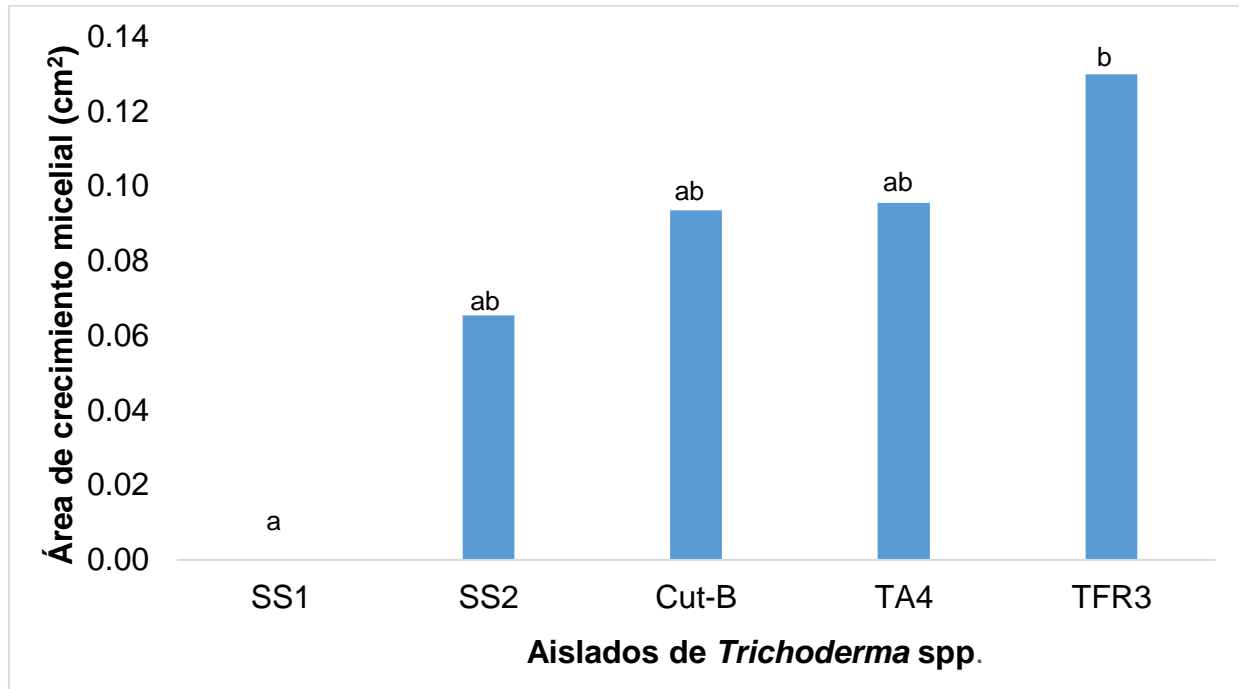


Figura 10. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (CUT-B), *T. harzianum* (TA4) y *T. asperellum* (TFR3), en medio de cultivo PDA adicionado con benomilo. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P>0.05$).

7.9 Comparación de la respuesta de sensibilidad a captan

En el tratamiento con captan el área de crecimiento micelial *in vitro* de *T. barbatum* (SS2) fue estadísticamente diferente ($P>0.05$) a los otros aislados, siendo este el que presentó la menor área de crecimiento micelial con 0.53 cm². Por otro lado, no se presentaron diferencias ($P>0.05$) entre los aislados de *T. asperellum* (TFR3), *T. asperellum* (Cut-B) y *T. harzianum* (TA4), en los cuales el crecimiento fue de 1.03, 1.19 y 1.23 cm²,

respectivamente. *T. tomentosum* (SS1) puede ser catalogado como el aislado de menor sensibilidad, ya que estadísticamente fue diferente a los demás y presentó un área de crecimiento de 1.906 cm². De acuerdo con lo anterior, es evidente que ninguno de los cinco aislados es sensible a captan (Figura 11).

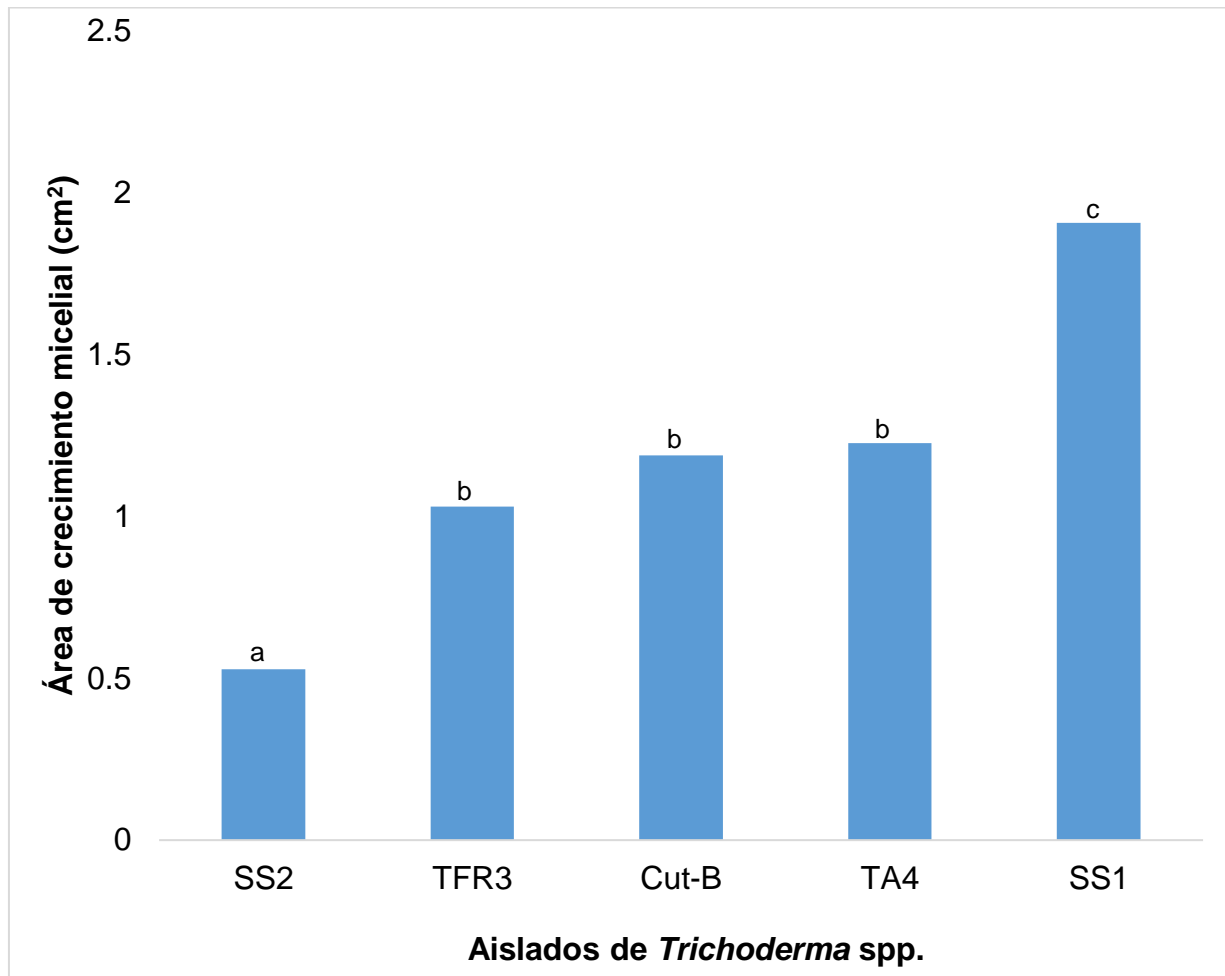


Figura 11. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3), *T. asperellum* (CUT-B), *T. harzianum* (TA4) y *T. tomentosum* (SS1), en medio de cultivo PDA adicionado con captan. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

7.10 Comparación de la respuesta de sensibilidad a fluazinam

Ninguno de los aislados presentó sensibilidad al fungicida fluazinam; no obstante, la tolerancia se presentó en diferentes grados. El aislado más tolerante fue *T. tomentosum* (SS1), en el cual el área de crecimiento micelial *in vitro* fue estadísticamente diferente a los demás ($P>0.05$) con un área de 6.23 cm²; le siguió *T. harzianum* (TA4), *T. asperellum* (TFR3), *T. asperellum* (Cut-B) y *T. barbatum* (SS2), en los cuales se registró un área de crecimiento micelial de 1.68, 1.12 0.59, 0.59 y cm², respectivamente (Figura 12).

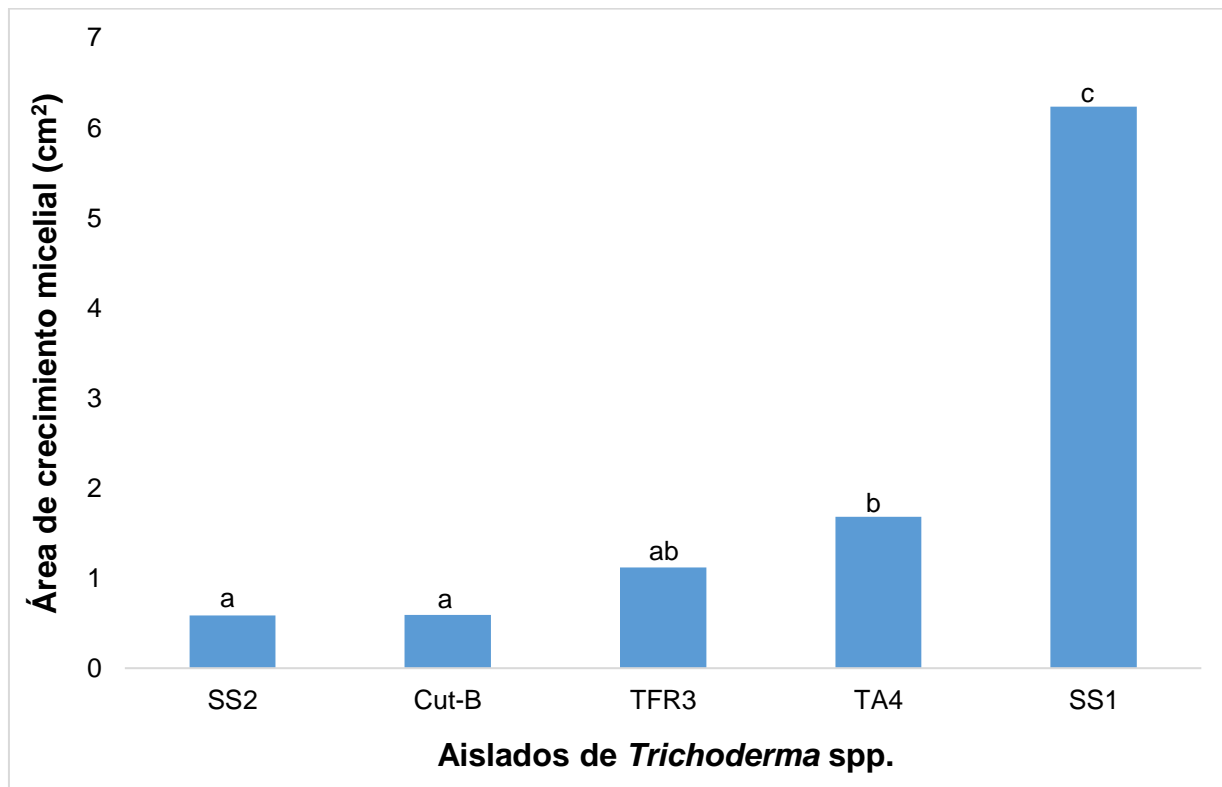


Figura 12. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (CUT-B), *T. asperellum* (TFR3), *T. harzianum* (TA4) y *T. tomentosum* (SS1), en medio de cultivo PDA adicionado con fluazinam. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P>0.05$).

7.11 Comparación de la respuesta de sensibilidad a quintozeno + thiram

Con los fungicidas quintozeno + thiram los aislados *T. asperellum* (Cut-B) y *T. tomentosum* (SS1) no presentaron crecimiento micelial en el medio de cultivo, lo que indica que son sensibles; la respuesta de tales aislados fue estadísticamente diferente ($P>0.05$) a *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4), los cuales crecieron 0.30, 0.32 y 0.38 cm², respectivamente. En este sentido, estos tres últimos aislados se consideran tolerantes a los fungicidas (Figura 13).

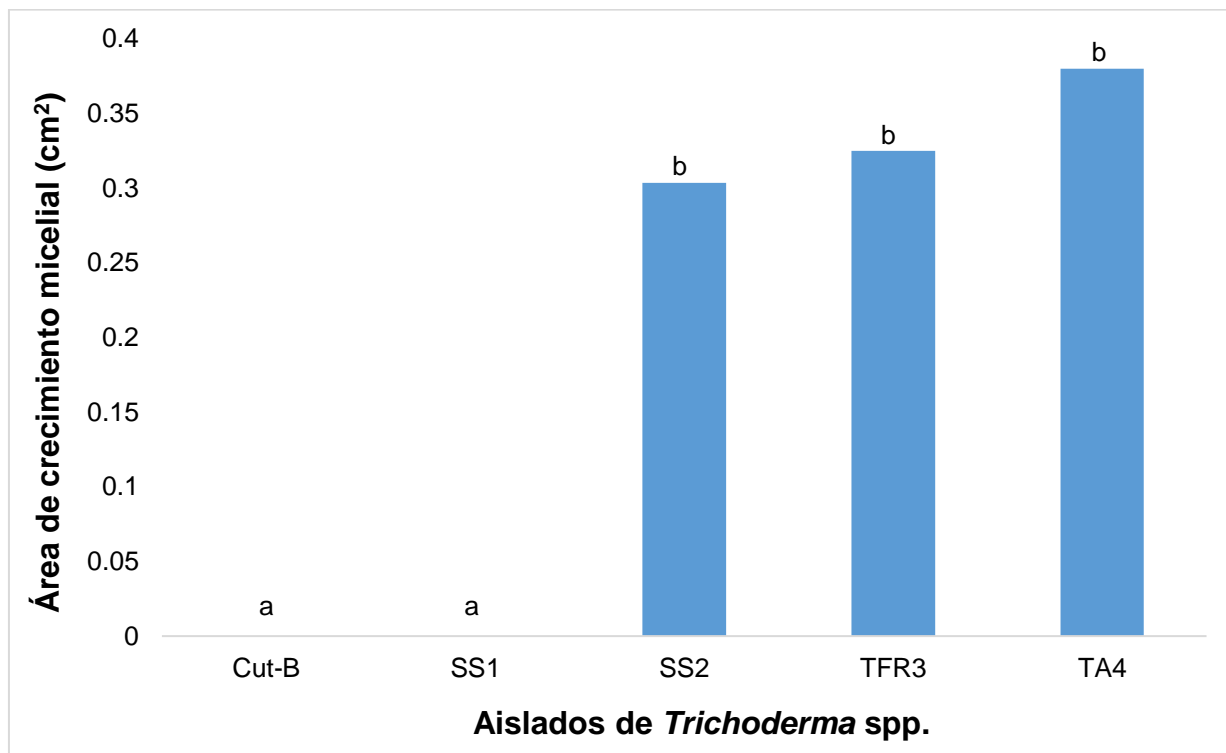


Figura 13. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. asperellum* (CUT-B), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4), en medio de cultivo PDA adicionado con quintozeno + thiram. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P>0.05$).

7.12 Comparación de la respuesta de sensibilidad a tiofanato metílico

Con el fungicida tiofanato metílico no se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en el área de crecimiento micelial de los cinco aislados; no obstante, se considera como sensible a *T. asperellum* (CUT-B), ya que no presentó crecimiento. En términos generales el crecimiento fue bajo en todos los aislados; el de mayor área fue *T. tomentosum* (SS1) con 0.206 cm^2 , seguido de *T. barbatum* (SS2), *T. harzianum* (TA4) y *T. asperellum* (TFR3), con 0.14 , 0.1 y 0.039 cm^2 , respectivamente (Figura 14).

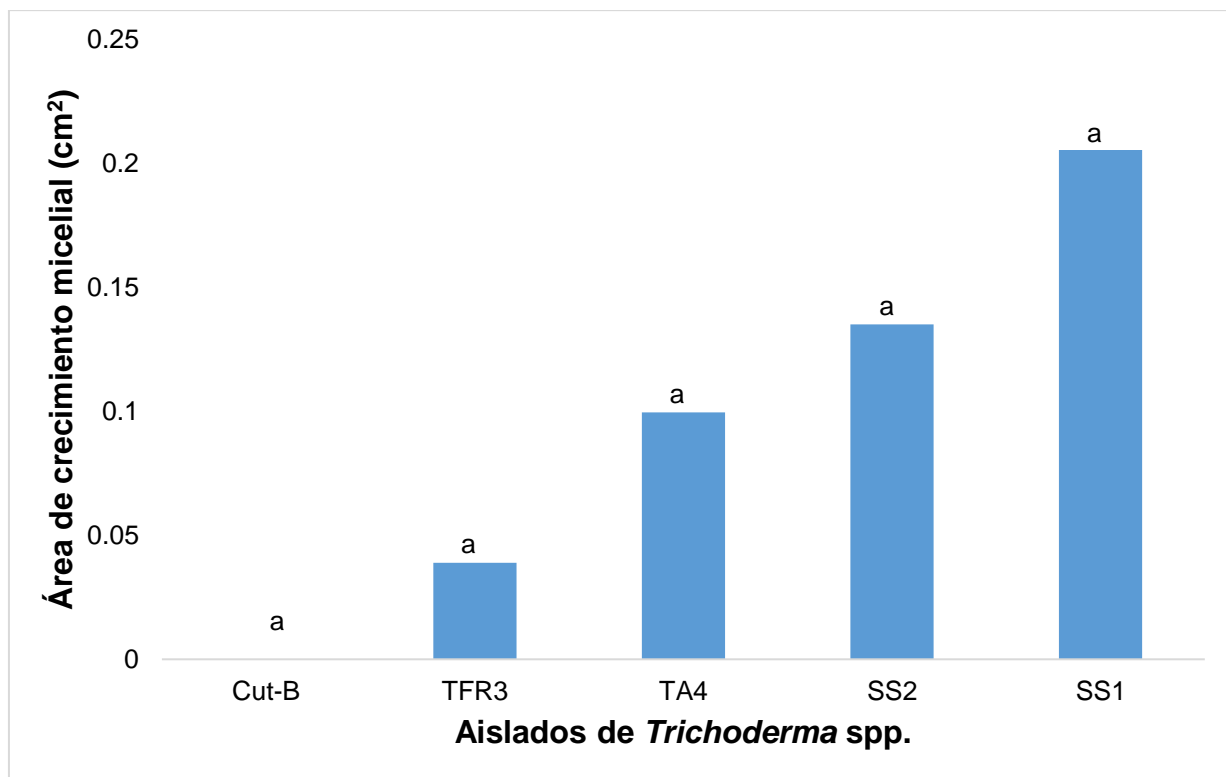


Figura 14. Área de crecimiento micelial (cm^2) de *T. asperellum* (CUT-B), *T. asperellum* (TFR3), *T. harzianum* (TA4), *T. barbatum* (SS2) y *T. tomentosum* (SS1), en medio de cultivo PDA adicionado con tiofanato metílico. Barras con letra en común indican que no existen diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P > 0.05$).

8 DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la sensibilidad *in vitro* de los aislados *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4) a los fungicidas: tiofanato metílico, benomilo, captan, fluazinam y quintozeno + thiram, los cuales se encuentran entre los ingredientes activos más utilizados para el manejo de fitopatógenos del suelo (Domínguez, 2008). El interés de llevar esta investigación se fundamenta en los estudios de Martínez-Tapia *et al.* (2019) y Alonso (2020); el primer autor demostró que los aislados *T. barbatum* (SS2) y *T. asperellum* (Cut-B) tienen potencial como agentes de control biológico de *P. horiana* en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Delano); por su parte, Alonso (2020) reporta que los aislados *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4), presentan la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de *Rosa* spp.

En la literatura se reportan alrededor de 355 especies del género *Trichoderma* (Kirk *et al.*, 2019); sin embargo, las más utilizadas como agentes de control biológico se limitan a unas cuantas especies, entre las cuales se encuentran: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. viridae*, *T. reesei* y *T. koningii* (Pineda *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2013). Como puede notarse, *T. tomentosum* y *T. barbatum*, no se encuentran dentro del grupo de las más estudiadas; por lo que la presente investigación, aunada a los de los

trabajos de Martínez-Tapia *et al.* (2019) y Alonso (2020), contribuyen al conocimiento de dichas especies.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los aislamientos de *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4) presentan tolerancia a captan y fluazinam, a las dosis 1 g y 0.25 mL de i. a., respectivamente. De acuerdo con el mecanismo de acción, captan reacciona con las enzimas sulfhídricas con producción de tiofosgeno, sustancia tóxica para las células del hongo, e interfiere en el proceso de respiración celular, por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelial. Por su parte, fluazinam actúa como desacoplador de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, inhibiendo la producción de ATP al no generarse el gradiente de pH, afectando la respiración de las células del hongo (De Liñán, 2012).

Entre los estudios dirigidos a determinar la compatibilidad de *Trichoderma* spp. a fluazinam, se encuentran los resultados desarrollados por Ruano-Rosa y López-Herrera (2015), quienes reportan que *T. atroviride* tolera a nivel *in vitro* la dosis de 0.001 %. Tales resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que con este fungicida a la dosis de 0.25 mL de i. a, los aislados de *Trichoderma* spp. presentaron tolerancia, registrándose los siguientes porcentajes de inhibición: para el *T. tomentosum* (SS1) 88.92 %, con *T. harzianum* (TA4) 97.81 %, para *T. asperellum* (TFR3) 98.00 % y en el caso de *T. asperellum* (Cut-B) y *T. barbatum* (SS2) 98.95 %. Cabe señalar que estos mismos autores enfatizan que con la adición conjunta del fungicida y el agente de

control biológico se presenta un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *R. necatrix*, agente causal de la pudrición blanca del aguacate (*Persea americana* Prill).

En lo que respecta a la compatibilidad *in vitro* de las cinco especies evaluadas con el fungicida captan, los resultados obtenidos presentan relación con lo reportado por Peláez *et al.* (2016), quienes señalan que para *T. asperellum*, a concentraciones iguales o menores a 0.5 g i. a. L⁻¹ se presenta 6 % de inhibición en el crecimiento micelial, por lo que el fungicida se considera amigable con el biocontrolador. En contraste, en el presente estudio la dosis evaluada fue de 1 g de i. a. L⁻¹, es decir 50 % más; de ahí, que el crecimiento micelial fue menor, registrándose los siguientes porcentajes de inhibición: para el aislado *T. tomentosum* (SS1) 93.91 %, para *T. asperellum* (Cut-B) 97.88 %, con *T. asperellum* (TFR3) 98.16 %, *T. harzianum* (TA4) 98.95 % y en el caso de *barbatum* (SS2) 99.05 %. Cabe señalar que para la obtención de colonias puras de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo, los autores Askew y Lang (1993) recomiendan un medio de cultivo selectivo que contiene fungicidas (entre otros nutrientes y antibióticos), entre estos captan a la dosis de 0.04 g i. a. L⁻¹, la cual es menor en 96 % a la evaluada; además, sugieren la adición de 0.2 g i. a. L⁻¹ de quitozeno, que equivale al 26.7 % de la dosis la evaluada. Quitozeno actúa negativamente en la célula del hongo, de tal modo que Interfiere con la división mitótica y también causa lisis de la membrana mitocondrial causando daño en general al hongo (De Liñán, 2012).

Por otro lado, los aislados *T. asperellum* (Cut-B) y *T. tomentosum* (SS1) 1 fueron sensibles a quitozeno + thiram, benomilo y tiofanato metílico, siendo thiram un inhibidor de las enzimas de radical metálico y las sulfhídricas e infiere en la respiración celular del

hongo y en la transducción de señales osmóticas e impide la germinación de las esporas; en el caso de benomilo actúa dentro de la célula interfiriendo en la síntesis del DNA, inhibe la formación de β -tubulina en la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del DNA al RNA y tiofanato metílico actúa impidiendo el crecimiento micelial y la germinación de conidios, siendo altamente tóxico para el hongo e inhibe la formación de tubulina en la mitosis (De Liñán, 2012; FRAC, 2019).

Muiño *et al.* (2001) estudiaron el efecto de thiram frente a *Trichoderma* spp. a las dosis de 50 y 10 mg i. a. L⁻¹, registrando mortalidad de poco menos del 100 % a las 48 horas, pero retomó su crecimiento a los cinco días, por lo que se consideró moderadamente tóxico y compatible. Esto coincide con los resultados correspondientes a los aislados *T. asperellum* (Cut-B) y *T. tomentosum* (SS1), debido a que en el medio de cultivo de cultivo con quintozeno + thiram no presentaron crecimiento, pero al transferirlos a medio PDA, retomaron su crecimiento a los cuatro días, teniendo efecto fungistático; en el caso de los aislados *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4) presentaron cierta tolerancia al tener un área de crecimiento micelial de 0.30, 0.32, 0.38 cm², respectivamente.

Muiño *et al.* (2001) sostienen que con benomilo a las dosis de 50 y 10 mg i. a. L⁻¹ *Trichoderma* spp. presenta mortalidad del 100 %, por lo que lo consideran tóxico; lo mencionado por los referidos autores concuerda con el presente estudio, debido a que en el aislado *T. tomentosum* (SS1) su crecimiento fue de nulo. No obstante, los aislados *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4) presentaron cierta

tolerancia frente a tal fungicida, al registrarse un área de crecimiento micelial de 0.07, 0.13, 0.09 cm², respectivamente.

Con tiofanato metílico el área de crecimiento fue de los aislados *T. barbatum* (SS2), *T. asperellum* (TFR3) y *T. harzianum* (TA4) fue de: 0.13, 0.04, 0.10 cm², respectivamente; esto concuerda con Franco y Orrego (2013), quienes señalan que los aislados de *Trichoderma* spp. A-76 y A-106, provenientes de un suelo de Paraguay, son compatibles a tiofanato metílico + thiram a la dosis de 0.85 g i. a. debido a que la inhibición del crecimiento micelial del hongo fue de 4 %.

9 CONCLUSIONES

Los aislados *T. tomentosum* (SS1), *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. harzianum* (TA4) y *T. barbatum* (SS2) presentan tolerancia a captan, los cuales presentaron crecimiento micelial de 6.09, 2.12, 1.84, 1.05 y 0.95 %, respectivamente, en comparación con el testigo sin fungicida.

En cuanto a fluazinam ningún aislado fue sensible; la mayor tolerancia, respecto al testigo sin fungicida, se presentó en el aislado *T. tomentosum* (SS1) con 11.08 % de crecimiento, seguido de *T. harzianum* (TA4) con 2.19 %, *T. asperellum* (TFR3) con 2 % y, *T. asperellum* (Cut-B) y *T. barbatum* (SS2) con 1.05 %.

Con el fungicida benomilo *T. tomentosum* (SS1) fue sensible; no obstante, los otros cuatro aislados presentaron baja tolerancia la cual fue evidente debido al porcentaje de crecimiento micelial que se encontró entre 0.24 y 0.13 % respecto al testigo sin fungicida.

Con tiofanato metílico el aislado *T. asperellum* (Cut-B) presentó sensibilidad; en contraste con el testigo, *T. tomentosum* (SS1) creció 0.38 %, *T. barbatum* (SS2) 0.24 %, *T. harzianum* (TA4) 0.18 % y *T. asperellum* (TFR3) 0.08 %.

Por otro lado, con el fungicida quintozeno + thiram, *T. asperellum* (Cut-B) y *T. tomentosum* (SS1) fueron sensibles, sin embargo el efecto fue fungistático. Por su parte los aislados *T. harzianum* (TA4), *T. asperellum* (TFR3) y *T. barbatum* (SS2) presentaron crecimiento micelial de 0.68, 0.57 y 0.54 %, respectivamente, en comparación con el testigo.

De acuerdo con lo anterior, los aislados de *Trichoderma* spp. presentan potencial para ser incluidos en el diseño de un manejo integral y sustentable de cultivos, en el que tanto el antagonista como el fungicida tendrán efecto sobre los fitopatógenos.

10 RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, no se recomienda el uso de benomilo en combinación con el aislado SS1 y tiofanato metílico con el aislados Cut-B en para el manejo de fitopatógenos del suelo, debido a la sensibilidad que mostraron a estos ingredientes activos.

Se recomienda determinar la DL_{50} y DL_{95} de los fungicidas captan y fluazinam, debido a que fueron los fungicidas en los que se presentó la mayor tolerancia.

Realizar estudios de compatibilidad en campo de los aislados *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4) con fungicidas, con la finalidad de generar información que permita proponer estrategias de manejo integrado de enfermedades y con ello minimizar los impactos ambientales negativos.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acurio, V. R. y España, I. C. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). Revista de Ciencias de la Vida, 25(1), 53-61.
- Agamez, R. E. Y., Barrera, V. J. y Oviedo, Z. L. (2009). Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* spp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. Acta Biológica Colombiana, 14(3), 61-70.
- Agamez, R. E. Y., Zapata, N. R. I., Oviedo, Z. L. E. y Barrera, V. J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista Colombiana de Biotecnología, 10(2), 23-34.
- Ahmad, J. S. and Baker R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 77(2), 182-189.
- Alonso, B. A. (2020). Actividad antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa: Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Tenancingo.

- Alonso-Bahena, A., López, F. H., Domínguez, A. G. y García, V. R. (2018). Actividad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Rosellinia necatrix* y *Verticillium dahliae*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36, 27-28.
- Askew, D. J. y Lang, M. D. (1993). An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, 42, 686-690.
- Barakat, M. R. and Almasri, I. M. (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* in combination with fungicides in controlling gray mould disease (*Botrytis cinerea*) of strawberry. *American Journal of Plant Sciences*, 8(4), 651-665.
- Blaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J. y Jędryczka, M. (2014). *Trichoderma* spp. application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 310-317.
- Castillo, G. C., Pérez, A. y Lovato, E. A. (2017). Compatibilidad “*in vitro*” de aislados de *Trichoderma* spp. con fungicidas usados normalmente en el control de patógenos de suelo. *Agrotecnia*, 25, 0328-4077.
- Carballo, M., Hidalgo, E. y Rodríguez, A. (2004). Control biológico de insectos mediante hongos entomopatógenos. En M. Carballo y F. Guaharay (Eds.), *Control biológico de plagas agrícolas*. (pp. 33-58). Recuperado de https://www.ciaorganico.net/documypublic/525_CONTROL_BIOLOGICO_DE_PLAGAS_AGRICOLAS.pdf.07/03/2019.

Chet, I. and Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48(1), 37-43.

Chiriboga, P. H., Gómez, B. G. y Garcés, E. K. (2015). Protocolos para la formulación y aplicación del bio-insumos: *Trichoderma* spp. para el control biológico de enfermedades. IICA Paraguay, 16 pp.

De Liñán, C. (2012). Vademécum de agroquímicos de México. Tecnoagrícola de México 4, 766 p.

Domínguez, G. A. (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, L. Y., Pozo, M. L. y Martínez, C. 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.

Franco, O. B. M. y Orrego, F. A. L. (2013). Compatibilidad *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas. *Investigación Agraria*, 15(1), 15-22.

FRAC Code List. (2019). Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC code numbering). Recuperado de

<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf?sfvrsn=98ff4b9a2.30/08/2019>.

Guazzone, C. N., Jones, E. E., Condrón, L. M., McLean, K. L., Stewart, A. and Ridgway, H. J. (2016). Rhizosphere and endophytic colonisation of ryegrass and sweet corn roots by the isolate *Trichoderma atroviride* LU132 at different soil pH. *Microbial control*, 69(1), 78-85.

Howell, R. C. (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., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.

Kirk, P. M., Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Bourgoin, T. and De Wever, A. (2019). Catalogue of life, 2019 Annual Checklist. Obtenido de Catalogue of life, 2019 Annual Checklist: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/search/all.15/05/2019>.

Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.

- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. y Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Protección Vegetal*, 23(2), 118-125.
- Martínez-Tapia, V., Domínguez, A. G., Bravo, L. L. y García, V. R., (2019). Efectividad de *Trichoderma* spp. contra *Puccinia horiana* y estimulación de crecimiento en crisantemo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37, 29.
- Michel, A. A. C., Otero, S. M. A., Ariza, F. R., Barrios, A. A. y Alarcón, C. N. (2013). Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfii* Sacc., en cacahuate. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(3), 89-107.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, (4), 1-4.
- 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.
- Muiño, L. B., Sáenz, M., Stefanova, M., Porras, Á. y Díaz, I. (2001). Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco. *Fitosanidad*, 5(2), 3-9.

National Center for Biotechnology Information (2019). Taxonomy Browser. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HW816241.1.18-06-2019>.

Papavizas, G. C., Lewis, A. J. and Abd-elmoity, T. H. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, 72(1), 126-132.

Peláez, A. A., Villalobos, S. S., Yépez, A. E., Cota, P. F. I. y Reyes, R. R. T. (2016). Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(6), 1401-1412.

Peres, N. A., Souza, N. L., Peever, T. L. and Timmer, L. W. (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 88(2), 125-130.

Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte-Trujillo, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A. y Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(1), 47-52. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223153894008>. 25-07-2019.

Rajesh, R. W., Shelake, M. R. and Sabalpara, A. N. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural*, 11(22), 1952-1965.

- Rodríguez, J. E., Velandia, J. y Viteri, S. E. (2010). Evaluación de microorganismos aislados de gallinaza por su potencial para el biocontrol de fusarium (*F. oxysporum*) en plántulas de uchuva (*Physalis peruviana*). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 63(2), 5499-5509.
- Ruano-Rosa, D. y López-Herrera, C. J. (2015). Adecuación de la dosis mínima efectiva del fungicida fluazinam para su uso combinado con *Trichoderma atroviride* en el control de la podredumbre blanca del aguacate. VIII congreso mundial de la planta, 165-169.
- Salazar, A. L., Aponte, Y. G., Alcano, J. 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 Aragua, Venezuela. Agronomía Tropical, 62(1), 1-4.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology, 96(2), 195-206.
- Sivila, N. y Jujuy, S. A. (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. Argentina. Recuperado de https://www.academia.edu/11343364/Producci%C3%B3n_Artesanal_y_Control_de_Calidad_del_hongo_antagonista_Trichoderma.14/10/2019.
- Stefanova, N. M. (2007). Introducción y eficacia del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Fitosanidad, 11(3), 75-79.

- Vera, D. F., Pérez, H. y Vallencia, H. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfato de la rizosfera Arazá (*Eugenia stipitata* Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 7(1), 33-40.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, L., Lorito, M. and Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopatogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143-148.
- Wu, C. H., Bernard, S. M., Andersen, G. L. y Chen, W. (2009). Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology*, 2(4), 428-440.
- Yépez, T. P. I., Peñaherrera, V. S. L., Solís, H. Z. K., Vera C. D. I., Navarrete, C. J. B. y Herrera, D. M. A. (2018). Compatibilidad *in vitro* de *Trichoderma* spp. con fungicidas de uso común en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Investigación Agraria*, 20(2), 146-151.

12 ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. asperellum* (Cut-B) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.

Repetición	Testigo		Benomilo		Captan		Fluazinam		Quintozeno + thiram		Tiofanato metílico	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
1	56.243	56.243	0.157	0	0.95	1.23	0.681	0.609	0	0	0	0
2	56.243	56.243	0	0	1.307	1.104	0.357	0.547	0	0	0	0
3	56.243	56.243	0	0	1.115	1.028	0.622	0.318	0	0	0	0
4	56.243	56.243	0.219	0	1.291	1.29	0.794	0.632	0	0	0	0
5	56.243	56.243	0.332	0.301	1.143	1.194	0.676	0.61	0	0	0	0
6	56.243	56.243	0	0.219	0.988	0.995	0.748	0.517	0	0	0	0
7	56.243	56.243	0	0.082	1.582	1.425	0.664	0.475	0	0	0	0
Promedio*	56.243	56.243	0.101	0.086	1.197	1.181	0.649	0.530	0	0	0	0

*No existen diferencias estadísticas (P>0.05) entre las réplicas de cada tratamiento.

Anexo 2. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. tomentosum* (SS1) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.

Repetición	Testigo		Benomilo		Captan		Fluazinam		Quintozeno + thiram		Tiofanato metílico	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 1
1	56.243	56.243	0	0	3.711	3.329	5.688	3.655	0	0	0.363	0
2	56.243	56.243	0	0	3.762	2.941	6.803	6.716	0	0	0.258	0
3	56.243	56.243	0	0	2.478	3.909	5.458	7.593	0	0	0	0
4	56.243	56.243	0	0	2.316	3.399	3.638	7.316	0	0	0	0
5	56.243	56.243	0	0	3.38	3.343	5.693	7.292	0	0	0	0
6	56.243	56.243	0	0	1.866	4.267	5.574	8.006	0	0	0	0
7	56.243	56.243	0	0	2.069	7.171	5.931	7.911	0	0	2.253	0
Promedio*	56.243	56.243	0	0	2.797	1.015	5.541	6.927	0	0	0.411	0

*No existen diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre las réplicas de cada tratamiento.

Anexo 3. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. barbatum* (SS2) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.

Repetición	Testigo		Benomilo		Captan		Fluazinam		Quintozeno + thiram		Tiofanato metílico	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 1
1	42.099	46.38	0.236	0.153	1.219	0.364	0.737	0.092	0.452	0.34	0	0
2	52.158	49.29	0	0	0.412	0.354	0.797	0.32	0.504	0.188	0	0.083
3	45.156	37.792	0	0.097	0.457	0.337	0.81	0.139	0.232	0.157	0	0.111
4	45.608	43.01	0	0.085	0.241	0.492	0.669	0.244	0.293	0.127	0	0.162
5	43.356	39.069	0	0.177	0.89	0.518	0.872	0.082	0.305	0.188	0.627	0.026
6	43.591	44.732	0	0.027	0.764	0.526	1.114	0.111	0.587	0.153	0.307	0.182
7	48.87	49.64	0	0.138	0.438	0.364	2.055	0.156	0.627	0.091	0.214	0.174
Promedio*	45.834	44.274	0.034	0.0968	0.632	0.423	1.008	0.164	0.429	0.178	0.164	0.106

*No existen diferencias estadísticas (P>0.05) entre las réplicas de cada tratamiento.

Anexo 4. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. asperellum* (TFR3) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.

Repetición	Testigo		Benomilo		Captan		Fluazinam		Quintozeno + thiram		Tiofanato metílico	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
1	35.824	35.694	0.203	0.18	1.53	0.504	1.061	1.133	0.284	0.138	0.202	0
2	38.738	38.432	0.207	0.117	0.941	1.692	1.327	1.222	0.315	0.305	0	0
3	44.555	43.667	0.166	0.041	1.111	0.864	1.062	1.008	0.443	0.293	0	0
4	39.746	40.012	0	0	1.072	0.497	1.338	1.12	0.278	0.176	0.18	0
5	44.666	44.254	0.169	0.25	1.148	0.931	1.174	1.072	0.832	0.157	0.16	0
6	47.232	48.664	0.172	0	1.204	1.333	1.043	1.072	0.35	0.383	0	0
7	39.042	37.666	0.107	0.201	1.132	0.457	1.032	0.958	0.397	0.194	0	0
Promedio*	41.401	41.199	0.147	0.113	1.163	0.897	1.149	1.084	0.415	0.235	0.078	0

*No existen diferencias estadísticas (P>0.05) entre las réplicas de cada tratamiento.

Anexo 5. Área de crecimiento micelial (cm²) de *T. harzianum* (TA4) en las réplicas 1 y 2, en los tratamientos: testigo, benomilo, captan, fluazinam, quintozeno + thiram y tiofanato metílico.

Repetición	Testigo		Benomilo		Captan		Fluazinam		Quintozeno + thiram		Tiofanato metílico	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
1	30.274	24.939	0	0	0.968	0.62	1.732	1.926	0.481	0.201	0	0.192
2	33.198	27.959	0.334	0.282	1.215	1.349	1.227	1.578	0.454	0.497	0	0
3	31.086	29.347	0	0	1.135	1.696	1.616	1.833	0.298	0.189	0.24	0
4	33.764	30.125	0	0.224	1.443	0.942	1.337	1.786	0.558	0.388	0.219	0
5	23.978	28.359	0.314	0	1.287	1.217	2.18	1.637	0.41	0.195	0.451	0
6	27.322	32.184	0	0	1.077	2.101	1.468	1.699	0.333	0.449	0.282	0
7	33.347	27.514	0.175	0	0.872	1.254	1.612	1.915	0.482	0.38	0	0
Promedio*	30.425	28.633	0.118	0.073	1.143	1.311	1.596	1.768	0.431	0.329	0.171	0.028

*No existen diferencias estadísticas (P>0.05) entre las réplicas de cada tratamiento

Anexo 6. Crecimiento micelial (cm²) de *Trichoderma asperellum* (Cut-B) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de crecimiento*
Quintozeno + thiram	0 ^a	100	0
Tiofanato metílico	0 ^a	100	0
Benomilo	0.09 ^a	99.83	0.17
Fluazinam	0.59 ^b	98.95	1.05
Captan	1.19 ^c	97.88	2.12

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

Anexo 7. Crecimiento micelial de *Trichoderma tomentosum* (SS1) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de crecimiento*
Quintozeno + thiram	0 ^a	100	0
Benomilo	0 ^a	100	0
Tiofanato metílico	0.21 ^a	99.62	0.38
Captan	3.42 ^b	93.91	6.09
Fluazinam	6.23 ^c	88.92	11.08

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

Anexo 8. Crecimiento micelial de *Trichoderma barbatum* (SS2) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de crecimiento*
Benomilo	0.07 ^a	99.87	0.13
Tiofanato metílico	0.13 ^a	99.76	0.24
Quintozeno + Thiram	0.30 ^a	99.46	0.56
Captan	0.53 ^a	99.05	0.95
Fluazinam	0.59 ^a	98.95	1.05

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

Anexo 9. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (TFR3) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de crecimiento*
Tiofanato metílico	0.04 ^a	99.92	0.08
Benomilo	0.13 ^a	99.76	0.24
Quintozeno + Thiram	0.32 ^a	99.43	0.57
Captan	1.03 ^a	98.16	1.84
Fluazinam	1.12 ^a	98.00	2

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

Anexo 10. Crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (TA4) en medio de cultivo PDA con fungicidas.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*	Porcentaje de inhibición*	Porcentaje de crecimiento*
Benomilo	0.09 ^a	99.83	0.17
Tiofanato metílico	0.10 ^a	99.82	0.18
Quintozeno + Thiram	0.38 ^{ab}	99.32	0.68
Captan	1.23 ^{ab}	98.95	1.05
Fluazinam	1.68 ^b	97.81	2.19

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Comparación de medias Tukey (P>0.05).

* Respecto al testigo.

Anexo 11. Efecto del ingrediente activo sobre los aislados; *T. asperellum* (Cut-B y TFR3), *T. tomentosum* (SS1), *T. barbatum* (SS2) y *T. harzianum* (TA4).

i. a. aislado	Fluazinam	Captan	Benomilo	Tiofanato metílico	Quintozeno+Thiram
Cut-B	Tolerante	Tolerante	Sensible	Sensible	Fungistático
SS1	Tolerante	Tolerante	Sensible	Sensible	Fungistático
SS2	Tolerante	Tolerante	Baja tolerancia	Baja tolerancia	Tolerante
TFR3	Tolerante	Tolerante	Baja tolerancia	Baja tolerancia	Tolerante
TA4	Tolerante	Tolerante	Baja tolerancia	Baja tolerancia	Tolerante
