



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo

**AISLAMIENTO DE *Trichoderma asperellum* Y SU EFECTIVIDAD *in vitro*
 FRENTE A *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea***

T E S I S

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

P R E S E N T A

HARACET LÓPEZ FUENTES

DIRECTORES DE TESIS

M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi

Dr. en C. Rómulo García Velasco

Tenancingo, Estado de México; noviembre de 2023

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1 Importancia del cultivo de rosa	12
2.2 Patógenos importantes del cultivo de rosa	12
2.2.1. <i>Rosellinia necatrix</i> Berl. Ex Prill.	13
2.2.2 <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	15
2.2.3 <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	16
2.3 El género <i>Trichoderma</i>	17
2.3.1. Clasificación taxonómica	18
2.3.2 Características morfológicas y culturales.....	18
2.3.3 Condiciones óptimas de crecimiento	20
2.4 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico.....	20
2.5 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	21
2.5.1 Mecanismos directos	21
2.5.1.1 Competencia	21
2.5.2 Mecanismos indirectos.....	24
2.6 <i>Trichoderma</i> spp. frente a fitopatógenos	25
2.7 Tolerancia de <i>Trichoderma</i> spp. a fungicidas.....	33
3.JUSTIFICACIÓN.....	35
4. HIPÓTESIS	36

5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos específicos	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1 Ubicación de la investigación	37
6.2 Colecta de muestras de suelo	37
6.3 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
6.3.1 Preparación de medio de cultivo selectivo para <i>Trichoderma</i> spp.	38
6.3.2 Siembra de muestras de suelo	38
6.3.3 Purificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	39
6.4 Obtención y selección de cultivos monospóricos	39
6.5 Identificación morfológica a nivel de género y especie de <i>Trichoderma</i> spp.	41
6.6 Identificación molecular a nivel de especie	42
6.7 Determinación de los mecanismos de acción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>Verticillium dahliae</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	43
6.7.1 Material biológico	43
6.7.2 Competencia.....	43
6.7.3 Antibiosis por metabolitos volátiles	46
6.7.4 Antibiosis por metabolitos difusibles.....	47
6.7.5 Micoparasitismo	47
6.7.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Aislamiento de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.....	49
7.2 Selección de cultivos monospóricos.....	49
7.3 Caracterización cultural.....	50

7.4 Identificación morfológica a nivel de género	50
7.5 Identificación molecular a nivel de especie	51
7.6 Mecanismos de acción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>Verticillium dahliae</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	53
7.6.1 Competencia	53
7.6.2 Antibiosis por metabolitos volátiles	58
7.6.3 Antibiosis por metabolitos no volátiles	64
7.6.4 Micoparasitismo	70
8. DISCUSIÓN.....	71
9. CONCLUSIONES	75
10. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales fitopatógenos controlados por especies de <i>Trichoderma</i> en cultivos de importancia agrícola.	29
Cuadro 2. Clasificación de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre fitopatógenos de acuerdo con Bell y Markham (1982), modificado por Ruiz (2010).	45
Cuadro 3. Tasa de crecimiento y esporulación de los seis cultivos monospóricos obtenidos a partir de la colonia Cut-B.	49
Cuadro 4. Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. de la cepa Cut-B de acuerdo con el tamaño de conidios y fiálides.	52
Cuadro 5. Identificación molecular de la cepa CuT-B, utilizando los cebadores universales ITS4 e ITS5 alineados con especies reportadas en la base de datos del NCBI.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Trichoderma asperellum</i> . a-c) Conidióforos; d y e) conidios; f) clamidospora. Tomado de Samuels <i>et al.</i> (1999) y Torres-de la Cruz <i>et al.</i> (2015).	19
Figura 2. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> en medio de cultivo PDA de <i>Trichoderma</i> spp. a) <i>T. asperellum</i> , b) <i>T. tomentosum</i> , c) <i>T. barbatum</i> , d) <i>T. asperellum</i> , e) <i>T. harzianum</i> . Tomado de Rojas (2020).	19
Figura 3. <i>Rosa hybrida</i> cultivada bajo invernadero en el Centro Universitario UAEM Tenancingo.	37
Figura 4. Trazo diario del crecimiento radial de cultivos monospóricos de <i>Trichoderma</i> spp.	40
Figura 5. Técnica de cultivos duales utilizada para evaluar el grado de competencia entre el antagonista y los fitopatógenos.	44
Figura 6. Técnica de cajas superpuestas para determinar el efecto de metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>R. necatrix</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>B. cinerea</i> . Tomada de Alonso (2020).	46
Figura 7. Características culturales de la cepa Cut-B en medio de cultivo PDA. a) Crecimiento micelial grumoso y verdoso, b) reverso de la caja de Petri con pigmentación verde debida a la presencia de esporas.	50
Figura 8. Características morfológicas de la cepa Cut-B. a) Conidios, b) fiálide, c) conidióforo (40x).	51
Figura 9. Comparación de medias de los días al primer contacto entre la cepa Cut-B y <i>R. necatrix</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>B. cinerea</i> . Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey (P<0.05).	53
Figura 10. Comparación de medias de la clasificación de antagonismo de la cepa Cut-B confrontado en cultivos duales con <i>R. necatrix</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>B. cinerea</i> . Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey (P<0.05).	54
Figura 11. Comparación medias de la efectividad biológica de la cepa Cut-B en cultivos duales con <i>B. cinerea</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>R. necatrix</i> . Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey (P<0.05)...	55

Figura 12. Grado de competencia <i>T. asperellum</i> frente a <i>B. cinerea</i> . a) Testigo, b) confrontamiento, disco izquierdo corresponde a la cepa Cut-B y el disco derecho a <i>B. cinerea</i>	56
Figura 13. Grado de competencia de <i>T. asperellum</i> frente a <i>V. dahliae</i> . a) Testigo, b) confrontamiento, disco izquierdo corresponde a la cepa Cut-B y el disco derecho a <i>V. dahliae</i>	57
Figura 14. Grado de competencia de <i>T. asperellum</i> frente a <i>R. necatrix</i> . a) Testigo, b) confrontamiento, disco izquierdo corresponde a la cepa Cut-B y el disco derecho a <i>R. necatrix</i>	58
Figura 15. Comparación de medias de la efectividad biológica por efecto de metabolitos volátiles de <i>T. asperellum</i> frente a <i>V. dahliae</i> , <i>R. necatrix</i> y <i>B. cinerea</i> . Literales iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P>0.05$).....	59
Figura 16. Tasa de crecimiento micelial ($\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$) por efecto de metabolitos volátiles de <i>T.asperellum</i> en los tratamientos: <i>R. necatrix</i> , <i>R. necatrix</i> + Cut-B, <i>V dahliae</i> , <i>V dahliae</i> + Cut-B, <i>B. cinerea</i> y <i>B. cinerea</i> + Cut-B.	60
Figura 17. Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> por efecto de metabolitos volátiles de <i>T.asperellum</i> . a) Testigo, b) Cepa Cut-B.....	61
Figura 18. Crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> por efecto de metabolitos volátiles de <i>T.asperellum</i> a) Testigo, b) Cepa Cut-B.....	62
Figura 19. Crecimiento micelial de <i>R. necatrix</i> por efecto de metabolitos volátiles de <i>T. asperellum</i> . a) Testigo, b) Cepa Cut-B.....	63
Figura 20. Comparación de medias de la efectividad biológica debida a metabolitos no volátiles de <i>T. asperellum</i> . frente a <i>V. dahliae</i> , <i>R. necatrix</i> y <i>B. cinerea</i> . Literales diferentes indican que existen diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P<0.05$).....	65
Figura 21. Tasa de crecimiento micelial ($\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$) por efecto de metabolitos no volátiles de <i>T.asperellum</i> entre los tratamientos: <i>R. necatrix</i> , <i>R. necatrix</i> + Cut-B, <i>V dahliae</i> , <i>V dahliae</i> + Cut-B y <i>B. cinerea</i> , <i>B. cinerea</i> + Cut-B.	66
Figura 22. Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> por efecto de metabolitos no volátiles de <i>T.asperellum</i> . a) Testigo, b) Cepa Cut-B.	67

Figura 23. Crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos no volátiles de *T.asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B. 68

Figura 24. Crecimiento micelial de *R. necatrix* por efecto de metabolitos no volátiles de *T.asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B. 69

Figura 25. Micoparasitismo de *T. asperellum* sobre *Botrytis cinerea*. a) Adhesión de micelio de *T. asperellum* (Ta) al micelio de *B. cinerea* (Bc). b) Formación de haustorios (H) de *T. asperellum* (Ta) para alimentarse de *B. cinerea* (Bc). c) Enrollamiento (E) de *T. asperellum* al micelio de *B. cinerea*.(Bc).. 70

RESUMEN

Trichoderma es considerado un género con alto potencial en el manejo de fitopatógenos y la estimulación del crecimiento vegetal a partir de los diferentes mecanismos de acción directa e indirecta que presenta, lo cual ha permitido que dicho antagonista sea utilizado como control de enfermedades en diversos cultivos de importancia agrícola. Por tanto, la presente investigación tuvo como objetivo general determinar la efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos de *Rosa hybrida*. A partir de muestras de suelo cultivado con rosa y de acuerdo con la técnica propuesta por Guigón-López *et al.*, (2004) y Howell (2003), se obtuvieron colonias de *Trichoderma* spp. para posteriormente a partir de cultivos monospóricos obtener la cepa Cut-B identificada como *T. asperellum*. Dicha cepa fue evaluada para los mecanismos de acción de competencia, por medio de la técnica de cultivos duales (Bell y Markham, 1982), metabolitos volátiles a través la técnica de cajas superpuestas (Allori *et al.*, 2014) y metabolitos difusibles por medio de la técnica del papel celofán (Dennise y Webster, 1971) y micoparasitismo utilizando la técnica de de microcultivos propuesta por Ramírez-Gama *et al.*, (2015); frente a *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea* y así determinar la efectividad biológica para cada patógeno a partir de un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones, analizados por medio de un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($p < 0.05$), cabe destacar que para metabolitos volátiles y difusibles, se llevó a cabo una regresión lineal los datos del área de crecimiento micelial por día y por patógeno se sometieron a una regresión lineal simple, con la finalidad de determinar la tasa de crecimiento ($\text{cm}^2 \text{día}^{-1}$), la cual estuvo representada por la pendiente de la recta. Todos los análisis se realizaron con el programa InfoStat, versión estudiantil.

La efectividad biológica de Cut-B frente a *R. necatrix* en el experimento de competencia, fue de 88.6 %, valor más alto en dicha prueba, mientras que, en las pruebas de metabolitos volátiles y difusibles, se presentaron un 34.4 % y 2.24 % respectivamente. De forma similar, para el patógeno *V. dahliae* la efectividad biológica en competencia fue de 65.85 %, metabolitos volátiles de 31.6 % y

difusibles en 10.48 %. En contraste a dichos valores la efectividad biológica para *B. cinerea* en competencia, fue de 55.43 % valor similar al obtenido en prueba de metabolitos difusibles en donde se muestra el valor más alto en la prueba con 55.19 %, de la misma forma se mostró también el mejor porcentaje para metabolitos difusibles con un 28.27 %, además de que con dicho patógeno, fue posible observar adherencia al micelio de *B. cinerea* y penetración a través de haustorios y enrollamiento del micelio, dicho análisis permite establecer que la cepa Cut-B es efectiva en el control *in vitro* del patógeno *B. cinerea* por presentar efectividad en los mecanismos de acción de competencia, metabolitos volátiles, difusibles y micoparasitismo.

1. INTRODUCCIÓN

El Estado de México, se posiciona a nivel nacional como la principal entidad productora de rosa de corte (*R. hybrida* L.) al representar el 70 % del volumen a nivel nacional (SIAP,2021). Dicho cultivo puede ser afectado por diversas enfermedades infecciosas, cuyos agentes causales pueden ser hongos, oomicetos, bacterias, virus y nemátodos (Kenneth y Cloyd, 2007) de los cuales, en la región productora del Estado de México, han sido reportados como patógenos de dicho cultivo: *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. (García-Velasco *et al.*, 2012; Domínguez, 2008), *Verticillium dahliae* Kleb. (García-Velasco *et al.*, 2017) y *Botrytis cinerea* Pers. (Camacho, 2009).

El control de dichos fitopatógenos abarca principalmente el uso de productos químicos lo cual ha desencadenado diversos daños al ambiente, a la salud de la población y su uso desmedido ha ocasionado pérdida de sensibilidad a diversos ingredientes activos; entre los que destacan la pérdida de sensibilidad de *B. cinerea* a procloraz e iprodiona (Camacho, 2009) y desarrollo de resistencia a tiabendazol (López, 2019; Manzanos-Ayala *et al.*, 2019); además de *R. necatrix*, que ha perdido sensibilidad a quintozeno (Domínguez, 2008), en consecuencia a ello, ha resultado importante la incorporación de métodos alternativos de control de fitopatógenos, entre los que destacan el uso de microorganismos de control biológico como especies del género *Trichoderma*, de las cuales se ha demostrado la importancia de la obtención de cepas nativas de organismos antagonistas, los cuales presentan mejor capacidad de adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona en donde serán aplicados (González *et al.*, 1999) al considerar también la importancia de las exigencias térmicas del antagonista las cuales deben ser compatibles con las del patógeno para que se ejerza la aptitud de antagonista (Mitidieri, 1988).

Derivado de lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en determinar la efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos de *Rosa hybrida*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del cultivo de rosa

La rosa (*Rosa hybrida* L.) como flor de corte es uno de los cultivos más apreciados a nivel mundial; la demanda se atribuye a su fragancia y a la amplia variedad de tonos y colores que satisface los gustos más exigentes de los consumidores (Yong, 2004; Dahal, 2013). En lo que respecta a la producción en México, en el año 2021 el SIAP reportó que la principal entidad productora es el Estado de México, ya que su volumen representó el 73 % del total nacional, con un valor de producción de \$1,845,712,780 MXN, así como 863 hectáreas de cultivo bajo invernadero, particularmente distribuidas en los municipios de: Coatepec Harinas, Ixtapan de la Sal, Malinalco, Tenancingo, Villa Guerrero y Zumpahuacán, pertenecientes al distrito de Desarrollo Rural 078.

2.2 Patógenos importantes del cultivo de rosa

Kenneth y Cloyd (2007) mencionan que el cultivo de rosa puede ser afectado por diversas enfermedades infecciosas, cuyos agentes causales pueden ser hongos, oomicetos, bacterias, virus y nemátodos. El desarrollo de tales organismos depende de varios factores, entre estos la presencia de un patógeno virulento, un huésped susceptible, condiciones ambientales adecuadas y la acción del hombre con sus cultivos y prácticas de manejo (Moschini *et al.*, 2013).

En la región florícola del Estado de México se han desarrollado diversas investigaciones que reportan como patógenos de dicho cultivo a: *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. (García-Velasco *et al.*, 2012; Domínguez, 2008), *Verticillium dahliae* Kleb. (García-Velasco *et al.*, 2017) y *Botrytis cinerea* Pers. (Camacho, 2009), los cuales ocasionan la pudrición blanca de la raíz, marchitez de la planta y el moho gris de la flor, respectivamente. Estas enfermedades provocan serias pérdidas de producción y calidad del producto y en consecuencia el uso desmedido de agroquímicos, lo cual ha ocasionado pérdida de sensibilidad a diversos ingredientes activos; por ejemplo, para el caso de *B. cinerea* se ha reportado pérdida de sensibilidad a procloraz e iprodiona (Camacho, 2009) y desarrollo de resistencia a tiabendazol (López, 2019; Manzanos-Ayala *et al.*, 2019); para el caso de *R. necatrix*,

Domínguez (2008) reportó que el patógeno ha perdido sensibilidad a quintozeno. Por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas de manejo, entre estas el uso de agentes de control biológico como *Trichoderma* spp.

2.2.1. *Rosellinia necatrix* Berl. Ex Prill.

De acuerdo en Catalogue of Life (2022), *R. necatrix* se encuentra ubicado dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Xylariales

Familia: Xylariaceae

Género: *Rosellinia*

Especie: *Rosellinia necatrix* Berl. Ex Prill.

Rosellinia necatrix (anamorfo *Dematophora necatrix*) es un parásito facultativo, que ha sido reportado en alrededor de 170 especies de plantas, distribuidas en 63 géneros y 30 familias, incluidas las plantas herbáceas (Khan, 1959 citado por Kulshresthael *et al.*, 2014), se desarrolla principalmente en suelos arcillosos, con temperatura entre 20-25 °C y humedad relativa de 75-100 % (Mendoza y González, 1993).

Domínguez (2008) y García *et al.* (2012), reportan que la enfermedad se distribuye en el cultivo de rosa en forma de manchones y avanza en línea recta sobre las camas de cultivo. Las plantas atacadas pueden no presentar síntomas en la parte aérea; cabe señalar que la sintomatología depende de la edad de la planta y de la severidad de la enfermedad, diferenciando así dos tipos de síntomas:

- 1) La planta presenta marchitez y la muerte se presenta en poco tiempo.
- 2) Las plantas presentan pequeño y escaso follaje, el cual a través del tiempo se vuelve clorótico y se marchita. Conforme avanza la enfermedad las plantas mueren; sin embargo, estas conservan sus hojas por algún tiempo, mostrando un color anaranjado brillante, el cual es característico de la enfermedad.

En la parte subterránea de la planta se puede apreciar sobre la corteza de las raíces micelio blanco algodonoso que da origen a la formación de cordones miceliales de color blanco, que conforme maduran se tornan de color gris oscuro a negro. En estados avanzados de la enfermedad las raíces se vuelven blandas a causa de la pudrición ocasionada por el hongo, por lo que es fácil desprenderlas del suelo (García *et al.*, 2012; Domínguez, 2008).

El manejo de la enfermedad se lleva a cabo a través del uso de fungicidas químicos como: quintozeno, benomilo, tiofanato metílico y fluazinam (Mendoza, 2002). Asimismo, diversos estudios demuestran que son efectivos agentes de control biológico; por ejemplo, las combinaciones de ciertas bacterias como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *P. chlororaphis*, con *Trichoderma* spp. (*T. atroviride* y *T. virens*) en conjunto inducen retraso significativo de la podredumbre blanca en plantas de aguacate, e incluso mayor que aplicando dichos agentes de biocontrol de forma individual (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009).

2.2.2 *Verticillium dahliae* Kleb.

El Catalogue of Life (2022) establece la siguiente clasificación taxonómica para *V. dahliae*:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Plectosphaerellaceae

Género: *Verticillium*

Especie: *Verticillium dahliae* Kleb.

Verticillium dahliae es un fitopatógeno de suelo que produce la enfermedad denominada verticilosis. Es responsable de importantes pérdidas en amplia gama de especies cultivadas (López *et al.*, 2003). Se reporta que causa afectaciones en más de 300 especies vegetales, incluyendo plantas anuales y perennes, herbáceas y leñosas perennes (Farr y Rossman, 2014). Dicho hongo fitopatógeno tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo por largos periodos, afectando al hospedero cuando se establece en zonas donde previamente estuvo algún otro cultivo susceptible, como por ejemplo frutales u hortalizas (Kenneth y Cloyd, 2007). La marchitez por *V. dahliae* es favorecida en suelos con alto contenido de humedad y temperatura en un intervalo de 21-27 °C, condiciones que permiten a los microesclerocios (estructuras de resistencia) persistir por largos periodos hasta ser estimulados por exudados en la raíz (DGSV-CNRF, 2014) para posteriormente reiniciar el proceso de infección.

En el cultivo de rosa se reporta la presencia de síntomas en la planta como: marchitamiento en las hojas jóvenes y amarillamiento en las hojas inferiores; posteriormente se produce marchitamiento total. Las hojas presentan color amarillo

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

El manejo de la enfermedad se lleva a cabo por medio de la desinfección de herramientas, solarización de suelo y el uso de fungicidas como cloropicrina y bromulo de metilo (DGSV-CNRF, 2014), cabe aclarar este último producto se encuentra prohibido. No obstante, el uso de agentes biológicos como *Trichoderma* spp. da como resultado un manejo eficiente de la enfermedad, debido a que reduce los niveles de incidencia y severidad (Viana, 2015).

2.2.3 *Botrytis cinerea* Pers.

De acuerdo con Catalogue of life (2022), la clasificación taxonómica de *B. cinerea* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Leotiomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *Botrytis cinerea* Pers.

Botrytis cinerea (teleomorfo: *Botrytinia fuckeliana* Pers.) es una especie que destaca dentro de su género al ser la única especie polífaga que afecta a más de 200 tipos de plantas alrededor del mundo, dentro de las que destacan hortalizas (como pimiento, tomate, lechuga) frutales (fresa, uva, arándano) y ornamentales (rosa, crisantemo, clavel) (Agrios, 2004). También se considera como un patógeno necrotrófico capaz de sobrevivir como saprófito en gran número de especies cultivadas y arvenses (Araújo *et al.*, 2005). Tlapal y Mendoza (2002) mencionan que las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad se encuentran un intervalo de temperatura de 10-21 °C y humedad relativa mayor a 90 %.

Botrytis cinerea es un patógeno de importancia en el cultivo de rosa, ya que puede afectar tallos jóvenes y adultos. Es importante señalar que el daño más conocido que causa es en botones florales con diferentes grados de apertura. Los síntomas inician como pequeñas manchas rojo-púrpura, posteriormente el micelio y las estructuras de propagación del hongo cubren toda la flor observándose en este caso una masa pulverulenta gris. El ataque también suele presentarse en cámaras frigoríficas donde se almacena el producto después de la cosecha, así como durante el transporte (Bañón *et al.*, 1993).

El manejo del patógeno se realiza principalmente a través de fungicidas, entre los que destacan los ingredientes activos: tiabendazol, benomil, tiofanato de metilo, carbendazim, iprodiona, tebuconazol y procloraz. Estudios realizados por Camacho (2009) indican que, en la región florícola del Estado de México el patógeno ha perdido sensibilidad a procloraz e iprodiona y ha desarrollado resistencia a tiabendazol (López, 2019; Manzanos-Ayala *et al.*, 2019). Sin embargo, existen otras estrategias de manejo, dentro de las que destacan el uso de hongos como *Clonostachys rosea* f. s. *rosea* Link (Morandi *et al.*, 2003) y *T. harzianum* (Agrios, 2004).

2.3 El género *Trichoderma*

Investigaciones en diversos cultivos agrícolas evidencian que algunas especies del género *Trichoderma* presentan potencial para el manejo de fitopatógenos y, además, estimular el crecimiento vegetal (Verma *et al.*, 2007); ya que su rápido crecimiento y sus características fisiológicas son factores clave que contribuyen al efecto antagónico (Guigón-López *et al.*, 2010).

2.3.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con lo reportado en el Catalogue of Life (2022), el género *Trichoderma* cuenta con 379 especies registradas y se encuentra clasificado bajo el siguiente orden taxonómico:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

2.3.2 Características morfológicas y culturales

De acuerdo con autores como Harman (2000) y Stefanova *et al.* (1999), especies del género *Trichoderma* presentan micelio septado, ramificado y fino. Los conidios o esporas asexuales miden de 2.5 a 3.0 μm y surgen de fiálides hialinas, las cuales a su vez emergen de conidióforos ramificados que se presentan como penachos compactos y forman anillos con un sistema de ramas irregulares de manera piramidal (Figura 1). La mayoría de las especies presentan clamidosporas, que son estructuras de sobrevivencia que toleran condiciones ambientales adversas, su forma es globosa, en el micelio se disponen de manera intercalar o terminal. De acuerdo con Samuels *et al.* (1999) los conidios son de color verde oscuro y en colonias cultivadas en medio PDA se presentan anillos concéntricos y esporulación densa (Figura 2).

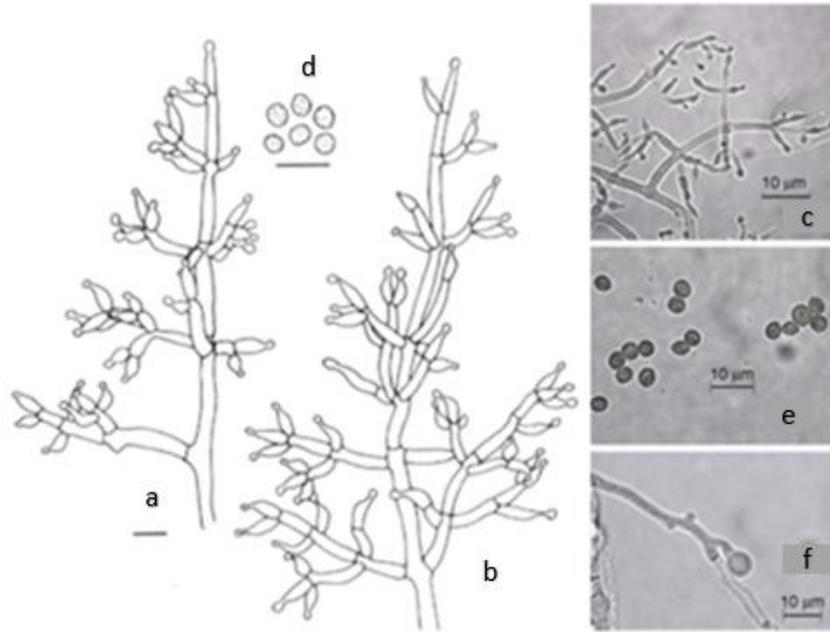


Figura 1. Morfología de *Trichoderma asperellum*. a-c) Conidióforos; d y e) conidios; f) clamidospora. Tomado de Samuels *et al.* (1999) y Torres-de la Cruz *et al.* (2015).

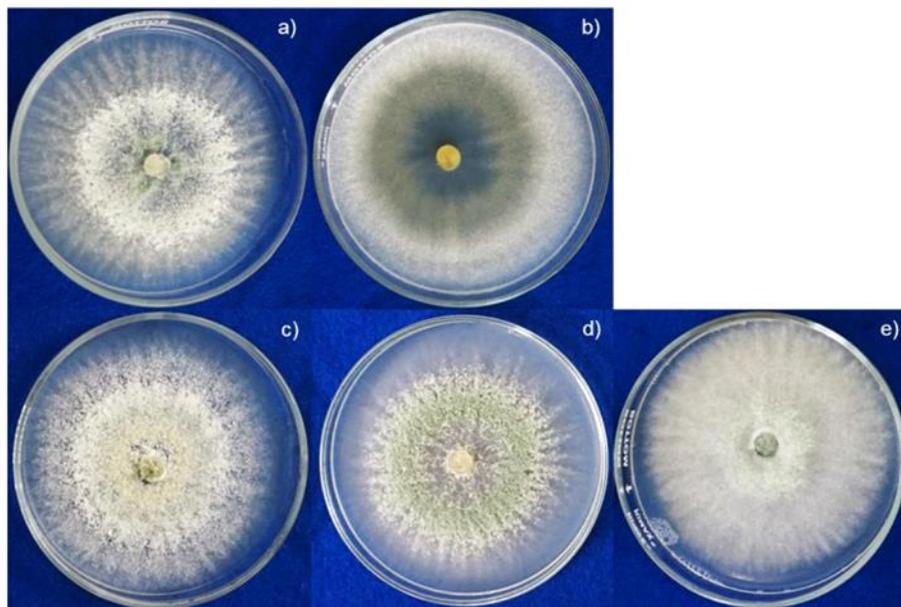


Figura 2. Crecimiento micelial *in vitro* en medio de cultivo PDA de *Trichoderma* spp. a) *T. asperellum*, b) *T. tomentosum*, c) *T. barbatum*, d) *T. asperellum*, e) *T. harzianum*. Tomado de Rojas (2020).

2.3.3 Condiciones óptimas de crecimiento

Martínez *et al.* (2013), reportan que la luz es un factor clave para la esporulación de *Trichoderma* spp. En ausencia de esta, la apariencia del micelio es blanco algodonoso; mientras que la presencia de esporas se evidencia por las tonalidades verdosas. Dicho género cuenta con capacidad para resistir amplio intervalo de temperaturas, con crecimiento desde 4 hasta 41 °C dependiendo la especie, siendo la óptima entre 20 y 30 °C y con humedad relativa del medio entre el 20-80 %. Dichas condiciones son relevantes para determinar los requerimientos *in vitro* en un sistema patógeno-antagonista al establecer la temperatura óptima y considerarla para futuros ensayos en campo para crear un programa de control biológico en cuanto a su relación con la temperatura (Rollán *et al.*, 1999).

2.4 *Trichoderma* spp. como agente de control biológico

El manejo de enfermedades actualmente se realiza principalmente a través de productos químicos, prácticas culturales y la introducción de agentes de control biológico. No obstante, es importante señalar que el uso de cepas comerciales de agentes de control biológico limita su persistencia en el suelo, por lo que no siempre se obtiene el efecto deseado. En este sentido, autores como González *et al.* (1999) consideran importante la obtención de cepas nativas de organismos antagonistas, los cuales están adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona en donde serán aplicados; considerando también la importancia de las exigencias térmicas del antagonista las cuales deben ser compatibles con las del patógeno para que se ejerza la aptitud de antagonista (Mitidieri, 1988).

Si bien, en campo existen factores abióticos y bióticos que influyen sobre la expresión del antagonismo, los estudios *in vitro* son fundamentales, debido a que a través de estos se refleja la capacidad y la variabilidad genética del antagonista y la del fitopatógeno para resistir el antagonismo; lo que permite la selección preliminar, para posteriormente ser evaluados bajo condiciones de campo con la finalidad de

determinar la capacidad de inhibir o limitar el crecimiento de los fitopatógenos, además de reflejar los requerimientos del sistema patógeno-antagonista para establecer la temperatura óptima a fin de considerarla en futuros ensayos de campo (Rollán *et al.*, 1999)

Benítez *et al.* (2004), mencionan que diversas especies del género *Trichoderma* destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo, al presentar mecanismos de acción que dependen de ciertos factores biológicos y ambientales, los cuales dominan las interacciones entre el patógeno y el antagonista. Diversas especies pueden ser biofungicidas efectivas, ya que son antagónicas de un amplio espectro de fitopatógenos gracias a los mecanismos de acción que presentan.

2.5 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Para la acción biocontroladora de *Trichoderma* spp. se han descrito diferentes mecanismos que regulan el desarrollo de los fitopatógenos (Infante *et al.*, 2009); estos se pueden clasificar como directos e indirectos. Los mecanismos directos son aquellos que actúan sobre los fitopatógenos, entre los que se encuentran: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis por efecto de metabolitos volátiles y no volátiles, secreción de enzimas, producción de compuestos inhibidores del crecimiento micelial, desactivación de enzimas de los fitopatógenos. Por otro lado, entre los mecanismos de acción indirecta se han reportado: la inducción de mecanismos de resistencia, detoxificación de toxinas excretadas por patógenos, la solubilización de elementos nutritivos en el suelo y la estimulación de crecimiento vegetal (Harman *et al.*, 2004 y Lorenzo, 2001).

2.5.1 Mecanismos directos

2.5.1.1 Competencia

La competencia es un mecanismo de acción que se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato o nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos

reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Infante *et al.*, 2009), lo cual resulta en beneficio para los antagonistas como *Trichoderma* spp. al ser un organismo con amplias ventajas competitivas, como su alta plasticidad ecológica al estar presente de forma natural en distintos suelos, su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales (Wardle *et al.*, 1993 citado por Samuels, 1996), su adaptación a condiciones adversas para sobrevivir fundamentalmente en forma de clamidosporas, alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y su alta persistencia en el ambiente que le permite colonizar rápidamente la rizosfera de las plantas. De igual manera, la competencia por nutrientes como el nitrógeno, microelementos y carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitinasa, laminaria y pectinas) (Stefanova *et al.*, 1999).

2.5.1.2 Micoparasitismo

El micoparasitismo es un ejemplo de simbiosis parasítica entre organismos, en donde el hospedero sirve como alimento para el antagonista (Chet, 1990). Los organismos asociados generalmente son clasificados como organismos benéficos necróficos o destructivos, ya que producen antibióticos, toxinas y enzimas hidrolíticas, en cantidades que apoyan la penetración y posteriormente se provoca la muerte o destrucción de uno o más componentes del hospedero, al afectar la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. El desarrollo de micoparasitismo depende de los hongos involucrados, la acción biotrófica del antagonista y las condiciones ambientales (Infante *et al.*, 2009; Manocha, 1991; Ortega, 2010 y Chet y Benhamou, 1998). Dicho mecanismo se lleva a cabo en cuatro etapas, las cuales se describen a continuación:

1. Crecimiento quimiotrófico: etapa de localización del hospedante a través del quimiotropismo positivo; es decir, crecimiento directo hacia un estímulo químico de las hifas que, como respuesta, se dirigen hacia el patógeno (Chet, 1990 y Elad y Chet, 1983).

2. Reconocimiento: en esta etapa se establece una relación específica entre los organismos a través de interacciones lectinas-carbohidratos. El reconocimiento molecular entre *Trichoderma* spp. y el hospedante, es el evento esencial que precede al proceso antagonista (Infante *et al.*, 2009).
3. Adhesión y enrollamiento: posterior a un reconocimiento positivo, las hifas de *Trichoderma* spp. se adhieren al hospedante mediante la formación de estructuras como ganchos y apresorios mediados por procesos enzimáticos (Pérez, 2004). Como consecuencia de la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno, procede un enrollamiento (Chet y Benhamou, 1998).
4. Degradación de paredes por actividad lítica: al penetrar las hifas del micoparásito en la pared del hospedante aparecen orificios que preceden a la lisis, siendo en estos puntos de contacto en los cuales se producen enzimas líticas extracelulares (quitinasas, glucanasas y proteasas) las cuales son responsables de la degradación de las paredes celulares del hospedante, debilitan al patógeno y posibilitan la inserción de estructuras especializadas e hifas de *Trichoderma* spp. que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno (Sandoval y López, 2003; Haram *et al.*, 1996 y Ortega, 2016). El proceso de micoparasitismo, finaliza con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante (Misaghi, 1984 y Adams, 1990 citados por Díaz, 1994).

2.5.1.3 Antibiosis

Cepas del género *Trichoderma* son capaces de ejercer biocontrol a partir de antibiosis, mecanismo definido como la inhibición del desarrollo o muerte de un organismo sensible a compuestos antimicrobianos metabolizados por el antagonista (Infante *et al.*, 2009), los cuales son derivados del metabolismo secundario (Schuster y Schmoll, 2019) y son llamados antibióticos. A partir de estos se puede inhibir el crecimiento microbiano, ejerciendo en el caso de hongos un efecto fungistático (inhibición de crecimiento y desarrollo) o fungicida (muerte del organismo). De acuerdo con su estructura química, dichos antibióticos derivan en

antibiosis por metabolitos volátiles (aquellos que se producen en alta concentración en el suelo) o no volátiles (su acción es a corta distancia del hospedero) (Ruíz, 2010).

2.5.1.4 Secreción de enzimas

Trichoderma spp. tiene la capacidad de secretar enzimas líticas, tales como β -1,3-glucanasa y quitinasas extracelulares, lo cual se ha relacionado con el control biológico de hongos fitopatógenos (Harman *et al.*, 1993). Esto se debe a que la quitina y el β -1,3-glucano son los principales componentes estructurales de la pared celular de hongos (Elad *et al.*, 1982). En este sentido, estas enzimas provocan la ruptura de las paredes celulares de los hongos (Harman *et al.*, 1993). Adicionalmente, se ha propuesto que tienen efecto al descomponer los polisacáridos, la quitina y los β -glucanos que son responsables de la rigidez de las paredes celulares de los hongos, lo que destruye la integridad de la pared celular (Howell, 2003).

2.5.2 Mecanismos indirectos

2.5.2.1 Desactivación de enzimas del patógeno

Martínez *et al.* (2013), mencionan que la desactivación de los factores de patogenicidad por parte de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos constituye un mecanismo de antagonismo indirecto poco estudiado. Sin embargo, es posible que el potencial enzimático de *Trichoderma* spp. para detener el proceso infeccioso de los patógenos sea mucho mayor, pues este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos, entre los que se encuentran sustancias que estimulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

2.5.2.2 Inducción de mecanismos de resistencia

Las plantas responden inmediatamente a la invasión de *Trichoderma* spp. mediante flujos iónicos y un estallido oxidativo, seguido de la deposición de calosa y la síntesis de polifenoles. Los eventos posteriores involucran señalización de salicilato (SA) y jasmonato/etileno (JA/ET), lo que da como resultado que toda la planta adquiera diversos grados de tolerancia a la invasión por patógenos. Esta respuesta se ha

descrito con mayor frecuencia como resistencia sistémica inducida (ISR) mediada por JA/ET y se asemeja a la respuesta desencadenada por las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Shoresh, 2010). Sin embargo, hallazgos como los publicados por Segarra *et al.* (2007) indican que a dosis de inóculo más altas *Trichoderma* spp. puede desencadenar una respuesta de resistencia sistémica adquirida (SAR) mediada por SA, similar a la invocada por patógenos necrotróficos.

En este sentido, Yedidia *et al.* (1999) demostraron que la inoculación de raíces de plántulas de pepino de siete días de edad en un sistema hidropónico aséptico de *T. harzianum* (T-203) a una concentración de 10^5 esporas mL⁻¹ inició respuestas de defensa de la planta en raíces y las hojas. También demostraron que las hifas de *T. harzianum* penetraron la epidermis y la corteza superior de la raíz del pepino. La respuesta de la planta estuvo marcada por aumento de la actividad de la peroxidasa (a menudo asociada con la producción de compuestos fungitóxicos), aumento en la actividad de la quitinasa y la deposición de aposiciones de pared enriquecidas en calosa en la superficie interna de las paredes celulares; además, observaron el aumento de la actividad enzimática tanto en las raíces como en las hojas.

2.6 *Trichoderma* spp. frente a fitopatógenos

El género *Trichoderma* comprende especies de relevancia económica debido a su potencial como agentes de control biológico dentro de las cuales destacan: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. atroviride* y *T. virens* (Sharma *et al.*, 2014). Algunos estudios realizados en cultivos de importancia agrícola con cepas de *Trichoderma* se mencionan en el cuadro 1, donde la mayoría de estos han procedido de aislados nativos y se han utilizado en numerosas evaluaciones de antagonismo bajo condiciones *in vitro* y/o *in vivo* contra diferentes fitopatógenos de importancia agrícola (entre estos hongos y oomicetos).

Se ha destacado el uso de cepas de *Trichoderma* spp. como estrategia de manejo eficaz de enfermedades en diversos cultivos, entre estos el cultivo de rosa; por ejemplo, en un estudio realizado por Arcos (2011), cuya finalidad fue evaluar antagonistas nativos provenientes de una finca en Ecuador, se colectaron 18

aislamientos de *Trichoderma* spp. de los cuales se seleccionó a la cepa 10B (*T. atroviridae* P. Karst.) por mostrar propiedades biocontroladoras frente a *B. cinerea* a nivel *in vitro* y, además, por presentar buen crecimiento y capacidad de esporulación. Adicionalmente, dicho autor comparó la eficiencia de la cepa 10B con la cepa C19 (*T. citrinoviride* Bissett.), utilizada como referencia, y un tratamiento testigo en el control de *B. cinerea* en las variedades de rosa Freedom®, Amelia® y Engagement®, para lo cual se evaluó la incidencia y severidad del patógeno en campo, postcosecha y vida florero. Los resultados obtenidos en campo revelaron que la incidencia del patógeno fue menor en el tratamiento testigo, en relación con las cepas C19 y 10B ya que se obtuvieron valores de 10%, 0% y 30% de incidencia en las variedades Amelia®, Freedom®, y Engagement® respectivamente.

La escala de severidad para las variedades Amelia® y Engagement® presentaron valores de 1-2.5% de infección, en los tres tratamientos, mientras que la variedad Freedom® presento nula infección, lo cual nos indica que la aplicación de las cepas en campo no resulta benéfica para el tratamiento de la enfermedad.

En relación con el estudio anterior, el porcentaje de incidencia y severidad en postcosecha para la variedad Freedom®, indicó que no hubo presencia de la enfermedad, mientras que en las variedades Amelia® y Engagement® los porcentajes de incidencia mostraron un 2.53 y 3.07 % respectivamente y una severidad de 1-2.5% para ambas variedades. Durante la fase de vida florero, los valores de incidencia obtenidos en los tratamientos fueron de 10.67 % para la cepa C19, 8.44 % tratamiento testigo y 13.78 % en la cepa 10B, concluyendo así que la cepa C19 y el tratamiento testigo, mostraron mayor efectividad.

En otro estudio llevado a cabo en Ecuador, Asero y Suquilanda (2004) evaluaron la respuesta de *T. harzianum* y *Penicillium* sp., en el control de *Sphaeroteca pannosa* que causa el oídio en rosal. La mezcla de *T. harzianum* + *Penicillium* sp. en dosis de 1.5×10^6 UFC mL⁻¹ dirigida al follaje, resultó efectiva por reducir la severidad del oídio, alcanzando además la mejor relación Beneficio/Costo en comparación con los tratamientos en donde los antagonistas se manejaron por separado.

Por su parte, Quinche (2010) evaluó el efecto protector de diversos biopesticidas formulados en base a *Trichoderma* sobre *Peronospora sparsa* Berk. (mildiu vellosa) y *B. cinerea* en el cultivo de la rosa. El menor porcentaje de infección por mildiu vellosa y *B. cinerea* se obtuvo con el bioproducto Tri-ko-fun® (*T. harzianum*) en presentación sólida al 8.5 % y en formulación líquida en dosis de 1 mL L⁻¹, respectivamente.

En México, Alonso (2020) evaluó a nivel *in vitro* los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo, antibiosis por metabolitos volátiles y no volátiles de las cepas nativas de *Trichoderma* spp.: SS1 (*T. tomentosum*), SS2 (*T. barbatum*), TA4 (*T. harzianum*) y TFR3 (*T. asperellum*), frente a *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea* (patógenos aislados a partir del cultivo de rosa). De acuerdo con los resultados obtenidos con el mecanismo de acción por competencia, las cepas que destacaron fueron: SS1, TA4 y TFR3 debido a que sobrecrecieron a los tres patógenos e inhibieron el crecimiento micelial de *R. necatrix* en 89, 88.4 y 86.6 % respectivamente; en el caso de *V. dahliae* la inhibición fue de 59.5, 67.5 y 70.6 % respectivamente; y para *B. cinerea*, 67.1, 65.8 y 67.7 % respectivamente. En cuanto a micoparasitismo destacó la cepa SS1, ya que este mecanismo de acción se observó frente a los tres fitopatógenos; mientras que las cepas TA4 y TFR3 micoparasitaron a *V. dahliae* y *B. cinerea* y la cepa SS2 solo a *B. cinerea*.

En lo que respecta al efecto de metabolitos volátiles sobre *R. necatrix*, las cepas que sobresalieron fueron SS2 y SS1 las cuales inhibieron el 48.3 y 45.7 % del crecimiento micelial, respectivamente; mientras que por metabolitos difusibles la cepa que inhibió el mayor crecimiento fue la SS2 en un 13.4 %. En el caso del crecimiento de *V. dahliae* por efecto de metabolitos volátiles de SS2 y SS1, este fue inhibido en 46.8 y 42.9 %, mientras que por metabolitos difusibles fue de 52.1 y 48.8%, respectivamente. Asimismo, *B. cinerea* presentó inhibición de su crecimiento por metabolitos volátiles de SS1, SS2 y TA4, en un 65.2, 58.3 y 36 %, respectivamente, y 25.8 % de inhibición de crecimiento por efecto de metabolitos difusibles de la cepa SS2.

En otro estudio realizado por Martínez (2020), se evaluó las cepas SS2 y Cut-B en plantas de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) Var. Delano, para determinar su potencial como inductoras de resistencia sistémica contra la roya blanca (*Puccinia horiana* Henn.) y en la estimulación de crecimiento vegetal. A partir de lo cual obtuvo que ambas cepas fueron capaces de reducir la incidencia de la enfermedad en un 47 %; en el caso de la severidad se determinó que Cut-B la redujo en 75 % y la SS2 en 80 %; además de que ambas fueron capaces de estimular el número de hojas en las plantas.

Cuadro 1. Principales fitopatógenos controlados por especies de *Trichoderma* en cultivos de importancia agrícola.

Especie	Fitopatógeno	Tipo de prueba	Cepa nativa	Cepa comercial	Cultivo	Autores
<i>T. asperellum</i>	<i>B. cinerea</i>					
	<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn				Chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) y mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	Guigón-López <i>et al.</i> (2010)
	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.	<i>In vitro</i>	X			
	<i>Phymatotrichopsis omnivora</i> (Duggar) Hennebert.					
	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	<i>In vitro</i>	X		Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	Ruíz (2010)

Cuadro 1. Continuación

Especie	Fitopatógenos	Tipo de prueba	Cepa nativa	Cepa comercial	Cultivo	Autores
<i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X		Pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Mohammed <i>et al.</i> , (2004)
	<i>R. solani</i> <i>S. rolfsii</i> <i>Fusarium</i> spp.	<i>In vitro</i>	X		Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.), soya (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) y tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Samaniego <i>et al.</i> , (2018)
	<i>R. solani</i>	<i>In vitro</i>	X		Tomate	Durman <i>et al.</i> , (1999)
	<i>B. cinerea</i>	<i>In vivo</i>		X	Rosa (<i>Rosa x hybrida</i>)	Jara, (2014)
<i>T. viride</i>	<i>Fusarium</i> spp. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. y Sacc.	<i>In vitro</i>			Ñame (<i>Dioscorea alata</i> L.)	Sinuco <i>et al.</i> , (2017)

Cuadro 1. Continuación

Especie	Fitopatógenos	Tipo de prueba	Cepa nativa	Cepa comercial	Cultivo	Autores
<i>T. atroviride</i> <i>T. kiningii</i>	<i>Fusarium</i> spp. <i>Phytophthora</i> spp.	<i>In vitro</i>	X		Producción de flores en verano	Cholango, (2009)
<i>T. koningii</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Schltld.	<i>In vitro</i>	X		Tomate	Paéz y Sanabria (2007)
<i>T. atroviridae</i> <i>T. citrinoviride</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>In vitro</i>	X		Rosa	Arcos (2011)
<i>T. harzianum</i> <i>Penicillium</i> spp.	<i>S. pannosa</i>	<i>In vivo</i>		X	Rosa	Asero y Suquilando (2004)
<i>T. harzianum</i>	<i>P. sparsa</i> <i>B. cinerea</i>	<i>In vivo</i>		X	Rosa	Quinche (2010)

Cuadro 1. Continuación

Especie	Fitopatógenos	Tipo de prueba	Cepa nativa	Cepa comercial	Cultivo	Autores
<i>T. tomentosum</i> <i>T. barbatum</i> <i>T. harzianum</i> <i>T. asperellum</i>	<i>R. necatrix</i> <i>V. dahliae</i> <i>B. cinerea</i>	<i>In vitro</i>	X		Rosa	Alonso (2020)
<i>T. barbatum</i> <i>T. asperellum</i>	<i>P. horiana</i>	<i>In vivo</i>	X		Crisantemo	Martínez (2020)

2.7 Tolerancia de *Trichoderma* spp. a fungicidas

La compatibilidad de productos fitosanitarios es evaluada con el objetivo de conservar la capacidad controladora de los mismos y establecer medidas para su uso eficiente (Rodríguez, 2019). El uso conjunto de productos químicos y agentes de control biológico puede generar efectos adversos entre estos; por ejemplo, afectar la composición del producto y/o perturbar en igual o incluso mayor medida a los controladores biológicos, y por lo tanto deteriorando su acción benéfica (Vinuela, 2011). En este sentido, Stefanova (2006) ha evidenciado que la acción de algunos productos fitosanitarios afecta la actividad enzimática de *Trichoderma* spp., también pueden generar efectos negativos en la germinación y concentración de conidios, además de retardar el tiempo de crecimiento micelial e incluso inhibir el crecimiento de este, provocar cambios en la coloración de las colonias, sus bordes y en la textura del micelio.

Derivado de lo anterior, Rojas (2020) se dio a la tarea de determinar la sensibilidad *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp.: SS1, SS2, TA4, TFR3 y Cut-B, a los ingredientes activos: tiofanato metílico, benomilo, captan, fluazinam y quintozeno + thiram, los cuales se encuentran entre los más utilizados para el manejo de fitopatógenos del suelo. De acuerdo con los resultados obtenidos, todas las cepas presentaron tolerancia a captan; Cut-B presentó sensibilidad a tiofanato metílico y quintozeno + thiram; sin embargo, el efecto de este último fue fungistático. De la evaluación frente a benomilo, se obtuvo que las cepas: SS1, Cut-B, SS2, TA4 y TFR3, presentaron un crecimiento de 0,0.09, 0.07, 0.09 y 0.13 cm² respectivamente, lo que demostró que la cepa SS1 es la única sensible a dicho ingrediente activo; en cuanto a fluazinam ningún aislado fue sensible. La mayor tolerancia respecto al testigo sin fungicida se presentó en la cepa SS1. Derivado de estos resultados, el autor concluye que dichas cepas tienen 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 fitopatógenos.

Por su parte Arcos (2011), en Ecuador, evaluó la sensibilidad *in vitro* de la cepa nativa 10B (*T. atroviridae*) a los botricidas más utilizados en el área de investigación,

con la finalidad de incluirla en un plan de manejo de *B. cinerea*, derivado de lo cual reporta que el antagonista presenta sensibilidad a: Tiophanato methyl, Sulfato de cobre pentahidratado + Kresoxim-metil y tolerancia a Kresoxim-metil y Boscalid, a partir de lo cual reporta que la cepa C10 es apta para su uso en campo, como un complemento para el biocontrol del patógeno con la observación de repoblar *Trichoderma* spp. al hacer uso de los productos a los cuales la cepa presentó sensibilidad.

3. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México la producción del cultivo de rosa bajo invernadero destaca en los municipios de Coatepec Harinas, Villa Guerrero y Tenancingo, región donde el rendimiento y calidad del cultivo son limitados por problemas fitosanitarios, dentro de los que sobresalen: la pudrición blanca de la raíz causada por *Rosellinia necatrix*, la marchitez de la planta provocada por *Verticillium dahliae* y el moho gris de la flor, cuyo agente causal es *Botrytis cinerea*.

Con la finalidad de evitar pérdidas económicas significativas, dichas enfermedades se manejan por medio de la aplicación de fungicidas, cuyo uso desmedido ha ocasionado diversos problemas, entre estos daños al ambiente, desarrollo de resistencia por parte de los fitopatógenos y serios impactos negativos a la salud humana. Actualmente se han desarrollado métodos de manejo alternativos, entre los que destaca el uso de agentes de control biológico, siendo *Trichoderma* un género ampliamente estudiado por sus mecanismos de acción, entre estos: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis por efecto de metabolitos volátiles y difusibles, desactivación de enzimas de patógenos, inducción de resistencia sistémica en las plantas y estimulación del crecimiento vegetal.

Cabe señalar que dicha alternativa aumenta su eficiencia con el uso de cepas nativas, la cual se atribuye a la adaptabilidad de los microorganismos a las condiciones edafoclimáticas de la región de producción. En la región florícola del Estado de México se aisló a las cepas *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. barbatum* y *T. tomentosum* con la finalidad de evaluar su actividad antagónica bajo condiciones *in vitro* frente a los patógenos *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea*; por lo que el objetivo del presente trabajo fue: determinar la efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos de *Rosa hybrida*.

4. HIPÓTESIS

Se obtendrán cepas nativas de *Trichoderma* spp., a partir de suelo cultivado con *Rosa hybrida* bajo condiciones de invernadero, las cuales presentarán diversos mecanismos de acción *in vitro* frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de *Rosa hybrida*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos de *Rosa hybrida*.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. a partir de suelo cultivado con *Rosa hybrida* bajo condiciones de invernadero en Tenancingo, Estado de México.
2. Identificar morfológica y molecularmente a nivel de género y especie a las cepas de *Trichoderma* spp.
3. Determinar a nivel *in vitro* los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación de la investigación

El presente estudio, se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en la carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Km 1.5, C.P. 52400, Tenancingo, Estado de México, México.

6.2 Colecta de muestras de suelo

La colecta de muestras de suelo se realizó en el cultivo de *R. hybrida* del Centro Universitario UAEM Tenancingo, el cual se encuentra bajo condiciones de invernadero (Figura 3). Para esto se utilizó la técnica propuesta por Guigón-López, *et al.*, (2004) y Howell (2003) que consiste en seleccionar al azar cinco plantas del cultivo, de las cuales se tomaron aproximadamente 200 g de suelo de la rizosfera a 20 cm de profundidad. Las cinco muestras se colocaron en una misma bolsa de polietileno, fueron homogenizadas y trasladadas al Laboratorio de Fitopatología para su procesamiento.



Figura 3. *Rosa hybrida* cultivada bajo invernadero en el Centro Universitario UAEM Tenancingo.

6.3 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

6.3.1 Preparación de medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de *Trichoderma* spp. se utilizó el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp. propuesto por Askew y Lang (1993), el cual contiene los siguientes componentes por cada litro de agua destilada: 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.9 g de K_2HPO_4 , 0.15 g de KLC, 1.0 g de NH_4NO_3 , 3.0 g de glucosa, 0.075 g rosa de bengala y 20 g de agar. El medio se esterilizó en autoclave (Felisa®) a 121 °C y presión de 1.5 kg cm^{-2} durante 20 minutos; una vez esterilizado y al tener una temperatura aproximada de 50 °C se agregaron 0.25 g de cloranfenicol, 0.2 g de PCNB y 0.04 g de captan; posteriormente, el medio de cultivo se vació en cajas de Petri de cristal de 9 cm de diámetro (Kimax®).

6.3.2 Siembra de muestras de suelo

Una vez homogeneizadas las cinco muestras de suelo se tomó una submuestra de 10 g que fue adicionada en 90 mL de agua destilada estéril. La mezcla se mantuvo en una parrilla de agitación (Cimarec®) durante 20 minutos; posteriormente se tomó 1 mL de la solución y fue diluido en 9 mL de agua destilada estéril, de esta forma se llevaron a cabo cinco diluciones seriadas.

La siembra se llevó a cabo a partir de las últimas cuatro diluciones seriadas, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar (Scorpion Scientific®) para lo cual, por separado se tomaron 100 μ L de la respectiva solución y fueron depositados en dos cajas de Petri con medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp. y enseguida se dispersaron con una asa micológica-bacteriológica de aluminio esteril.

Las siembras se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ C$) y luz natural. Fueron revisadas diariamente con la finalidad de identificar la presencia de crecimiento micelial típico de *Trichoderma* spp., el cual se caracteriza por micelio blanco algodonoso y compacto, que cuando presenta desarrollo de esporas se torna color verde, en algunos casos forma anillos

concéntricos y otras se puede observar pigmentación amarillenta al reverso de la caja de Petri (Windham *et al.*, 1989).

Una vez reconocida la presencia de *Trichoderma* spp. se realizaron preparaciones temporales para observarlas bajo microscopio compuesto (Carl Zeiss®) y confirmar su presencia con base en características morfológicas del hongo, tales como: micelio septado, fiálides, conidios y clamidosporas (Bernet y Hunter, 1998).

6.3.3 Purificación de *Trichoderma* spp.

Las colonias obtenidas se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo agar-dextrosa y papa (PDA) (BD Bioxon®) para lo cual se tomó una pequeña porción de micelio joven de la colonia que se transfirió a la caja con medio de cultivo.

6.4 Obtención y selección de cultivos monospóricos

A partir de las colonias obtenidas de *Trichoderma* spp. se realizaron cultivos monospóricos. La técnica consistió en adicionar 10 mL de agua destilada estéril a la colonia con crecimiento de siete días de edad, posteriormente con el apoyo de una varilla de aluminio estéril se dispersaron las esporas y se tomó 1 mL de solución que fue transferido a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. A partir de esta, se realizaron seis diluciones seriadas con la finalidad de disminuir la concentración de esporas y con ello facilitar la obtención de monospóricos; posteriormente, de cada tubo se tomó 1 mL que fue incorporado en medio de cultivo PDA y enseguida se dispersó utilizando una asa micológica-bacteriológica de aluminio estéril (Domínguez, 2012). Las siembras fueron revisadas diariamente y una vez que se detectó crecimiento se seleccionaron las seis colonias monospóricas de mayor tamaño y por separado fueron transferidas a medio de cultivo PDA.

De los seis monospóricos transferidos, se seleccionó el de mayor tasa de crecimiento ($\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$) y esporulación. Para el cálculo de la tasa de crecimiento se trazó diariamente el crecimiento radial de cada uno de estos con el apoyo de un

marcador indeleble de punto fino (Figura 4) hasta que al menos una de estas cubrió el 100% del medio de cultivo de la caja de Petri. Posteriormente se tomaron fotografías y se determinó el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43). Los datos se sometieron a una regresión lineal simple con el programa Infostat versión estudiantil, donde la tasa de crecimiento estuvo representada por la pendiente de la recta.

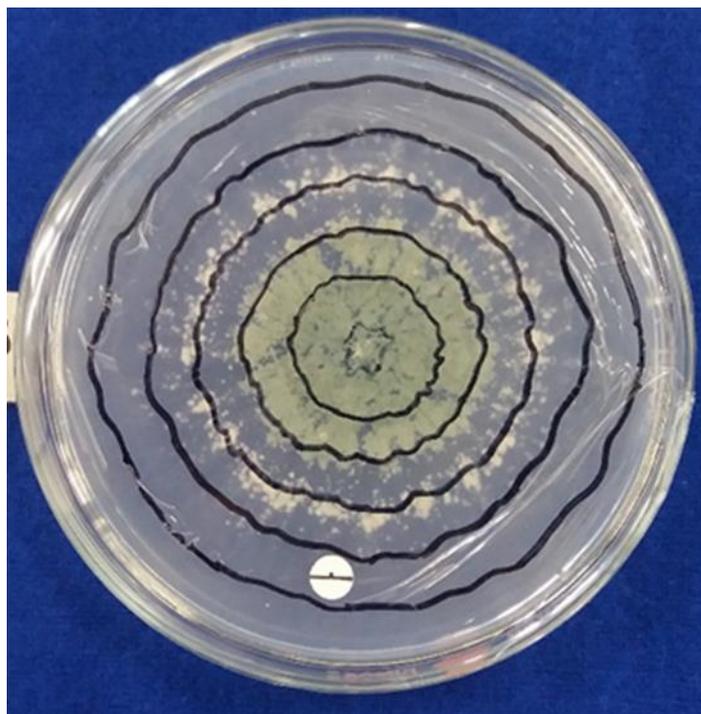


Figura 4. Trazo diario del crecimiento radial de cultivos monospóricos de *Trichoderma* spp.

Para determinar la concentración de esporas, a los cultivos monospóricos se les adicionó 10 mL de agua destilada estéril, enseguida se realizó la dispersión de esporas con una varilla de aluminio estéril; posteriormente, con una micropipeta (Boeco®) se tomaron 2 mL de la suspensión que fueron depositados en un tubo eppendorf®. A partir de esta se realizó el conteo de esporas haciendo uso de una

cámara de Neubauer (Marienfeld®) visualizada bajo microscopio compuesto. La determinación de número de esporas se realizó a través de las siguientes fórmulas:

a) Número de esporas contadas x 50= número de esporas mm³

b) Número de esporas mm³ x 1000= número de esporas mL¹

6.5 Identificación morfológica a nivel de género y especie de *Trichoderma* spp.

La identificación morfológica de la cepa seleccionada se llevó a cabo con el uso de claves taxonómicas y literatura especializada de Barnett y Hunter (1998) y Samuels *et al.* (1999). Previamente se realizaron preparaciones temporales para observar y registrar las características de *Trichoderma* spp., para esto fue empleada la técnica de microcultivo propuesta por Ramírez-Gama *et al.* (2015) con modificaciones. Esta consistió en colocar en la base de una caja de Petri papel absorbente humedecido con agua glicerinada al 5%, un triángulo de aluminio y sobre este un portaobjetos y dos discos de 8 mm de diámetro de medio de cultivo PDA ligeramente separados, sobre los cuales se sembró a *Trichoderma* spp., que posteriormente se cubrió con un cubreobjetos. Cabe mencionar que todos los materiales fueron previamente esterilizados.

Los microcultivos se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio. Diariamente fueron revisados, con la finalidad de observar el crecimiento micelial del hongo sobre el medio PDA y su contacto con el cubreobjetos. Al observarse crecimiento, con apoyo de pinzas de disección estériles, los cubreobjetos fueron retirados cuidadosamente del disco para evitar dañar el desarrollo del micelio, conidios y conidióforos. Por último, se colocó la muestra en un portaobjetos con azul de metileno para su revisión bajo microscopio compuesto, donde se registraron las siguientes características morfológicas: largo y ancho de fiálides, largo y ancho de conidios, forma, tamaño y posición de clamidosporas. La información obtenida se comparó con claves taxonómicas y literatura especializada (Barnett y Hunter, 1998; Samuels *et al.*, 1999).

6.6 Identificación molecular a nivel de especie

La cepa obtenida se cultivó en medio PDA y posteriormente se transfirió una porción del crecimiento para realizar la extracción de ADN genómico con el kit de extracción AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, se realizó un PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) para amplificar las regiones internas ITS4 e ITS5 de los genes ribosomales (ARN) 18S–5.8S y 5.8S–28S, haciendo uso de los cebadores universales ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador estándar (Biometra®, Alemania) en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl₂ 0.75 mM, dNTP's 0.2 mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen®, USA), 10 µM de cada iniciador y 80 ng de ADN total.

El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final a 72°C por 4 min; así mismo, se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, realizando la tinción con bromuro de etidio (5 mg L⁻¹) para visualizar los geles en un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad®, USA).

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

6.7 Determinación de los mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*

6.7.1 Material biológico

Se utilizó la cepa de *Trichoderma* spp. obtenida en el presente trabajo, y los hongos fitopatógenos: *R. necatrix* (VG2GR) y *V. dahliae* (V.D) aislados en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México y *B. cinerea* (TBC2) obtenido del municipio de Tenancingo, Estado de México; todos procedentes de cultivo de rosa. Cabe señalar que los fitopatógenos estudiados pertenecen a la colección del laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo.

Previo a realizar las pruebas para determinar los mecanismos de acción del antagonista, todos los hongos se sembraron en medio de cultivo PDA, y se mantuvieron en incubadora (LINDBERG/BLUEM®) a temperatura de 25°C ± 1°C durante siete días.

6.7.2 Competencia

El grado de competencia entre el antagonista y cada fitopatógeno se determinó a través de la técnica de cultivos duales (Bell y Markham, 1982). Para lo cual, se tomaron discos de 8 mm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. y de cada uno de los patógenos; en seguida se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA colocando en un extremo a *Trichoderma* spp. y en el otro al respectivo patógeno, separados por 6 cm (Figura 5). Las siembras se incubaron a 25 °C ± 1 °C, bajo condiciones de luz natural. Es importante señalar que, para el caso de *V. dahliae*, este se sembró tres días previos al establecimiento del experimento debido a que es de lento crecimiento.

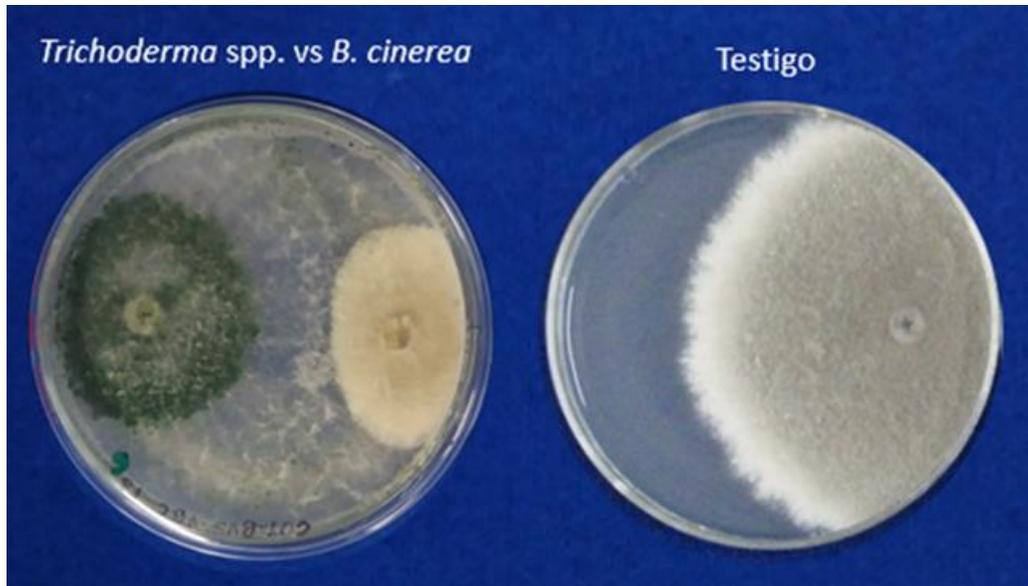


Figura 5. Técnica de cultivos duales utilizada para evaluar el grado de competencia entre el antagonista y los fitopatógenos.

Las siembras se revisaron cada 24 h con la finalidad de registrar los días transcurridos entre la siembra y el primer contacto entre el respectivo fitopatógeno y *Trichoderma* spp. Aproximadamente 15 días después de la siembra (dds) se determinó la clasificación de antagonismo por medio del pictograma propuesto por Bell y Markham (1982), modificado por Ruíz (2010) (Cuadro 2); en seguida se trazó el crecimiento radial del patógeno, se tomaron fotografías y con el uso del programa Image J (versión 1.43) se determinó el área de crecimiento micelial, y a partir de estos datos se calculó la efectividad biológica a través de la siguiente fórmula:

$$Pr = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} * 100$$

Donde:

Pr= Efectividad biológica (%)

Po=Mortalidad observada (%)

Pc=Mortalidad del testigo sin *Trichoderma* spp. (%)

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

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

6.7.3 Antibiosis por metabolitos volátiles

El efecto por metabolitos volátiles fue determinado con la técnica de cajas superpuestas (Figura 6) propuesta por Allori *et al.* (2014). Para esto se sembraron discos de medio de cultivo PDA de 8 mm de diámetro con crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. y de los patógenos, después se confrontaron el antagonista y cada patógeno colocando 2 bases de las cajas de Petri separadas por papel celofán estéril (cubriendo el ancho de las bases), se sellaron e incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bajo condiciones de luz natural.

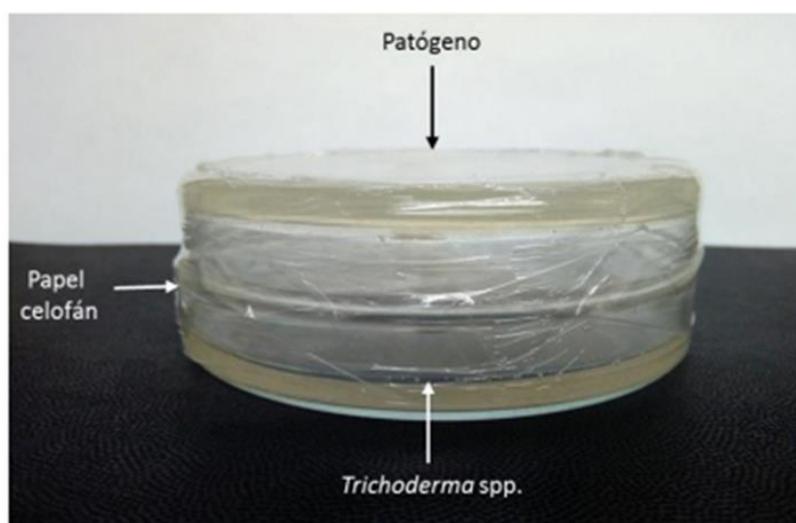


Figura 6. Técnica de cajas superpuestas para determinar el efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. frente a *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea*. Tomada de Alonso (2020).

El crecimiento micelial de los patógenos fue trazado cada 24 h con un marcador indeleble de punto fino. Para el caso de *V. dahliae*, debido a que es de lento crecimiento, los trazos de crecimiento se realizaron cada 48 h. El experimento se dio por terminado cuando al menos uno de los testigos de cada patógeno llenó por completo una caja de Petri. En todos los casos se tomaron fotografías para determinar el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43) y posteriormente se calculó la efectividad biológica como se indica en el apartado 6.7.2.

6.7.4 Antibiosis por metabolitos difusibles

El efecto inhibitorio de metabolitos difusibles fue determinado con la técnica de papel celofán propuesta por Dennise y Webster (1971); esta consiste en colocar discos de papel celofán estériles cubriendo totalmente el medio de cultivo PDA en una caja de Petri, posteriormente se colocó un disco de 8 mm de diámetro con crecimiento micelial de *Trichoderma* spp.; las siembras se incubaron a 25±1 °C. Después de 48 h se retiró el papel celofán utilizando dos pinzas estériles doblando los extremos del papel y evitando que alguna espora del antagonista contaminara el medio de cultivo PDA; una vez retirado el papel celofán, en el centro de la caja de Petri, se colocó un disco de medio de cultivo con crecimiento del respectivo patógeno. Las siembras se incubaron bajo las condiciones ya mencionadas.

El crecimiento micelial de los fitopatógenos fue marcado cada 24 h, a excepción de *V. dahliae* que fue cada 48 h debido a su lento crecimiento. El experimento se dio por concluido cuando al menos uno de los testigos de cada patógeno llenó por completo una caja de Petri. De todas las repeticiones se tomaron fotografías para determinar el área de crecimiento micelial con el programa Image J (versión 1.43), a partir de lo cual se determinó la efectividad biológica como se indica en el apartado 6.7.2.

6.7.5 Micoparasitismo

Se utilizó la técnica de microcultivos propuesta por Ramírez-Gama *et al.*, (2015) descrita en el apartado 6.5, con la diferencia de que en un extremo del disco de medio de cultivo se sembró al fitopatógeno y en el otro al antagonista. El cubreobjetos fue retirado con ayuda de unas pinzas de disección cuando se observó crecimiento de ambos microorganismos sobre este, y se fijó a un porta objetos con azul de metileno para ser visualizado en un microscopio compuesto y tomar fotografías con una cámara fotográfica (CANNON®).

El micoparasitismo ejercido por el antagonista fue identificado y evidenciado cuando el micelio de *Trichoderma* spp. se encontró en contacto o adherido al micelio del patógeno, en presencia de enrollamiento y lisis de las paredes celulares del

fitopatógeno o haustorios de *Trichoderma* spp. en las hifas del fitopatógeno (Howell, 2003).

6.7.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento. Por cada mecanismo de acción se tuvieron seis tratamientos, tres de ellos correspondieron al testigo (patógeno sin *Trichoderma* spp.) y tres a los tratamientos con interacción patógeno-*Trichoderma* spp.

Por cada mecanismo de acción se determinó la efectividad biológica y los datos se analizaron por medio de un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($P < 0.05$). En el caso de los experimentos de antibiosis por metabolitos volátiles y no volátiles, los datos del área de crecimiento micelial por día y por patógeno se sometieron a una regresión lineal simple, con la finalidad de determinar la tasa de crecimiento ($\text{cm}^2 \text{día}^{-1}$), la cual estuvo representada por la pendiente de la recta. Todos los análisis se realizaron con el programa InfoStat, versión estudiantil.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

De las siembras realizadas en medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp., a partir de suelo cultivado con rosa en el Centro Universitario UAEM Tenancingo se obtuvo una colonia de *Trichoderma* spp., la cual fue nombrada Cut-B.

7.2 Selección de cultivos monospóricos

Se obtuvieron seis cultivos monospóricos, los cuales tuvieron diferencias en la tasa de crecimiento y la esporulación. El monospórico Cut-B1 presentó la mayor tasa de crecimiento con $2.86 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$, pero no la mayor esporulación (4.2×10^7 conidios mL^{-1}). Por otro lado, la mayor esporulación se registró en el monospórico Cut-B5, siendo esta de 4.7×10^7 conidios mL^{-1} ; sin embargo, este tuvo menor la tasa de crecimiento (Cuadro 3). Derivado de este análisis se seleccionó al monospórico Cut-B1 para la determinación de los mecanismos de acción en los siguientes experimentos.

Cuadro 3. Tasa de crecimiento y esporulación de los seis cultivos monospóricos obtenidos a partir de la colonia Cut-B.

Monospórico	Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$)	Esporulación (conidios mL^{-1})
Cut-B1 [¶]	2.86	4.2×10^7
Cut-B2	2.00	3.2×10^7
Cut-B3	1.42	3.0×10^7
Cut-B4	1.92	2.8×10^7
Cut-B5	1.35	4.7×10^7
Cut-B6	2.03	2.5×10^7

[¶] Monospórico seleccionado

7.3 Caracterización cultural

En medio de cultivo PDA la cepa Cut-B presentó las siguientes características: al inicio del crecimiento el micelio fue blanco algodonoso; conforme envejeció se volvió compacto y verdoso debido a la producción de conidios, los cuales se agruparon en forma de grumos. Al reverso de la caja se puede observar pigmentación verdosa debido a los conidios, pero sin tinción del medio de cultivo (Figura 7).

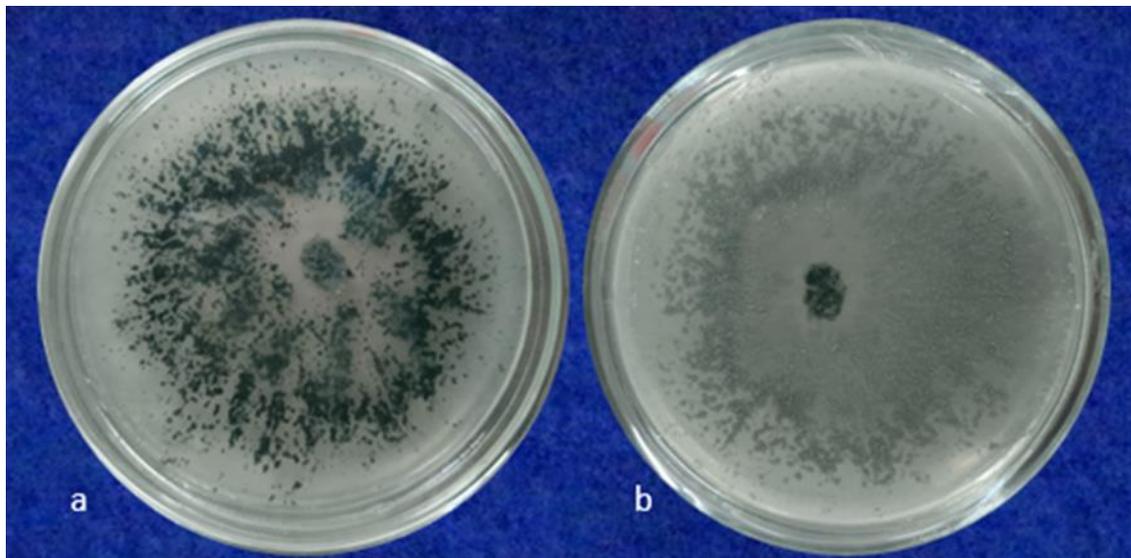


Figura 7. Características culturales de la cepa Cut-B en medio de cultivo PDA. a) Crecimiento micelial grumoso y verdoso, b) reverso de la caja de Petri con pigmentación verde debida a la presencia de esporas.

7.4 Identificación morfológica a nivel de género

De acuerdo con las observaciones microscópicas, la cepa Cut-B presentó micelio septado, conidios ligeramente ovoides, fiálides en forma de botella y verticiladas, conidióforos ramificados (Figura 8). Tales características corresponden a las reportadas para el género *Trichoderma* por Barnett y Hunter (1998) y Samuels *et al.* (1999). En promedio los conidios midieron 2.6 μm de largo x 2.1 μm de ancho. Las medidas de las fiálides fueron de 9.2 μm de largo, 1.9 μm de grosor en la parte media y 1.6 μm de grosor en la base (Cuadro 4).

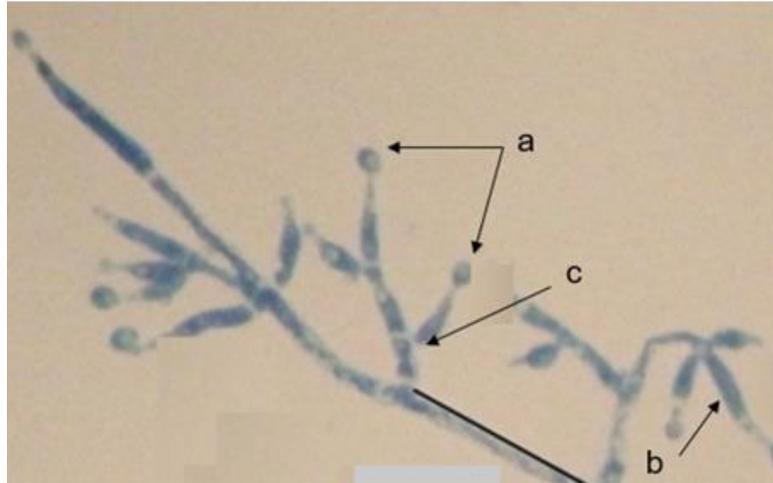


Figura 8. Características morfológicas de la cepa Cut-B. a) Conidios, b) fiálide, c) conidióforo (40x).

7.5 Identificación molecular a nivel de especie

Las secuencias de nucleótidos obtenidas y alineadas con la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI) indicaron que la cepa Cut-B corresponde a la especie *T. asperellum* Samuels, Lieckf & Nirenberg, que se alineó con los aislamientos con número de acceso MF661934.1 y KU341007.1 con 100% de similitud (Cuadro 5).

Cuadro 4. Identificación morfológica de *Trichoderma* spp. de la cepa Cut-B de acuerdo con el tamaño de conidios y fiálides.

Conidios						Fiálides								
Largo (µm)			Ancho (µm)			Largo (µm)			Medio (µm)		Base (µm)			
Máximo	Mínimo	\bar{x}^*	Máximo	Mínimo	\bar{x}^*									
4.3	1.5	2.6	3.3	1.2	2.1	18.1	3.6	9.2	2.7	1.2	1.9	2.1	0.6	1.6

* Promedio de 30 estructuras.

Cuadro 5. Identificación molecular de la cepa CuT-B, utilizando los cebadores universales ITS4 e ITS5 alineados con especies reportadas en la base de datos del NCBI.

Aislamiento	Cebadores	Número de nucleótidos	Especies identificadas	Número de acceso al GenBank	Porcentaje de similitud	Datos de las accesiones	
						Sustrato	Origen geográfico
Cut-B	ITS4	555	<i>T. asperellum</i>	MF661934.1	100 %	Rizosfera	Brazil
	ITS5	563	<i>T. asperellum</i>	KU341007.1	100 %	Suelo	

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

7.6.1 Competencia

Los días que transcurrieron para que se presentara el primer contacto entre los patógenos y el antagonista fue de 3 a 5. De acuerdo con el análisis estadístico, existieron diferencias significativas ($P < 0.05$); en el caso de *B. cinerea* en promedio el contacto se presentó a los 3.14 días, mientras que para *R. necatrix* a los 4.14 y para *V. dahliae* 4.57 días (Figura 9).

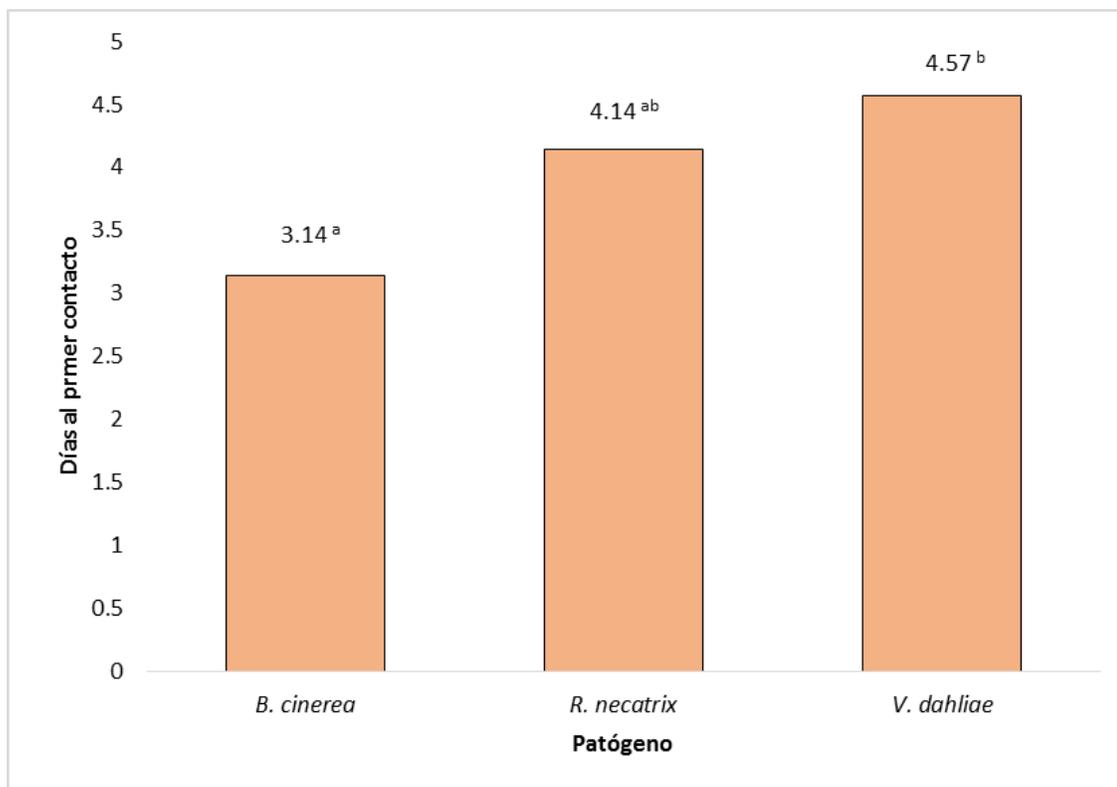


Figura 9. Comparación de medias de los días al primer contacto entre la cepa Cut-B y *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea*. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P < 0.05$).

En lo que respecta a la clasificación de antagonismo (Cuadro 2), existieron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) (Figura 10). Los tres fitopatógenos fueron sobrecrecidos por completo por la cepa Cut-B, por lo que se clasificaron en la clase 1 (Figuras 12-14). No obstante, es importante indicar que algunas de las repeticiones de *R. necatrix* se encontraron en la clase 2, lo que indica que Cut-B sobrecreció al patógeno alrededor de dos terceras partes (Figura 13).

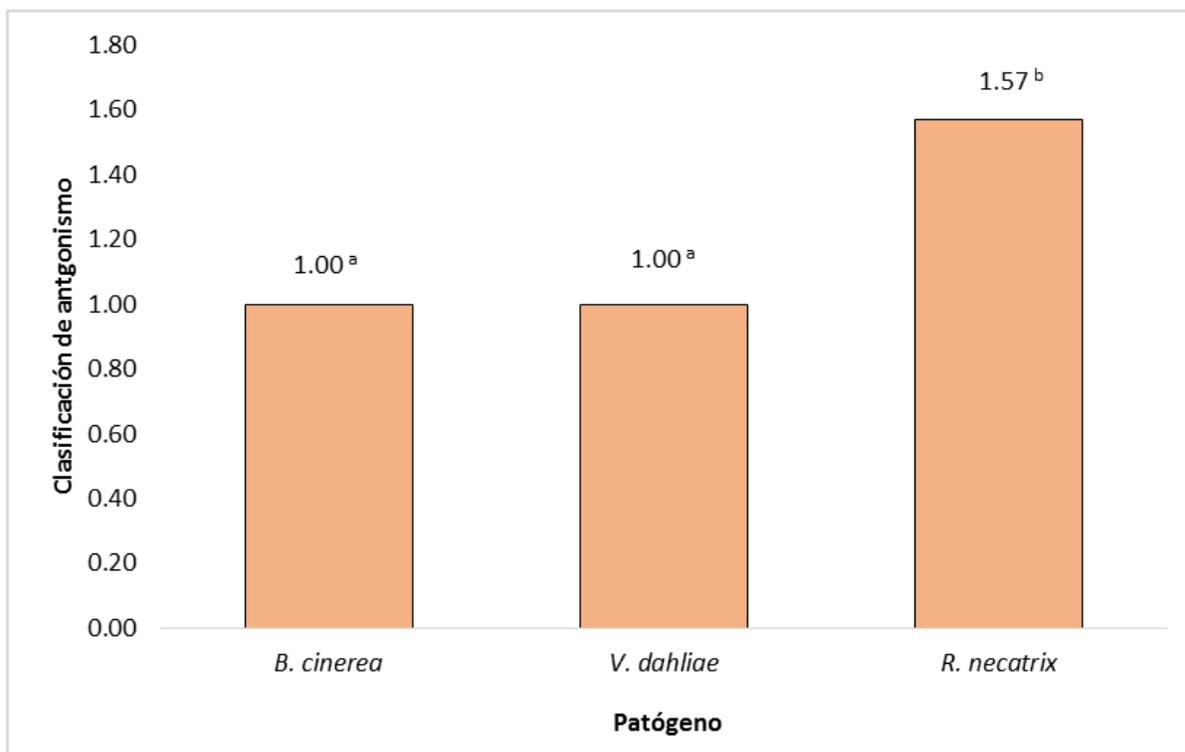


Figura 10. Comparación de medias de la clasificación de antagonismo de la cepa Cut-B confrontado en cultivos duales con *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea*. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P < 0.05$).

La efectividad biológica de la cepa Cut-B, dependió del patógeno con el que se confrontó; de esta forma se registraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), donde la mayor efectividad biológica se presentó con *R. necatrix*, la cual fue de 88.6 %, seguido *V. dahliae* y *B. cinerea* con 65.85 % y 55.43 %, respectivamente (Figura 11).

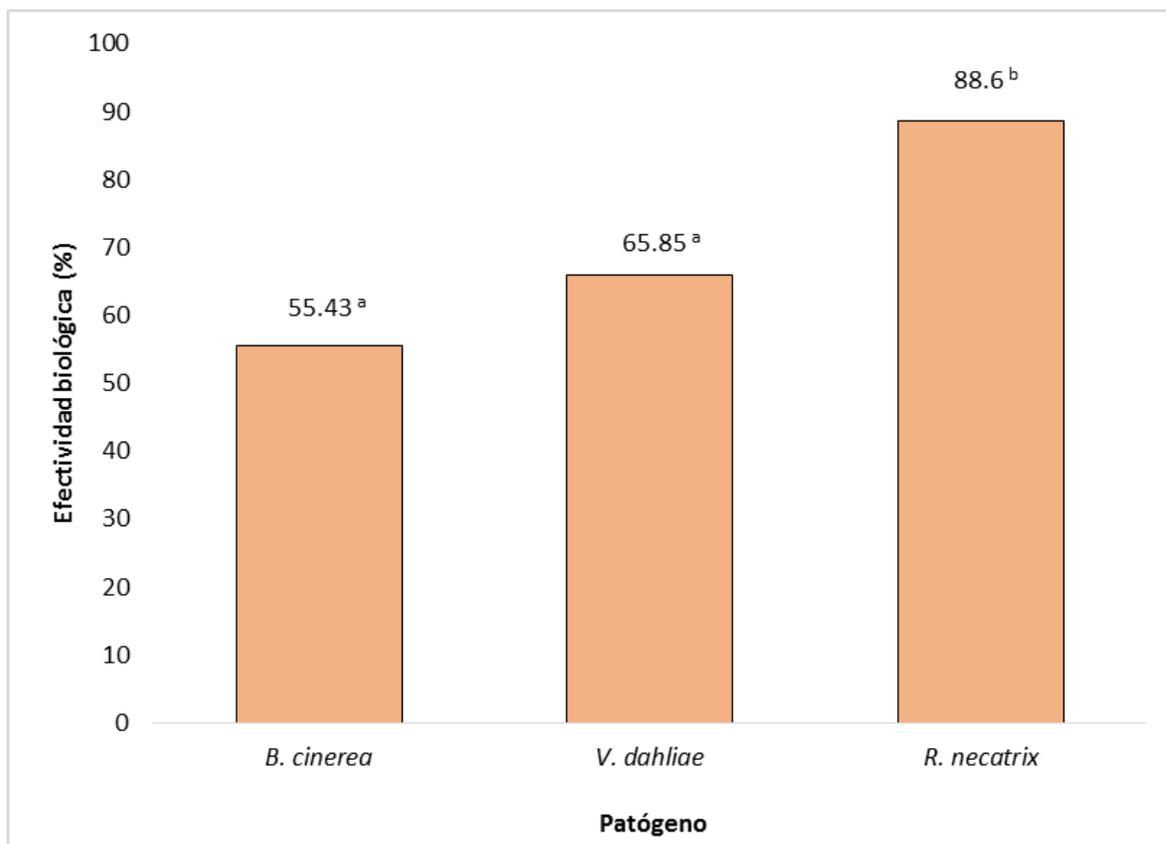


Figura 11. Comparación medias de la efectividad biológica de la cepa Cut-B en cultivos duales con *B. cinerea*, *V. dahliae* y *R. necatrix*. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P < 0.05$).

Al contrastar las características culturales de los tres patógenos en el testigo y en los cultivos duales, estas fueron diferentes. El testigo de *B. cinerea* presentó crecimiento micelial con los bordes color blanco, en el centro se observó textura algodonosa y compacta de color grisáceo; mientras que en confrontación Cut-B se observó coloración café de manera generalizada y compacta (Figura 12).

En cuanto al testigo de *V. dahliae*, algunas repeticiones presentaron crecimiento compacto y algodonoso en el centro, así como desarrollo de microesclerocios que son evidentes debido a la coloración negra, lo cual no se observó en el tratamiento en confrontación con Cut-B (Figura 13). Por su parte, *R. necatrix* al estar en contacto con el antagonista presentó crecimiento compacto color blanco, lo que difiere del testigo, en donde el crecimiento micelial fue blanco, de forma radial, textura compacta y algodonosa en el centro (Figura 14).

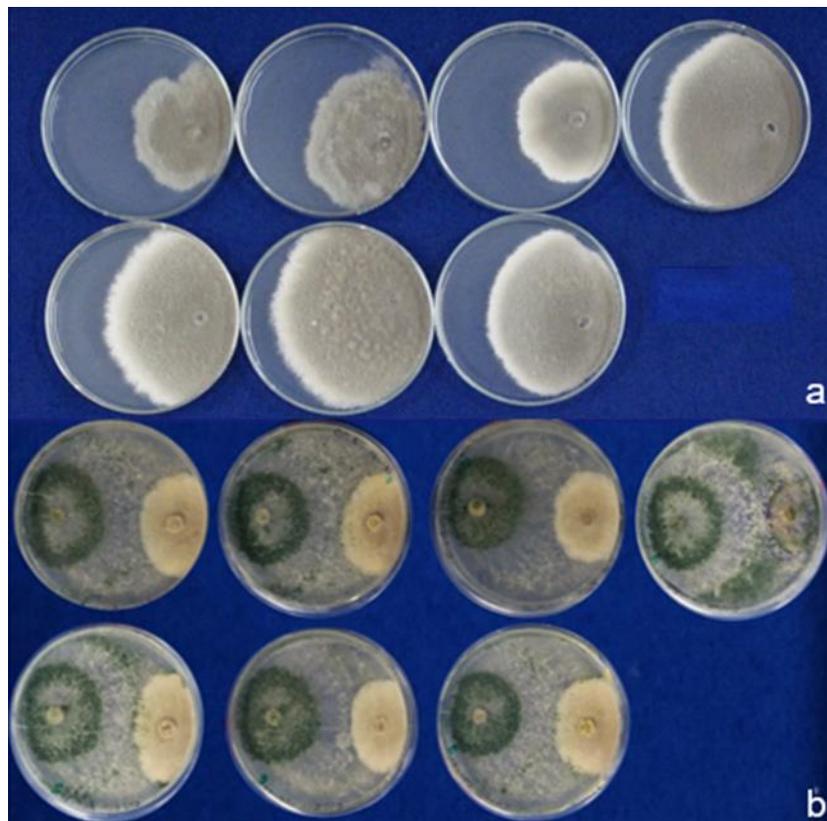


Figura 12. Grado de competencia *T. asperellum* frente a *B. cinerea*. a) Testigo, b) confrontamiento, disco izquierdo corresponde a la cepa Cut-B y el disco derecho a *B. cinerea*.

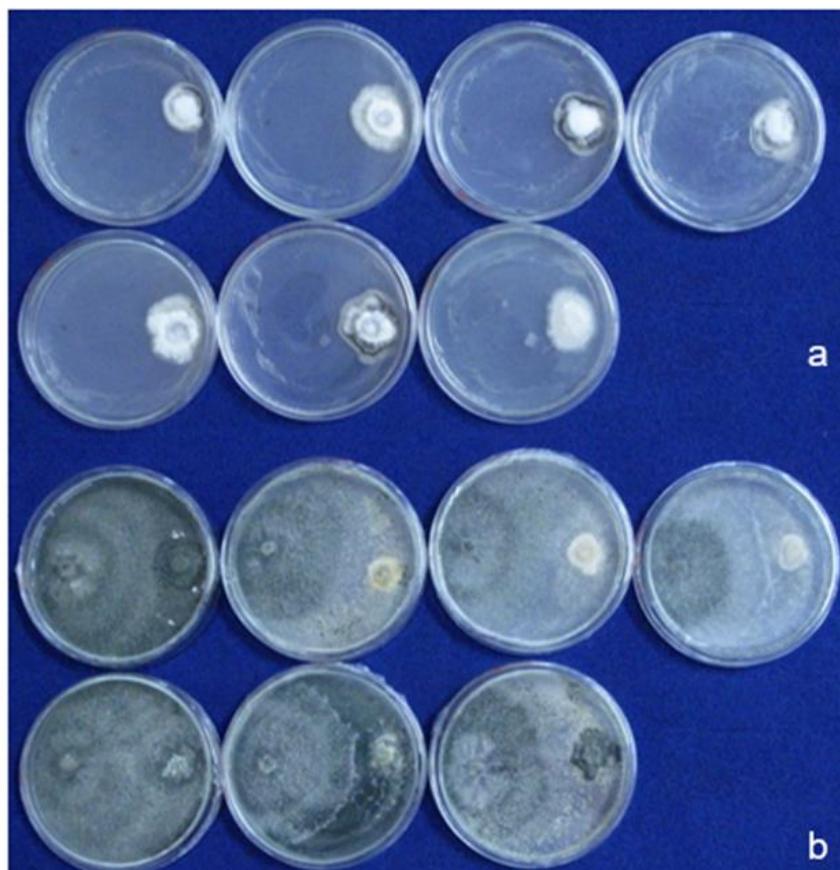


Figura 13. Grado de competencia de *T. asperellum* frente a *V. dahliae*. a) Testigo, b) confrontamiento, disco izquierdo corresponde a la cepa Cut-B y el disco derecho a *V. dahliae*.

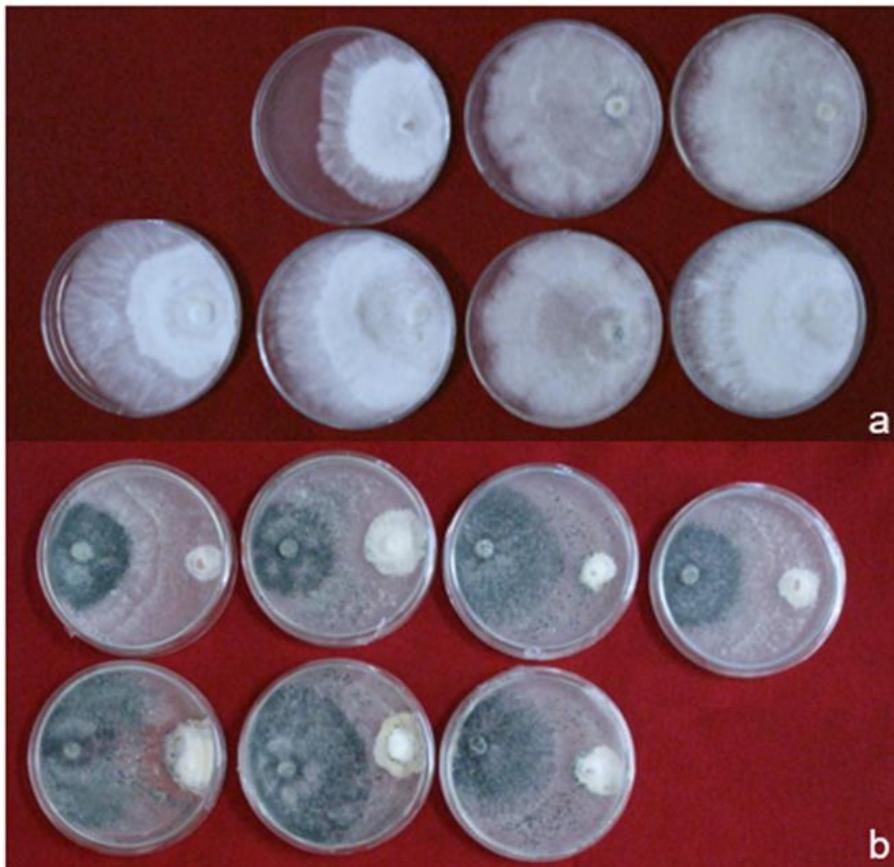


Figura 14. Grado de competencia de *T. asperellum* frente a *R. necatrix*. a) Testigo, b) confrontamiento, disco izquierdo corresponde a la cepa Cut-B y el disco derecho a *R. necatrix*.

7.6.2 Antibiosis por metabolitos volátiles

No se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en la efectividad biológica debida a la antibiosis por metabolitos volátiles de Cut-B frente a los tres fitopatógenos (Figura 15). Es importante hacer énfasis que el crecimiento sí se redujo considerablemente en todos los casos, lo cual se observa en las figuras 17, 18 y 19. En este sentido, la mayor efectividad biológica se presentó sobre *B. cinerea*, la cual fue de 55.19 %, seguido de *R. necatrix* con 34.4 % y por último *V. dahliae* con una efectividad de 31.6 % (Figura 15).

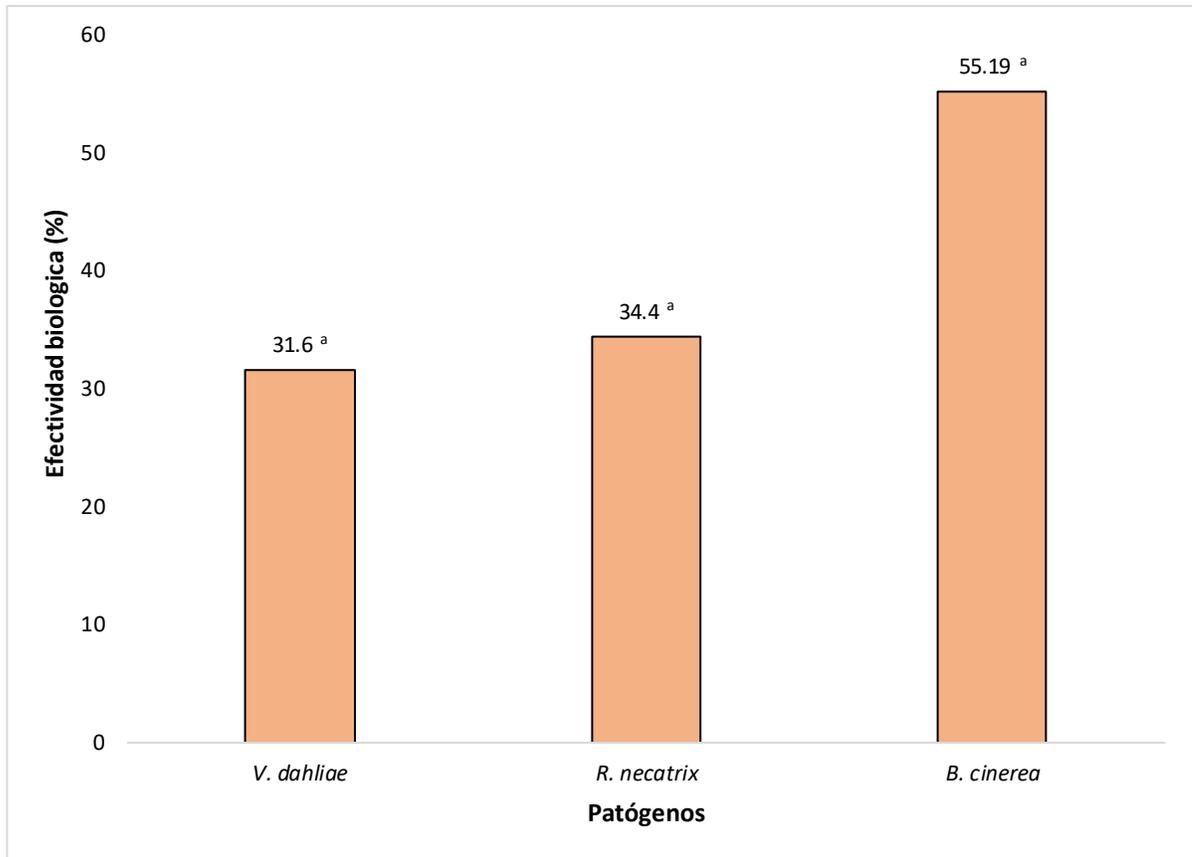


Figura 15. Comparación de medias de la efectividad biológica por efecto de metabolitos volátiles de *T. asperellum* frente a *V. dahliae*, *R. necatrix* y *B. cinerea*. Literales iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P > 0.05$).

Por las características propias de cada fitopatógeno, estos presentaron diferente tasa de crecimiento; en el caso del testigo de *B. cinerea* fue de $3.22 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$, mientras que cuando se sometió a metabolitos volátiles de Cut-B fue de $0.71 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$, lo que representa una disminución de 78 %. En el caso de *R. necatrix* y *V. dahliae* sin la presencia de metabolitos volátiles la tasa de crecimiento fue de $0.76 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ y $0.1 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$, respectivamente, los cuales no registraron variaciones importantes en contraste con los tratamientos con volátiles (Figura 16).

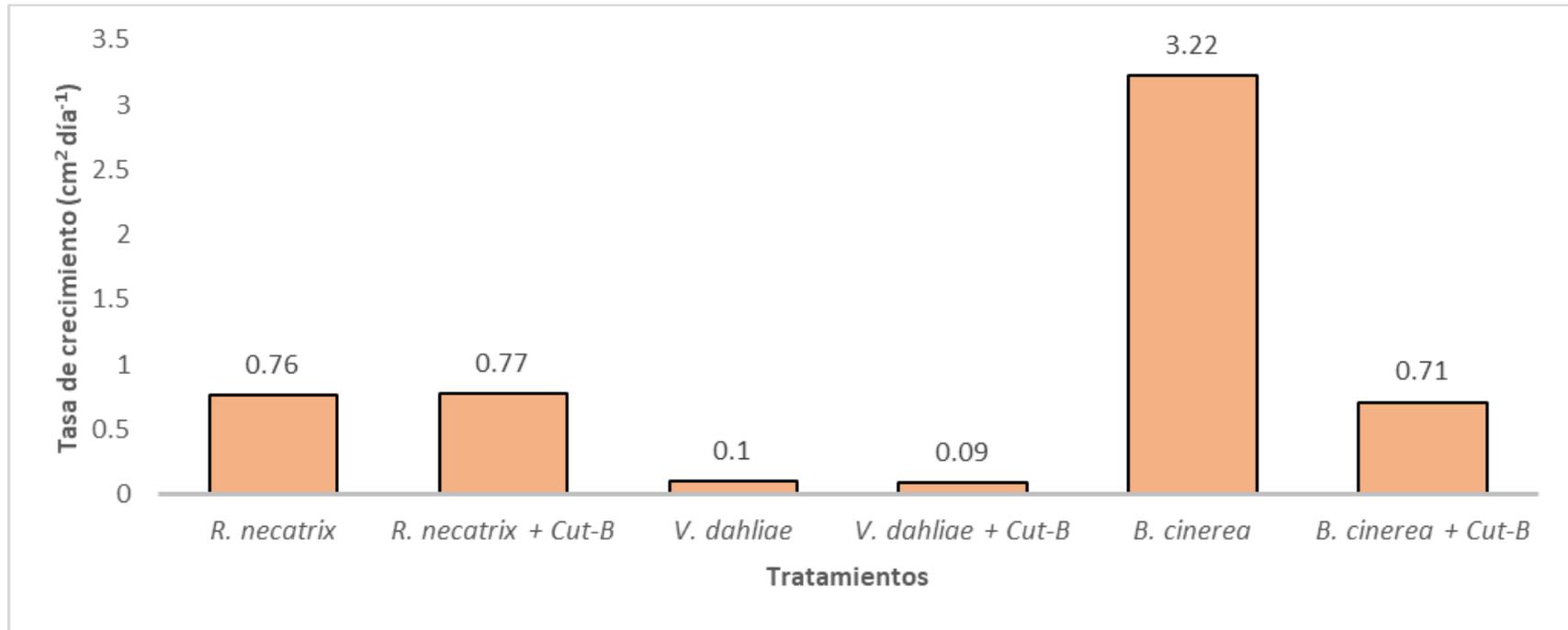


Figura 16. Tasa de crecimiento micelial (cm² día⁻¹) por efecto de metabolitos volátiles de *T. asperellum* en los tratamientos: *R. necatrix*, *R. necatrix* + Cut-B, *V. dahliae*, *V. dahliae* + Cut-B, *B. cinerea* y *B. cinerea* + Cut-B.

El testigo de *B. cinerea* presentó crecimiento micelial algodonoso, grisáceo y compacto, con los bordes blancos; estas características culturales solo se presentaron en pocas repeticiones del tratamiento con la cepa Cut-B (Figura 17). Por otra parte, el crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos volátiles emitidos por la cepa Cut-B es notablemente blanco con textura compacta en el centro en comparación con el tratamiento testigo, en el cual en la mayoría de las repeticiones presentó micelio algodonoso compacto al centro y desarrollo de microesclerocios (Figura 18). *R. necatrix* sin volátiles presentó crecimiento compacto algodonoso y anillado; mientras que, en el tratamiento con volátiles, el crecimiento fue radial y menos algodonoso (Figura 19).

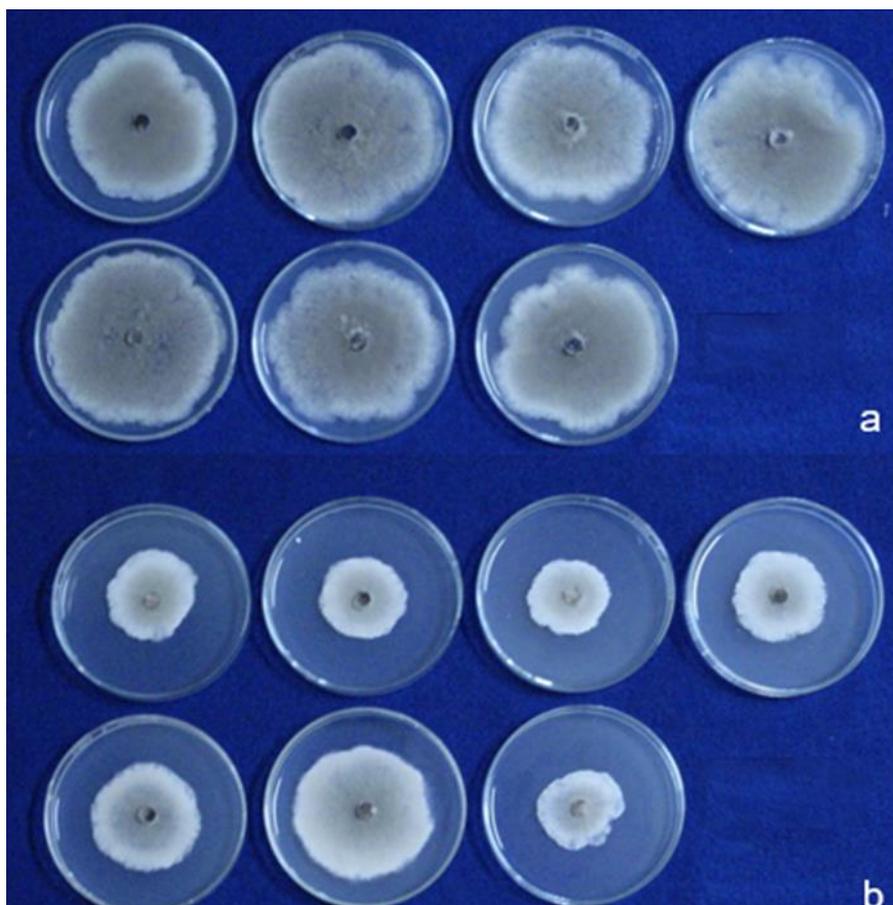


Figura 17. Crecimiento micelial de *B. cinerea* por efecto de metabolitos volátiles de *T. asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B.

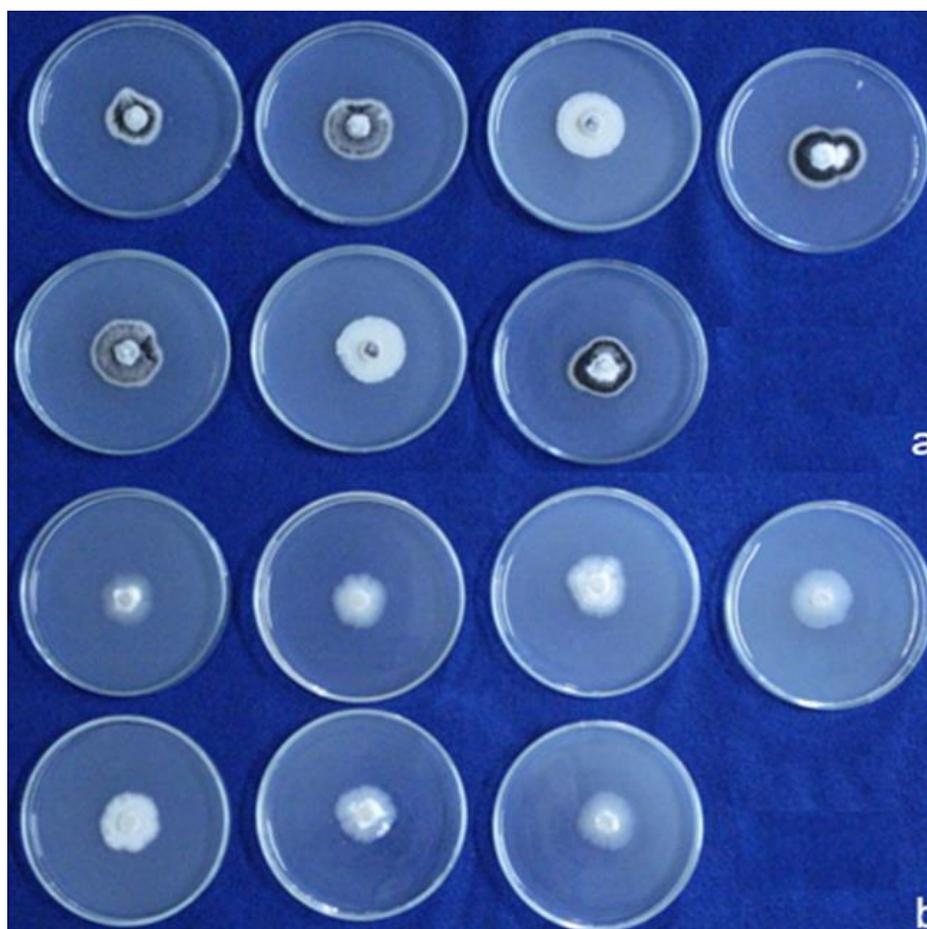


Figura 18. Crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos volátiles de *T. asperellum* a) Testigo, b) Cepa Cut-B.

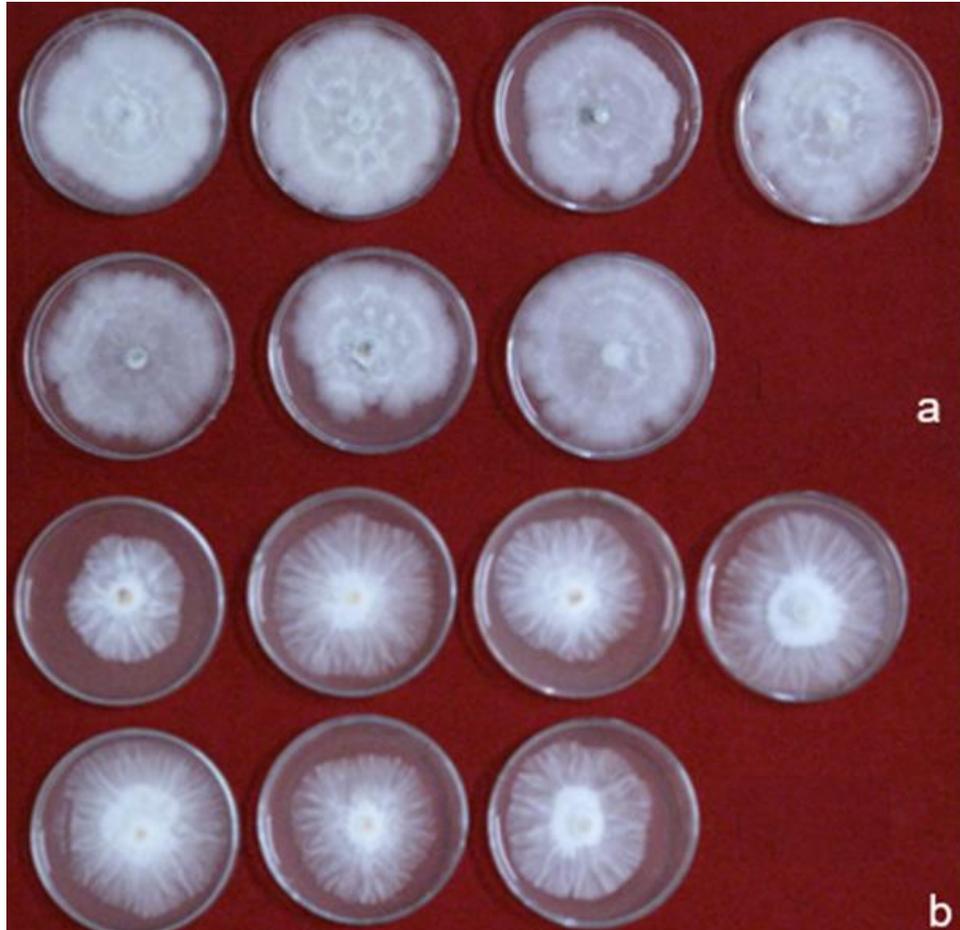


Figura 19. Crecimiento micelial de *R. necatrix* por efecto de metabolitos volátiles de *T. asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B.

7.6.3 Antibiosis por metabolitos no volátiles

De acuerdo con el análisis estadístico, existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en lo que concierne a la efectividad biológica por efecto de metabolitos no volátiles de *Trichoderma* frente a los fitopatógenos. Destaca que, con *B. cinerea* se presentó la mayor efectividad biológica con 28.27 %, en comparación con los demás patógenos en los cuales fue de 10.48 % y 2.24 % para *V. dahliae* y *R. necatrix*, respectivamente (Figura 20).

Con relación a la tasa de crecimiento de los patógenos con y sin metabolitos no volátiles, se observó que solo en el caso del testigo de *V. dahliae* el crecimiento fue mayor en contraste con el tratamiento con tales metabolitos, en los cuales la tasa de crecimiento fue de 0.05 y 0.04 ($\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$), respectivamente. Por el contrario, *R. necatrix* y *B. cinerea* presentaron mayor tasa de crecimiento en presencia de los metabolitos (Figura 21).

Las características culturales de los tres patógenos en el testigo no presentaron diferencias en cuanto a coloración, textura y forma de crecimiento con los metabolitos no volátiles de la cepa Cut-B. De esta forma, *B. cinerea* desarrolló crecimiento micelial compacto con bordes blancos y micelio grisáceo en el centro de la colonia (Figuras 22); *V. dahliae* manifestó crecimiento micelial blanco algodonoso y presencia de microesclerocios (Figura 23) y por su parte, *R. necatrix* mostró crecimiento micelial radial y blanco algodonoso (Figura 24).

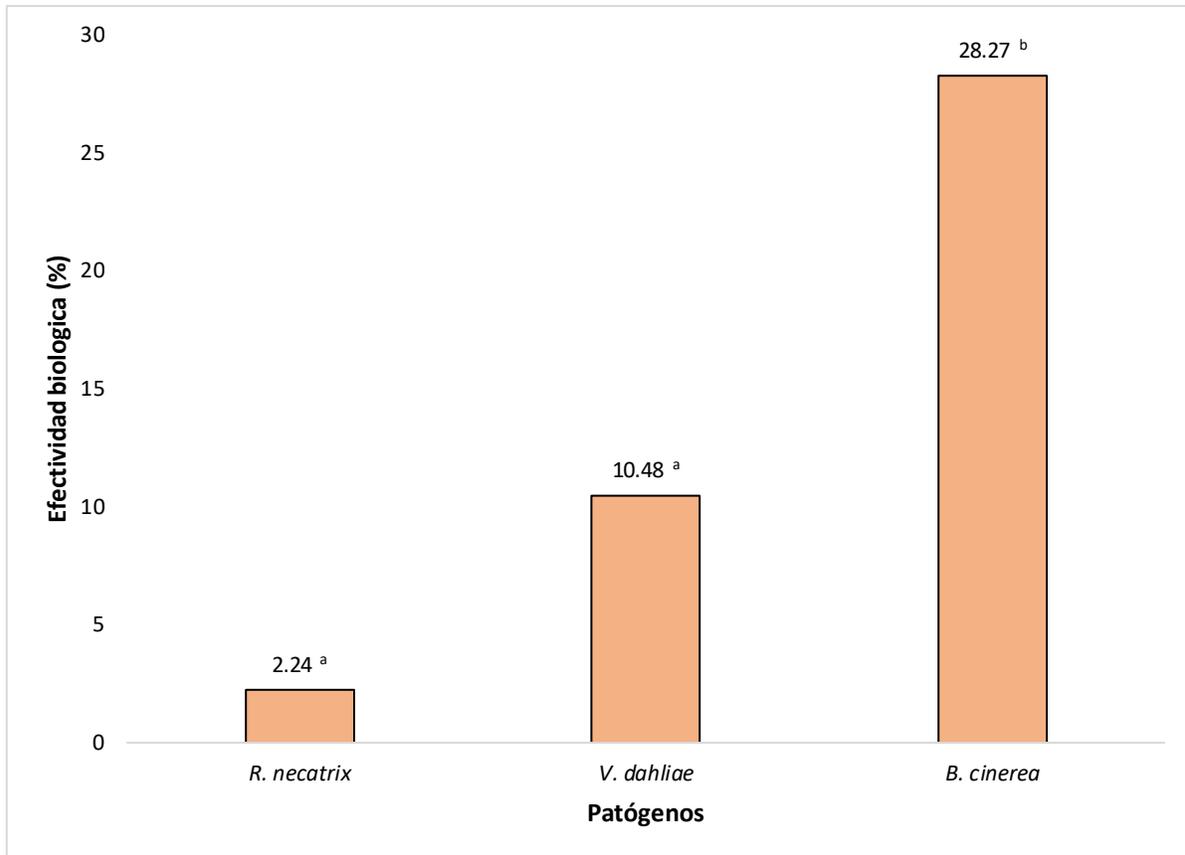


Figura 20. Comparación de medias de la efectividad biológica debida a metabolitos no volátiles de *T. asperellum*. frente a *V. dahliae*, *R. necatrix* y *B. cinerea*. Literales diferentes indican que existen diferencias estadísticas significativas, comparación de medias Tukey ($P < 0.05$).

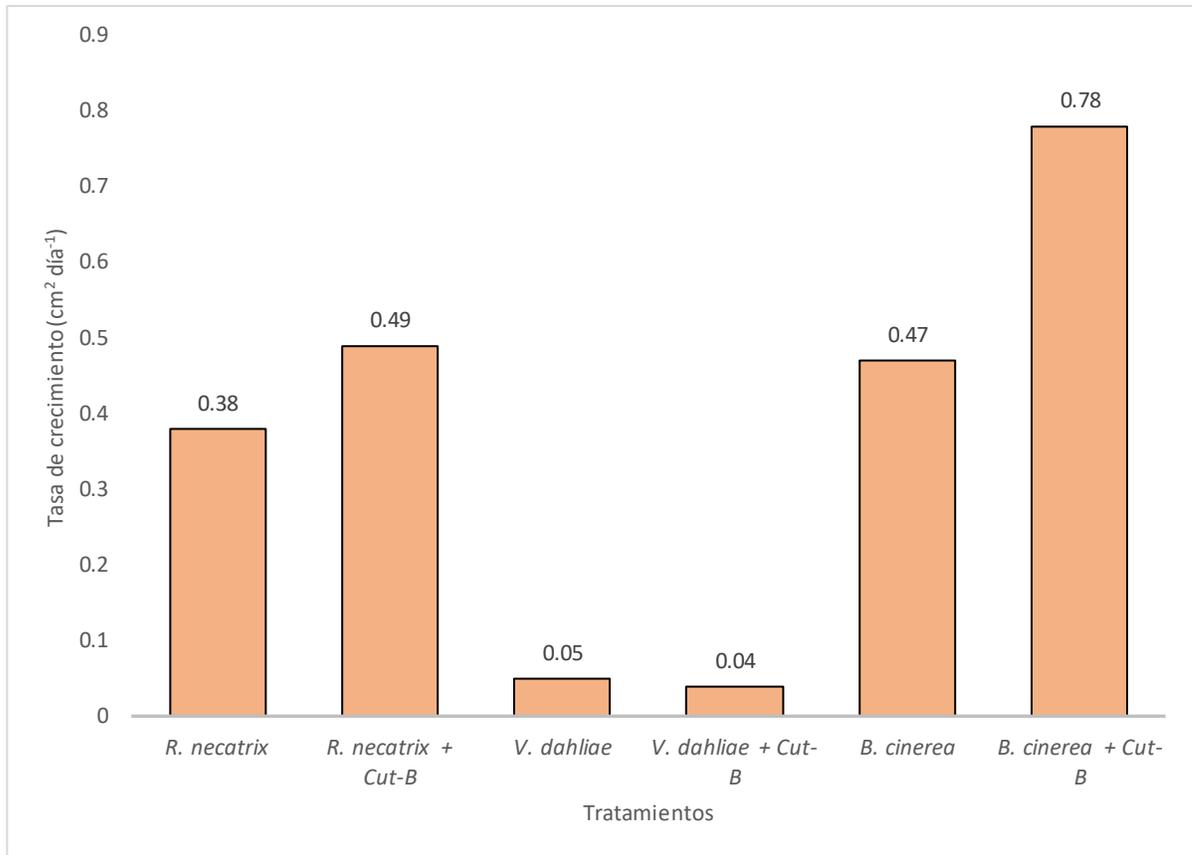


Figura 21. Tasa de crecimiento micelial (cm² día⁻¹) por efecto de metabolitos no volátiles de *T.asperellum* entre los tratamientos: *R. necatrix*, *R. necatrix* + Cut-B, *V dahliae*, *V dahliae* + Cut-B y *B. cinerea*, *B. cinerea* + Cut-B.

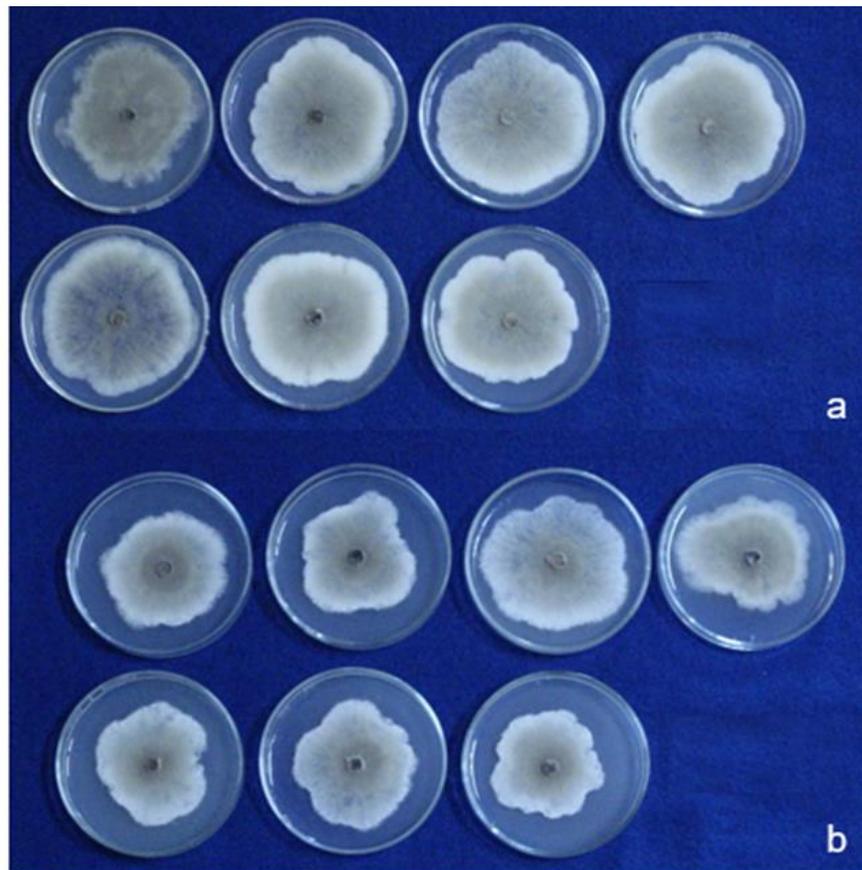


Figura 22. Crecimiento micelial de *B. cinerea* por efecto de metabolitos no volátiles de *T.asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B.

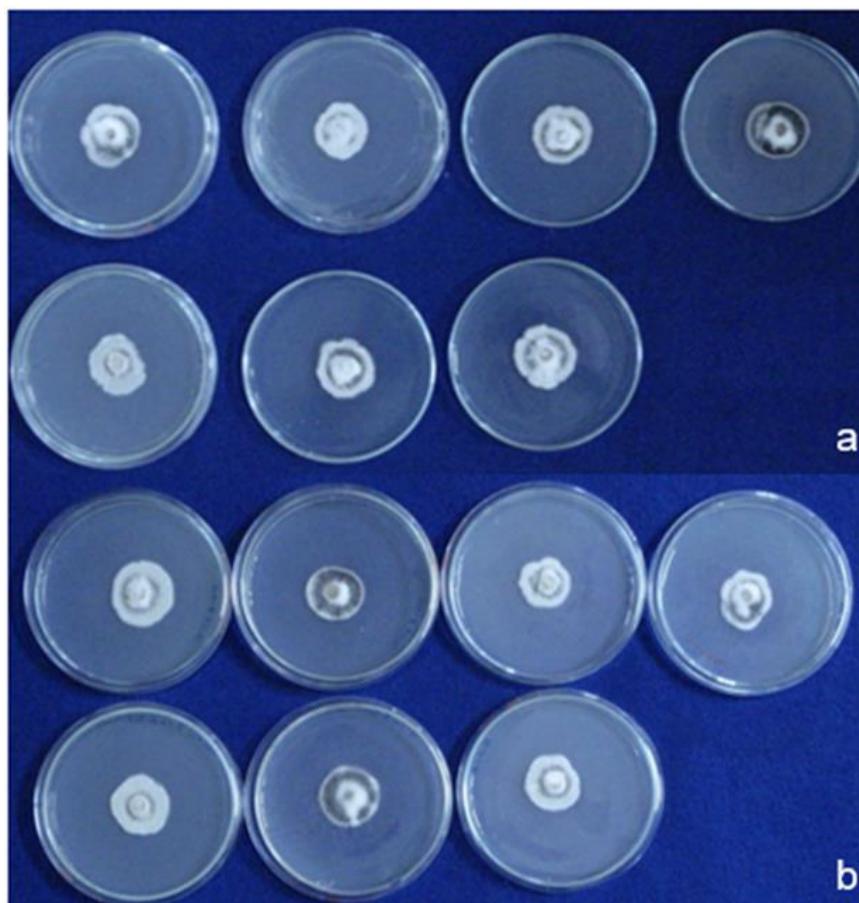


Figura 23. Crecimiento micelial de *V. dahliae* por efecto de metabolitos no volátiles de *T.asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B.

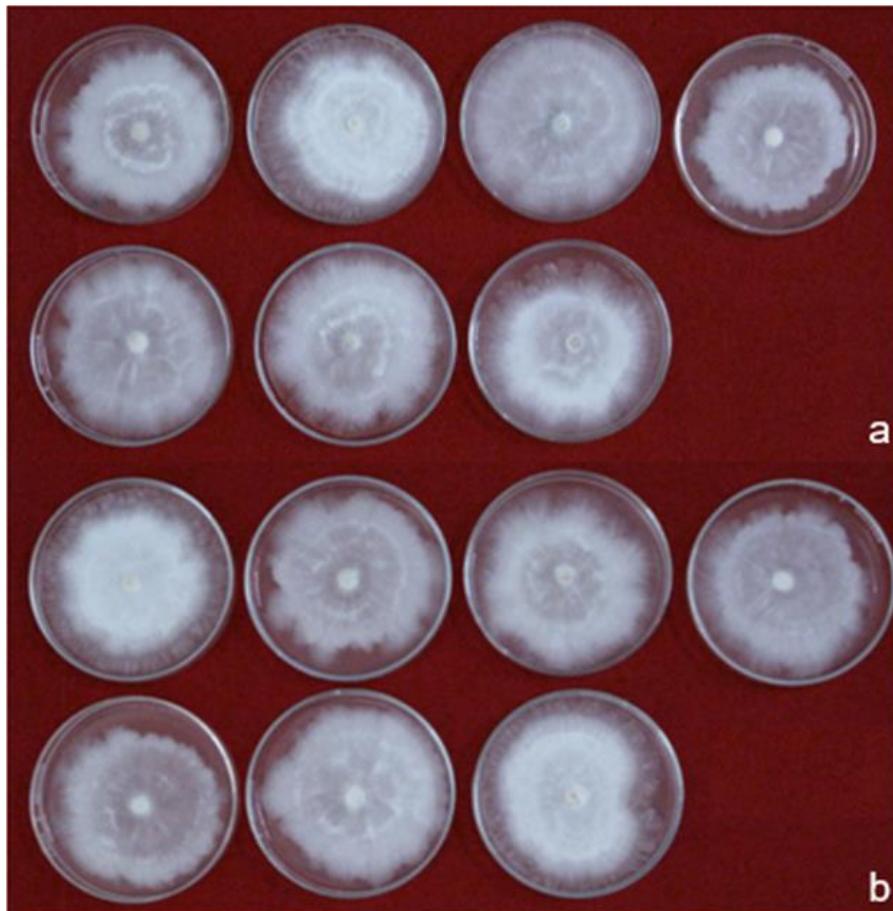


Figura 24. Crecimiento micelial de *R. necatrix* por efecto de metabolitos no volátiles de *T.asperellum*. a) Testigo, b) Cepa Cut-B.

7.6.4 Micoparasitismo

La cepa Cut-B presentó micoparasitismo sobre *B. cinerea*, lo cual fue evidente debido a la estrecha interacción entre ambos. De manera general se observó que Cut-B se adhirió al micelio de *B. cinerea*, también se observó penetración a través de haustorios y enrollamiento del micelio (Figura 25). Cabe destacar, que esto no se observó con *R. necatrix* y *V. dahliae*.

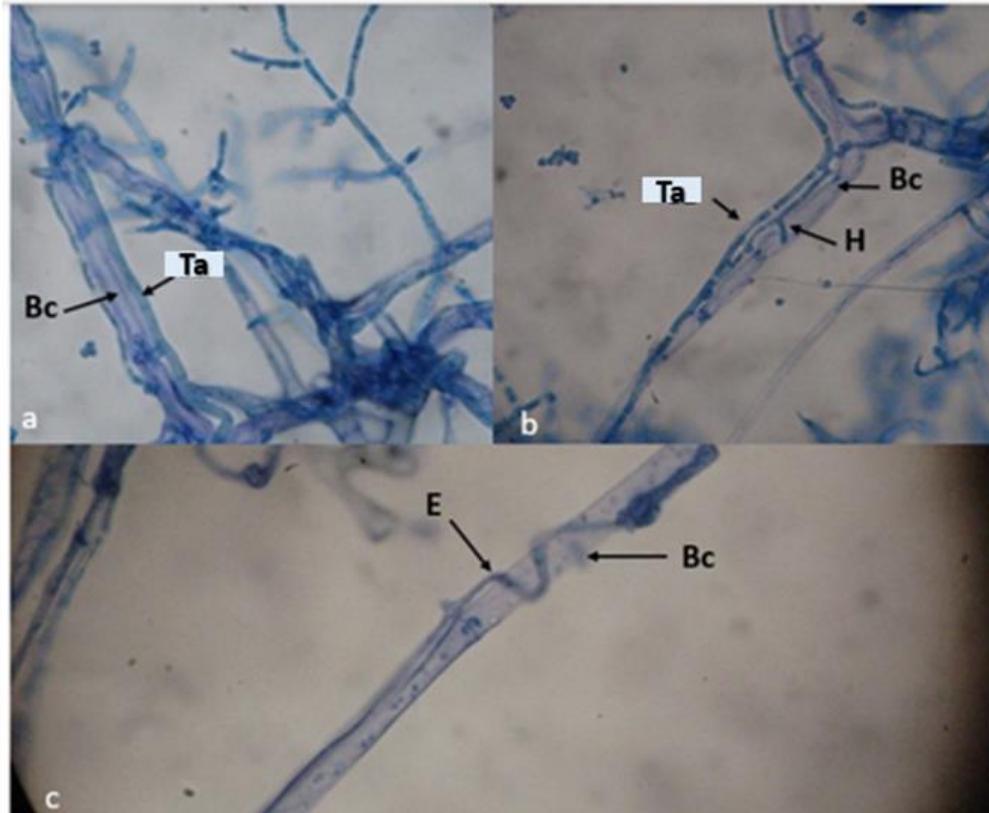


Figura 25. Micoparasitismo de *T. asperellum* sobre *Botrytis cinerea*. a) Adhesión de micelio de *T. asperellum* (Ta) al micelio de *B. cinerea* (Bc). b) Formación de haustorios (H) de *T. asperellum* (Ta) para alimentarse de *B. cinerea* (Bc). c) Enrollamiento (E) de *T. asperellum* al micelio de *B. cinerea*.(Bc).

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo la cepa nativa de *Trichoderma* Cut-B, a partir de suelo cultivado con rosa, bajo condiciones de invernadero en el Centro Universitario UAEM Tenancingo. Esta fue aislada a través de la técnica de diluciones seriadas en medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* (MST) (Askew y Lang, 1993), el cual, entre otros reactivos, está adicionado con captan y pentacloronitrobenzoceno (PCNB) con el objetivo de inhibir el crecimiento micelial de otros hongos. Dicho medio de cultivo ha sido utilizado en diversas investigaciones que tienen como objetivo aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp.; por ejemplo Guigón-López *et al.* (2004) reportan el aislamiento satisfactorio de seis cepas a partir de suelos agrícolas; en contraste Alonso (2020) reporta la obtención de dos cepas a partir de suelos forestales, en MST sin fungicidas, lo cual no se atribuye a la sensibilidad de los mismos a ingredientes activos utilizados en el medio al considerar la interferencia del crecimiento de otros microorganismos en el medio.

En el cultivo de rosa donde se llevó a cabo el muestreo no se han realizado aplicaciones de productos comerciales con *Trichoderma* spp., por lo que se puede asegurar que la cepa aislada es nativa. Esto es de gran relevancia, ya que autores como González *et al.* (1999) y Altieri (1999) coinciden en que es preferible la utilización de agentes de control biológico nativos, ya que se encuentran adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona en donde serán aplicados y, en consecuencia, expresan de manera satisfactoria diversos mecanismos de acción frente a fitopatógenos (Mitidieri, 1988).

De acuerdo con la identificación morfológica y molecular la cepa Cut-B corresponde a *Trichoderma asperellum*, en medio de cultivo PDA presentó conidios de 4.3–1.5 μm (2.6 μm promedio) de largo x 3.3–1.2 μm (2.1 μm en promedio) de ancho y fiálides de 18.1–3.6 μm (9.2 μm en promedio) de largo, 2.7–1.2 μm (1.9 μm en promedio) de grosor en la parte media y 2.1–0.6 μm (1.6 μm en promedio) en la base, lo cual coincide con lo reportado por Barnett y Hunter (1998) para el género *Trichoderma*. En lo que respecta a las características de la especie Samuels *et al.* (1999) reportan que presenta conidios con estructura casi simétrica de 3.7–6.0 x 3.0–

5.0 μm (3.3 μm en promedio) de ancho y fiálides de 7.0-11.5 μm (8.4 μm en promedio) de largo, 3.0-5.5 μm (3.4 μm en promedio) en la parte media y 2.0-3.5 μm (2.2 μm en promedio) en la base; aunque en el presente estudio, las medidas morfológicas difieren, es importante considerar que a pesar las inexactitudes que puedan tener las claves taxonómicas, estas representan la base primaria de identificación (Martínez *et al.*, 2015). En este sentido, es importante señalar que la caracterización de las especies de *Trichoderma* basada en características morfológicas es influida por la plasticidad de caracteres, siendo insuficiente para una correcta identificación y haciendo necesaria la realización de estudios moleculares para tener un diagnóstico con mayor certeza taxonómica (Hermosa *et al.*, 2000), lo cual se realizó en el presente estudio.

En lo que respecta a la efectividad de las especies de *Trichoderma* como agentes de control biológico, es importante enfatizar que esto depende de la cepa, más que de la especie; no obstante, entre las más estudiadas se encuentran *T. asperellum* y *T. harzianum* (Duarte-Leal *et al.*, 2018; Hajieghrari *et al.*, 2008). Por otra parte, Ceballos (2019) señala que la eficiencia de este agente de control biológico varía de una región a otra de acuerdo a sus condiciones ambientales.

En México se han desarrollado estudios relacionados con el potencial de *T. asperellum* frente a diversos patógenos; por ejemplo, Ceballos *et al.* (2022) demostró que bajo condiciones *in vitro*, el antagonista es efectivo contra patógenos de suelo como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*, debido a que existe una disminución en el crecimiento en 60 % a 83 % con respecto al testigo. Por su parte, López *et al.* (2015) reportan que *T. asperellum* es efectiva frente a *Phymatotrichopsis omnivora* (agente causal de la pudrición texana) ya que al enfrentar por medio de cultivos duales al patógeno y antagonista, este mostro tener una alta capacidad antagónica al presentar las clases 1 y 2 de antagonismo contra el patógeno de acuerdo con la escala de Baker & Cook (1974), utilizada por Bell *et al.* (1982). En otros estudios como los realizados por García-Núñez *et al.* (2017) la cepa TX8 aislada de la zona hortícola del Valle de Toluca e identificada como *T. asperellum*, presentó un alto porcentaje de biocontrol frente a

P. infestans y *Sclerotinia* sp., ejerciendo en pruebas de confrontación *in vitro* de antagonistas contra patógenos; un 98 y 88 % de biocontrol, respectivamente. En otros patógenos como *B. cinerea*, *R. solani*, *M. phaseolina* y *P. omnivora*, Guigón-López *et al.* (2010), evidenciaron mediante pruebas de antagonismo *in vitro* por medio de cultivos duales, que las cepas de *T. asperellum*, TC74, T341 y T359, desarrollaron la mayor tasa de crecimiento y mostraron la mayor capacidad antagonista *in vitro* contra los patógenos ya mencionados, como resultado de un sobrecrecimiento del antagonista.

En los bioensayos de competencia bajo condiciones *in vitro*, la cepa Cut-B estableció contacto micelial con *B. cinerea*, *R. necatrix* y *V. dahliae* entre 3-4 días (Figura 9) lo cual coincide con los resultados obtenidos por Alonso (2020) para el caso de *B. cinerea* en donde se reportó un contacto de entre 3-4 días con diferentes cepas de *Trichoderma*, siendo estos diferentes en el caso de *R. necatrix* donde dicha variable dependió de la cepa de *Trichoderma* utilizada.

En cuanto a la clasificación de antagonismo, la confrontación de *B. cinerea* y *V. dahliae* se ubicó en la clase 1 (Cuadro 2, Figura 10), lo que significa que el antagonista creció completamente sobre el patógeno; resultados que coinciden con lo reportado por Alonso (2020) donde las cepas SS1, TA4 y TFR3 presentaron la misma clasificación de antagonismo ante estos fitopatógenos. Sin embargo, es posible observar que para *R. necatrix*, los valores en escala de clasificación en el presente estudio son de 1.57, posicionándose en la clasificación donde *Trichoderma* spp. creció sobre el fitopatógeno 2/3 partes, valores que en contraste con Alonso (2020), dicho patógeno se posicionó en el valor 4 de la escala antes mencionada; por otra parte, y en comparación con otro fitopatógeno, en el estado de Sinaloa, México, López *et al.* (2015), evaluaron por confrontación dual aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *P. omnivora*, obteniendo que todas las cepas se encontraron en las siguientes clases de antagonismo de acuerdo con la escala de Baker & Cook (1974): clase 1, donde *Trichoderma* spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo y clase 2, donde

se indica que *Trichoderma* spp. crece al menos sobre las 2/3 partes de la superficie del medio de cultivo.

Los porcentajes de efectividad biológica por efecto de competencia refieren un porcentaje mayor contra *R. necatrix*, seguido de *V. dahliae* y *B. cinerea*, con un 88.6, 65.85 y 55.43 %, respectivamente (Figura 11). En cuanto al efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp., se presentó efectividad biológica de 55.19 % para *B. cinerea*, seguido de 34.4 % para *R. necatrix* y 31.6 % frente a *V. dahliae* (Figura 15); sin embargo, por influencia de metabolitos no volátiles se observaron valores inferiores al 30 % para los tres patógenos (Figura 20).

La evaluación de la efectividad biológica resulta importante al considerar que autores como Hernández-Melchor *et al.* (2019), mencionan que es necesario fortalecer la investigación básica para identificar y evaluar metabolitos secundarios derivados de las especies de *Trichoderma*, y a la vez, enfocar ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar su efectividad biológica en plantas bajo diferentes condiciones permitiendo validarlos al momento de aplicarlos en ensayos en condiciones de campo.

9. CONCLUSIONES

Se aisló a la cepa Cut-B, que de acuerdo con la identificación morfológica y molecular corresponde a *Trichoderma asperellum*.

En el mecanismo de acción por competencia la efectividad biológica obtenida por dicho mecanismo de acción dependió del fitopatógeno evaluado, alcanzando los mejores resultados con un 88.6% con *R. necatrix*, seguido de *V. dahliae* con 66.5% y *B. cinerea* con 55.43%.

El crecimiento de fitopatógenos se redujo como efecto de los metabolitos volátiles de Cut-B y se mostró un mayor porcentaje de efectividad biológica para *B. cinerea* con 55.19 %.

El efecto de metabolitos no volátiles de Cut-B frente a los patógenos mostró diferencias estadísticas significativas, destacando una mayor efectividad biológica con *B. cinerea* en un 28.27%, continuo de un 10.48% para *V. dahliae* y un 2.24% para *R. necatrix*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, solo fue posible visualizar micoparasitismo de la cepa Cut-B sobre *B. cinerea*, observando que Cut-B se adhirió al micelio de *B. cinerea* y además mostró penetración a través de haustorios y enrollamiento del micelio.

De este modo, se ha podido establecer que la efectividad biológica de la cepa Cut-B fue mayor para el patógeno *B. cinerea*.

10. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. (2004). Fitopatología. Limusa. México. 638 p.
- Altieri A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74(1-3), 19-31.
- Allori, S.E., Yasem, M.G. y Ploper, L.D. (2014). Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del género *Trichoderma*. *Revista agronómica del Noroeste Argentino*, 34(2),197-199.
- Alonso, 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 Tenancingo.
- Araújo, A. E., Maffia L. A., Mizubuti E. S. G., Alfenas A. C., Capdeville, G. y Grossi, J. A. S. 2005. Survival of *Botrytis cinerea* as mycellium in rose crop debris and as sclerotia in soil. *Fitopatología Brasileira*, 30, 516-521.
- Arcos, D. (2011). Obtención y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el biocontrol de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas. Tesis de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Asero, J. y Suquilanda, M. (2007). Evaluación de *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp. en el control de "oidio" (*Sphaeroteca pannosa*) en rosas (*Rosa* sp). variedad Aalsmer Gold. Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central de Ecuador.
- Askew, D.J. y Lang, M.D. (1993). An adapted selective medium for the quatitative isolayion of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, 42(5), 686-690.
- Bañon, A. S., Cifuentes, D., Fernández, J.A. y Benavente-García, A.G. (1993). *Gerbera*, *Lilium*, *Tulipán* y *Rosa*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 250 p.

- Bell, D., Wells, H. y Markaham, C. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Barnett, H. L. y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed). MacMillan Publishing Co. New York, USA.
- Benitez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Camacho, M.D. (2009). Aislamiento de cepas de *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa* sp. en la zona de Villa Guerrero, Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Tenancingo.
- Catalogue of life. (2022). *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. [En línea]. Recuperado el 12 de mayo de 2022 de: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/78XWH>
- Catalogue of life. (2022). *Verticillium dahliae* Kleb. [En línea]. Recuperado el 20 de mayo del 2022 de: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/5B8WW>
- Catalogue of life. (2022). *Botrytis cinerea* Pers. [En línea]. Recuperado el 25 de mayo del 2022 de: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/MQKP>
- Catalogue of life. (2021). *Trichoderma*. [En línea]. Recuperado el 25 de septiembre de 2021 de <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/63W3K>
- Ceballos, A. (2019). Uso de *Trichoderma asperellum* y lombricomposta para el control biológico de hongos de suelo causantes de marchitez en tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot). Tesis de Maestría en fitopatología y medio ambiente. Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis.
- Ceballos, A., Lizárraga, G. J., López, B., Beltrán, H. y Longoria, R. M. (2022). Actividad *in vitro* de *Trichoderma asperellum* para el control biológico de

- fitopatógenos de suelo. Revista Profesional de Sanidad Vegetal, 339, 35-43.
- Chet, I. (1990). Mycoparasitism- recognition, physiology and ecology. 725-733 Pp. In: R, R. Barker and P. E. Dunn (eds). New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases. Alan Liss, New York, U. S. A.
- Chet, I. y Benhamou, S. H. (1998). Mycoparasitism and lectin enzymes. 153-152. In: Harman, G. E. y Kubice, C. P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor and Francis Ltd., London, U. K.
- Cholango, L.P. (2009). Selección de cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro* para el control de problemas radiculares en flores de verano. Tesis de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Dahal, S. (2013). Postharvest handling of cut flower rose. Department of Horticulture, Institute of Agriculture and Animal Sciences (IAAS). Rampur, Chitwan, Nepal. 24 p
- Denisse, C. y Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: I. Production of volatile antibiotics. Transaction of the British Mycological Society, 57 (1), 25-39.
- DGSV-CNRF. (2014). Marchitez por *Verticillium*, *Verticillium dahliae*. Dirección General de Sanidad Vegetal- Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha Técnica. México, Distrito Federal. 16 p.
- Díaz, J. (1994). Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.
- Domínguez, G. (2008). *Rosellinia necatrix* Prill. Asociado a la pudrición blanca de la raíz en *Rosa* sp. y su evaluación a sensibilidad de fungicidas en la zona de Villa Guerrero, Estado de México. Tesis de licenciatura.

Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo.

Domínguez, G. (2012). Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium* spp. en jitomate cultivado en suelo bajo invernadero en Morelos, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México.

Duarte-Leal, Y., Pozo-Martínez, L. y Martínez-Coca, B. (2018). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislados de *Fusarium* spp. Revista de Protección Vegetal, 33 (1), 1-10.

Durman, S., Menendez, A., y Godeas, A. (1999). Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* *in vitro* y como biocontrolador de *damping-off* de plantas de tomate en invernadero. Revista Argentina de Microbiología, 31, 13-18.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. y Hennies, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology, 73(1), 85-88.

Elad, Y., Chet, I. y Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology, 28, 719-725

Farr, D.F. y Rossman, A. Y. (2014). Fungal databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA.

García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, A. R., Hermosa-Prieto, M.R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J, y González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología, 35(1), 58-79.

García-Velasco, R., González-Díaz, J., Domínguez-Arizmendi, G., Ayala-Escobar, V. y Aguilar-Medel, S. (2012). *Rosellinia necatrix* sp. y su

evaluación a sensibilidad de Fungicidas. Revista Chapingo Serie Horticultura, 18(1), 39-54

García-Velasco, R., Domínguez-Arizmendi, G., Chavarro-Carrero E. A. y Mora Herrera, M. E. (2017). Pathogenicity of *Verticillium dahliae* Klebahn in rootstock rose cv. Manetti. APS. Annual Meeting, August 5-9. San Antonio, Texas.

González, S.C.H., Rodríguez, L.L., Arjona, C., Puertas, A. y Fonseca, M. (1999). Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizósfera de Solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. Investigación Agraria Producción y Protección Vegetales, 14(1-2), 297-306

Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología, 28(2), 87-96.

Guigón-López, C. y González-González, P. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología, 22(1), 117-124.

Hajieghrari, B., Torabi-Gciglou, M. y Reza-Mohamadi, M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology, 7(8), 697-972.

Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., DiPietro, A., Peterbauer, C. y Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology, 83(3), 313-318.

- Haram, S., Schickler, H., Oppenheim, A. y Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9), 980-985.
- Harman, G. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *The American Phytopathological Society*, 84(4), 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. y Lonto, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plants symbionts. *Microbiology*, 2, 43-56.
- Hermosa, R., Grondona, I., Iturriaga, E., Díaz, M., Castro, C., Monte, E. y García, A. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1890-1898.
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 35(1), 98-112.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10
- Infante, D. Martínez, B. González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- Jang, S., Jang, Y., Kim, C., Lee, H., Hong, J., Heo, Y., Lee, Y., Lee, D., Burm, H. y Kim, J. (2017). Five New Records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale* and *T. tomentosum*. *Mycobiology*, 45(1), 1-8.
- Jara, A. M. (2014). Evaluación de *Trichoderma harzianum* como propuesta alternativa al uso de sustancias químicas sintéticas para el control de

- Botrytis* sp. en el cultivo de rosas (*Rosa* sp.) variedad Aubade en la finca florícola Valle Verde, Cayambe, 2012. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito.
- Kenneth, H. y Cloyd, A. (2007). Compendium of Rose Diseases and Pests. Infectious Disease. USA: APS. 2-40 p
- Kulshrestha, S., Attri, C, Sharma, M, Sharma, A, Mahajan, R. y Chauhan, A. (2014). Biology and Control of *Rosellinia necatrix* causing White Root Rot Disease: A Review. Journal of Pure and Applied Microbiology, 8, 1803-1814.
- Lorenzo, N. (2001). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis de Maestría. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- López, A. N. (2019). Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. FR. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Tenancingo.
- López, B.E, Armenta, A.D, Hernández, S, Apodaca, M. A, Samaniego, J. A, Leyva, K. Y. y Valdez, A. (2015). Selección *in vitro* e identificación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos para el control de *Phymatotrichopsis omnívora*. Revista para la información técnica económica agraria, 111(4), 310-325.
- López, F.J., Núñez, D. y Blanco, M.A. (2003). Aislamiento de *Verticillium dahliae* de suelo y caracterización morfológica de sus microesclerocios. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, 29 (4), 613-626.
- Manocha, M. 1991. Handbook of applied mycology I: Soil and Plants. In: Arora, D. K., Rai Mukerji, K., y Knudsen, G. (Eds). Physiology and biochemistry of biotrophic mycoparasitism. Merced-Dekker, Inc. New York, U. S. A. pp 273-300.

- Manzanos-Ayala, D., López-Aguilar, N., Domínguez-Arizmendi, G. y García-Velasco, R. (2019). Efectividad *in vitro* de tiabendazol frente a *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 29.
- Martínez, B., Infante, D. y Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista Protección Vegetal*, 30, 11-22.
- Martínez B., Infante D. y Reyes Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Martínez, V. (2020). Efectividad de *Trichoderma* spp. sobre *Puccinia horiana* y respuesta en el crecimiento de *Chrysanthemum morifolium* Var. Delano. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Tenancingo.
- Mendoza, Z. C. y A. González. (1993). Enfermedades del Rosal en México. Primera Edición. Universidad Autónoma de Chapingo México, 62 p.
- Mendoza, Z. C. 2002. Fungicida en Ornamentales. Pp. 119-147. *In*: Bautista, M. N. j. Alvarado; J. C. Chavarin y H. Sánchez. (eds.). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. 237 p.
- Mitidieri L. (1988). Control biológico de hongos de suelo con *Trichoderma in vitro*. IDIA. p. 45-49.
- Mohammed, E., Pérez, C., Sid, A., Requena, M. E., y Candela, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de biología*, 26, 35-45.
- Moschini, R.C., Martínez, M.I, Sepulcri, M.G. (2013). Sistemas de pronóstico de enfermedades. Capítulo XXI. Pág. 409-441. En "Agrometeorología". Editores: Guillermo Murphy y Rafael H. Hurtado. Segunda Edición.
- Morandi, M. A. B., Maffia. L.A., Mizubuti E. S. G., Alfenas, A. C. y Barbosa J. G. (2003). Suppression of *Botrytis cinerea* on rose debris: a valuable

component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological control*, 26(3), 311-317.

Ortega. G. J. G. (2010). Diagnóstico de hongos fitopatógenos de jitomate y efecto de *Trichoderma asperellum* Tc74 sobre *Fusarium* spp. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.

Paredes, E. J.E., Carrillo, F. J.A., Sañudo, B. J.A., Allende, M. R. y García, E. R. S. (2011). Enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp. y su correlación con la inhibición *in vitro* de patógenos causantes de la pudrición de la raíz del Garbanzo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29 (11), 73-75.

Paez, M.E., y Sanabria de Albarrán, N. (2007). Evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Revista Facultad de Agronomía*, 24 (1), 27-31.

Pérez, N. (2004). Manejo ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 p.

Quinche, G.O. 2010. Control de *Botrytis* (*Botrytis cinerea*) y Mildiu veloso (*Peronospora sparsa*) en el cultivo de Rosa (*Rosa* sp. Variedad forever Young) mediante el uso de *Trichoderma harzianum* Rifai. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Politécnica de Chimborazo.

Ramírez-Gama R. M., Urzúa H. M. C., Camacho C. A., Tsuzuki R. G., y Esquivel-Cote R. (2015). Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. Editorial Trillas. México. 375 p.

Rodríguez, A. P. (2019). Compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal sobre el hongo benéfico *Trichoderma harzianum*, controlador de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Bogotá.

- Rollán, M. Nico, A.I y Monaco, C. (1999). Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de "*Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfsii*. Investigación agraria. Producción y protección vegetales, 14(1-2), 33-48.
- Rojas, G. (2020). Sensibilidad *in vitro* de cinco aislados de *Trichoderma* spp., a fungicidas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario Tenancingo
- Ruano- Rosa, D. y López-Herrera, C. J. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. As biocontrol agents against avocado white root rot. Biological Control 51, 66-71
- Ruiz, R. A. (2010). Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum*- *Sclerotium rolfsii*. Yautepec, Morelos. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional -Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.
- Samaniego-Fernández, L.M., Harouna, M., Rondón-Castillo, A.J., y Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. Protección vegetal, 33 (3).
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological research, 100, 923-935
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E., y Nirenberg, H. I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. Sydowia 51, 71–88.
- Sandoval, I., y López, M. (2002). Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol. Fitosanidad, 4, 69-72.
- Schuster, A., y Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 787-799.

- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, MA., Oliveira, E., y Trillas I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, P. 3943–3952.
- Sharma P., Sharma M., Raja M. y Shanmugam V. (2014). Status of *Trichoderma* research in India: A review. *Indian Phytopathol*, 67(1), 1-19.
- Shoresh, M., Harman, G., y Mastouri, F. (2010). Induce systematic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Phytopathol*, 48, 21-43.
- Sinuoco, D., Pérez, A., y Moreno, N. (2017). Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19.
- Stefanova, M. (2006). Aplicación de *Trichoderma* y otros antagonistas. *Fitosanidad*, 10(2), 151–163.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga. L., y Coronado, M.F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)*, 16, 509-516.
- SIAP [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera]. (2022). Anuario estadístico de la producción agrícola. [En línea]. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tlapal, B. B.y C. Mendoza. 2002. Enfermedades de origen fungoso en ornamentales. pp 97-118. *In*: Bautista, M. N., J. Alvarado., J. C. Chavarín., H. Sánchez (eds). *Manejo Fitosanitario de Ornamentales*. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 237 p.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras,N., Cappello-García, S., y De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del

estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 86, 947-961.

Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. American Society for Microbiology: Applied and Environmental Microbiology, 65(3), 1061-1070.

Yong A. 2004. El cultivo del rosal y su propagación. Cultivos Tropicales, 25(2), 53-67.

Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., y Valéro, J. R. (2007). Antagonist fungi *Trichoderma* spp. Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37, 1-20.

Viena, J. F. (2015). Control biológico de *Verticillium dahliae* patógeno de cacao (*Theobroma cacao*), con aislamientos de *Trichoderma* spp endófito. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto. Perú.

Vinuela, E. (2011). La importancia de la compatibilidad de enemigos naturales y plaguicidas en los modernos sistemas productivos. SICONBIOL, Simpósio de Control Biológico. 1(12), 84–88.

Windham, M.T., Elod, Y., y Baker, R. (1989). Effects of *Trichoderma* spp. on Maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease, 73, 493-498.