

Antagonismo *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea* en el Estado de México

Rómulo García-Velasco^{1*} , Anahid Alonso-Bahena¹ , Grisel Domínguez-Arizmendi¹ , Sotero Aguilar-Medel¹ , Martha E. Mora-Herrera¹ , Barbarita Companioni-González² .

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, Tenancingo, Estado de México, México. ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. *Correo electrónico: rgarciave@uaemex.mx

RESUMEN

La *Rosa* sp., constituye un rubro de alta demanda mundial. En México, representa una de las ornamentales de mayor exportación; sin embargo, *Verticillium dahliae* Kleb., y *Botrytis cinerea* Pers., se encuentran entre los principales hongos fitopatógenos que afectan los rendimientos y la calidad del producto final en el cultivo. En el siguiente trabajo se determinó el antagonismo *in vitro*, realizado por cepas nativas de *Trichoderma* spp. procedentes del Estado de México, contra *V. dahliae* y *B. cinerea*. Las cepas de *Trichoderma* spp. en estudio se sembraron en el medio de cultivo PDA. Después de siete días del proceso de crecimiento e incubación de los hongos fitopatógenos se procedió a determinar los mecanismos de acción *in vitro* del antagonista. Las cepas de *Trichoderma* spp. ensayadas *in vitro*, mostraron antagonismo contra *V. dahliae* y *B. cinerea*; en consecuencia, promisorias para su utilización en un programa de control biológico en el Estado de México.

Palabras clave: control biológico, patógenos, *Rosa* sp.

In vitro antagonism of native strains of *Trichoderma* spp. against *Verticillium dahliae* and *Botrytis cinerea* in the State of Mexico

ABSTRACT

The *Rosa* sp., is an item of high worldwide demand. In Mexico, it represents one of the most exported ornamentals; however, *Verticillium dahliae* Kleb., and *Botrytis cinerea* Pers., are among the main phytopathogenic fungi that affect the yields and the quality of the final product in the crop. In the following work, the *in vitro* antagonism was determined, carried out by native strains of *Trichoderma* spp. from the State of Mexico, against *V. dahliae* and *B. cinerea*. Strains of *Trichoderma* spp. under study, they were sown in the PDA culture medium. After seven days of the growth and incubation process of the phytopathogenic fungi, the *in vitro* action mechanisms of the antagonist were determined. Strains of *Trichoderma* spp. tested *in vitro*, they showed antagonism against *V. dahliae* and *B. cinerea*; consequently, promising for use in a biological control program in the State of Mexico.

Key words: Biological control, pathogens, *Rosa* sp.

INTRODUCCION

El sector florícola posee una de las industrias más fuertes en muchos países desarrollados y en vías de desarrollo. El cultivo de *Rosa* sp. constituye el producto ornamental de mayor demanda a nivel mundial (Mackay *et al.* 2020). En México, la *Rosa* sp. representa uno de los principales ornamentales que se exporta. En el año 2018, su valor fue de 6.548.916 USD. El Estado de México es el principal productor de *Rosa* sp. en el país (SIAVI 2019). Las mayores producciones en el cultivo se localizan en la región sur del estado, que incluye los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas (SIAP 2018).

Por otro lado, las enfermedades representan uno de los problemas más serios para la producción de este cultivo. *Verticillium dahliae* Kleb. y *Botrytis cinerea* Pers., se encuentran entre los principales hongos fitopatógenos que afectan los rendimientos y la calidad del producto final en el cultivo. Estos agentes patógenos ocasionan las enfermedades como la marchitez de la planta y el moho gris de la flor, respectivamente (García-Velasco *et al.* 2012, 2017). *V. dahliae* afecta al cultivo de *Rosa* sp. cuando este se establece en zonas donde previamente se desarrolló algún otro cultivo susceptible, tales como frutales u hortalizas.

Los principales síntomas ocasionados por la enfermedad se observan en la marchitez de las hojas jóvenes y amarillamiento en las hojas inferiores. Posteriormente, se produce marchitez total en la planta. Las hojas presentan un color amarillo que finalmente se tornan a color marrón a medida que se marchitan y mueren. El fitopatógeno puede sobrevivir en el suelo por largos períodos de tiempo (Kenneth y Cloyd 2007). Los daños ocasionados por *B. cinerea* en el cultivo no ocurren en condiciones de campo y si en el almacenamiento o durante el transporte. Dentro de los principales síntomas que produce este fitopatógeno se encuentran la presencia de pequeñas manchas marrones en los pétalos, siendo que, las puntas o los lados se vuelven marrones y suaves. Estos síntomas son obvios en los cultivares de *Rosa* sp. con flores blancas (Kenneth y Cloyd 2007, García-Velasco *et al.* 2017).

El principal método de manejo que se utiliza para estas enfermedades lo constituye el control químico; aunque, en la región florícola se ha demostrado la pérdida de sensibilidad a algunos fungicidas

–tiabendazol, procloraz e iprodiona– (Camacho 2009); y se ha desarrollado resistencia a tiabendazol (López 2019, Manzanos *et al.* 2019).

Por tal motivo, es necesario la búsqueda de alternativas para lograr la producción sostenible en el cultivo de *Rosa* sp. de forma sana y segura para la región florícola. En este sentido, la utilización de microorganismos para el manejo de plagas y enfermedades constituye una alternativa viable para asegurar la producción en el cultivo de forma sana. *Trichoderma* se considera como uno de los antagonistas de hongos fitopatógenos más utilizado en la agricultura moderna sustentable (Youssef *et al.* 2016, Pineda-Insuasti *et al.* 2017).

A pesar de que su capacidad como antagonista es altamente variable. *Trichoderma* spp., tiene potencial como agente de control biológico contra diversos fitopatógenos fúngicos. Los mecanismos antagónicos dependen de la cepa de *Trichoderma* spp., así como del fitopatógeno, de la planta; y de las condiciones ambientales que incluye la disponibilidad de nutrientes, el pH y la temperatura. La activación de cada mecanismo implica la producción de compuestos y metabolitos específicos (Benítez *et al.* 2004, Martínez *et al.* 2008). Por lo tanto, el éxito en la formulación y comercialización de biopreparados fúngicos mediante la industria biotecnológica para su aplicación en la agricultura requiere de estudios previos en la selección de aislamientos promisorios para el control y del conocimiento de los mecanismos de acción relacionados con dicho control (Pineda-Insuasti *et al.* 2017).

En trabajos previos, García-Velasco *et al.* (2021) obtuvieron dos cepas nativas *Trichoderma tomentosum* (SS1-6) y *Trichoderma barbatum* (SS2-5) que mostraron ser promisorias para su utilización en el control biológico de *Rosellinia necatrix* Prill., en el cultivo de *Rosa* sp., en la región sur del Estado de México.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el antagonismo *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. del Estado de México contra *V. dahliae* y *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Cepas nativas *Trichoderma* spp.

En la experimentación se utilizaron las cepas nativas de *T. tomentosum* (SS1-6) y *T. barbatum* (SS2-5), identificadas en trabajos anteriores por García-Velasco *et al.* (2021); también se usaron, las cepas de *T. asperellum* Samuels (TFR3) y la cepa de *T. harzianum* Rifai (TA4). Estas últimas fueron identificadas y proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario de Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Determinación de los mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra los hongos fitopatógenos *V. dahliae* y *B. cinerea*

Cepas patogénicas

Las cepas patogénicas *V. dahliae* de y *B. cinerea* proceden del cepario del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario de Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, México, aisladas de plantas enfermas en el cultivo de Rosa sp., en el municipio de Tenancingo, Estado de México, México.

Se realizaron dos ensayos, con cada uno, con una cepa patogénica y las cuatro del antagonista. En el primero, se empleó la cepa de *V. dahliae* (V.D) combinado con cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. (SS1-6; SS2-5; TFR3 y TA4) sembrados de forma conjunta, conformando cuatro tratamientos, más un testigo correspondiente a *V. dahliae*, sembrado de forma aislada en la caja de Petri, y en el segundo ensayo se empleó la cepa patogénica de *B. cinerea* (TBC2), combinada de manera similar a las antes mencionadas cepas de *Trichoderma*, también se incluyó el tratamiento testigo, representado por la siembra aislada de *B. cinerea* (TBC2). Los aislamientos patogénicos y los del antagonistas fueron cultivados en PDA e incubadas a 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y fotoperiodo de 12/12 horas —luz/oscuridad—.

Después de siete días del proceso de crecimiento e incubación de los hongos mencionados se procedió a realizar de forma separada los ensayos de mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp., que se describen a continuación contra los patógenos *V. dahliae* (ensayo 1) y *B. cinerea* (ensayo 2).

Competencia

La competencia entre los microorganismos –patógeno-antagonista– se determinó mediante cultivos duales en cajas de Petri que contenían medio de cultivo PDA según Bell y Markham (1982). Para ello, se tomaron un disco de 8 mm de diámetro de ambos aislamientos *V. dahliae*-*Trichoderma* spp. y *B. cinerea*-*Trichoderma* spp. Ambos grupos de hongos se sembraron en los extremos de la caja de Petri, a una separación de 6 cm entre ellos. Luego se incubaron según las condiciones anteriormente descritas. Las observaciones en el crecimiento de ambos grupos de microorganismos se realizó de forma diaria. A los quince días después del proceso de incubación se determinó la clasificación de antagonismo por medio del pictograma propuesto por Bell y Markham (1982), modificado por Ruiz (2010). Se trazó el área de crecimiento micelial del patógeno para determinar el área de inhibición del crecimiento antagónico. Para ello se tomaron imágenes del reverso de la caja de Petri; y se utilizó el programa *Imagen J* (versión 1,43) (Schneider *et al.* 2019)

Antibiosis por metabolitos volátiles

El efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. se determinó mediante la técnica de cajas de Petri superpuestas (Allori *et al.* 2014). Para ello se sembró un disco de 8 mm de diámetro de cada grupo de hongos de forma independiente en cajas de Petri. Se confrontaron ambos grupos de microorganismos donde se acercaron las dos bases de las cajas de Petri inoculadas con los hongos, separadas con papel celofán estéril. Luego, se sellaron e incubaron en las condiciones descritas. A intervalos de 24 h, después del proceso de incubación se determinó el área de crecimiento micelial del patógeno mediante el programa *Imagen J* (versión 1,43) (Schneider *et al.* 2019)

Antibiosis por metabolitos difusibles

El efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. se determinó mediante la técnica de papel de celofán (Dennise y Webster 1971). La técnica empleada consistió en colocar el papel de celofán estéril sobre el medio de cultivo PDA. Posterior a ello, se colocó encima un disco de 8 mm de diámetro de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. a ensayar en la prueba

de antibiosis; y se incubaron en las condiciones mencionadas con anterioridad. Luego de 48 horas, se eliminó el papel de celofán que contenía el disco del hongo antagonista y se procedió a inocular a los fitopatógenos (*V. dahliae* y *B. cinerea*) respectivamente. La incubación del cultivo de los hongos se realizó en las condiciones descritas. En intervalos de 24 horas, después del proceso de incubación, se determinó el área de crecimiento micelial del patógeno mediante el programa *Imagen J* (versión 1,43) (Schneider *et al.* 2019).

Micoparasitismo

Para determinar el micoparasitismo de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos en estudio se utilizó la técnica de microcultivos (Ramírez *et al.* 2015). A las 72 h del proceso de inoculación e incubación de ambos hongos (patógeno-antagonista) en el interior de la placa de Petri se tomaron imágenes mediante una cámara fotográfica CANNON® integrada a un microscopio CARL ZEISS®. Se consideró micoparasitismo cuando se observó el micelio de las cepas del antagonista tanto en contacto como adherido al micelio del patógeno; de manera similar, al enrollamiento; con la presencia de lisis en las paredes celulares del patógeno y presencia de haustorios del hongo antagonista en las hifas del patógeno (Howell 2003).

Diseño experimental y análisis estadístico

En la experimentación se utilizó el diseño completo al azar, donde cada tratamiento poseía siete repeticiones, la unidad experimental constituida por una caja de Petri. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario estadístico *InfoStat*, versión 2008. En la generalidad de los experimentos se realizaron pruebas paramétricas referidas a análisis de varianza y comparación de promedios, por la prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD) a 5 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de los mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra los hongos fitopatógenos *V. dahliae* y *B. cinerea*

Competencia

Los resultados obtenidos en el crecimiento antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. —SS1-6; SS2-5; TFR3 y TA4— en el cultivo dual con *V. dahliae* (ensayo 1) y *B. cinerea* (ensayo 2). En los primeros días de contacto de *V. dahliae*, con las cuatro cepas de *Trichoderma* spp. se observaron diferencias estadísticas significativas (Figura 1). La velocidad de crecimiento fue mayor en la cepa SS1-6, seguido de las cepas TA4, TFR3 y

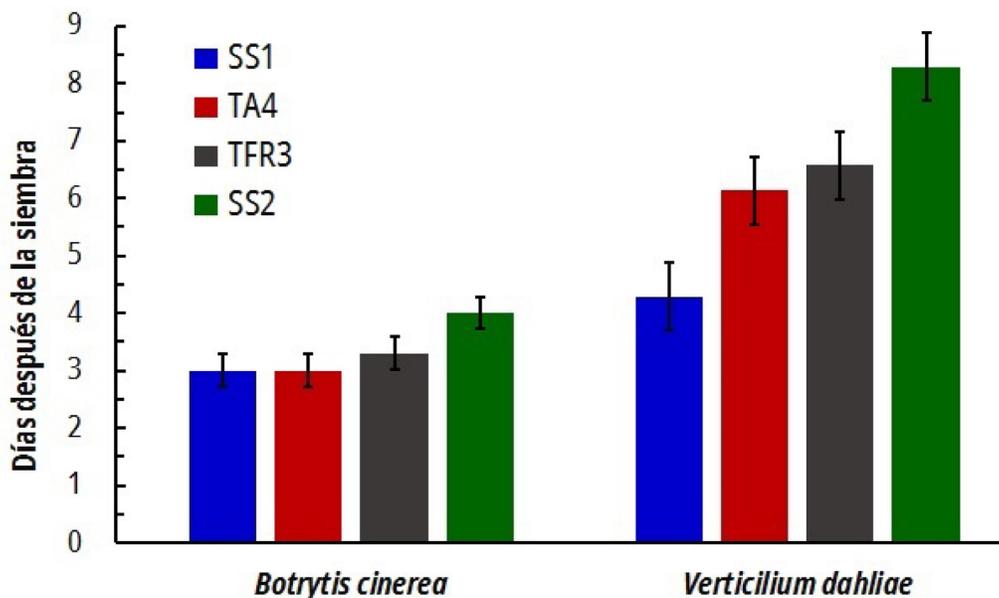


Figura 1. Efecto del crecimiento antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. en el cultivo dual con los hongos fitopatógenos *V. dahliae* y *B. cinerea*. Barras de error corresponden al valor crítico de la prueba LSD ($p < 0,05$).

SS2-5. Donde el primer contacto con el patógeno fue en promedio de 4,29; 6,14; 6,57 y 8,2 días después de la siembra de los microorganismos, respectivamente (Figura 1); sin embargo, según la clasificación de antagonismo descrita por Ruíz (2010), las cepas SS1-6, TFR3, TA4 calificaron en la clase 1 con diferencias significativas en relación a la cepa SS2-5 (Cuadro 1). Por otro lado, las cepas, SS1-6, TFR3, TA4 presentaron las mayores áreas de intersección, lo cual correspondió al área total del crecimiento micelial de *V. dahliae*; mientras que la cepa SS2-5 se clasificó en las clases 2 y 3, demostrando su baja capacidad competitiva, razón por la cual no crece sobre el patógeno. Por otra parte, en el área de crecimiento micelial las cuatro cepas probadas mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo. Donde se lograron los siguientes porcentajes de inhibición: 70,6 % (cepa TFR3); 67,5 % (cepa TA4); 59,5 % (SS1-6); y 49,1 % la cepa SS2-5 (Cuadro 1).

En el crecimiento antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. en el cultivo dual con *B. cinerea* se observó el primer contacto entre el antagonista y el patógeno; a partir del tercer día del proceso de inoculación; en los tratamientos con las cepas SS1-6, TA4 y la cepa TFR3; hubo diferencias significativas marcadas respecto al tratamiento con la cepa SS2-5 (Figura 1); mientras que, en la clasificación de antagonismo las cepas SS1-6; TFR3 y la TA4 sobrecrecieron de forma completa al patógeno. Razón por la cual se encontraron en la clase 1; y por lo tanto presentaron la mayor área de intersección con *B. cinerea* (Cuadro 2). Por otro lado, la cepa SS2-5 se clasificó entre las clases 2 y 4 donde el agente patógeno creció menos

de 2/3 partes; y el antagonista no lo colonizó, lo cual evidencia su baja habilidad competitiva (Figura 1).

En el crecimiento micelial del patógeno se encontraron los mayores valores en el tratamiento testigo (34,16 cm²); con diferencias significativas con el resto de los tratamientos; sin embargo, los mayores porcentajes de inhibición en el crecimiento de *B. cinerea* se obtuvieron en las cepas TFR3 (67,7 %); SS1-6 (67,2 %); y en la cepa TA4 (65,8 %) (Cuadro 1).

La capacidad como antagonista de *Trichoderma* depende de la especificidad de la cepa, y de los mecanismos de acción. Por tal motivo, es imprescindible la selección de aislamientos promisorios para el control de agentes patógenos, lo cual incluye el estudio de los mecanismos relacionados con dicho control (Sivila y Jujuy 2013). Entre estos mecanismos se encuentra el de competencia por espacio y nutrientes. El cual se ve favorecido por la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente (Rajesh *et al.* 2016). Por otro lado, la competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual), se ejerce principalmente por espacio y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura entre otros (Martínez *et al.* 2013).

En este sentido, Xiojun *et al.* (2014) obtuvieron 33 aislados de *Trichoderma* spp. en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en China, el estudio de su antagonismo *in vitro* con *V. dahliae*, indicó porcentajes de

Cuadro 1. Determinación del área de crecimiento micelial de *V. dahliae* y *B. cinerea* en cultivos duales con *Trichoderma* spp., después de los quince días de la inoculación de ambos microorganismos.

Cepas nativas	<i>V. dahliae</i>				<i>B. cinerea</i>			
	Clasificación de antagonismo	Área de intersección (cm ²)	Crecimiento micelial (cm ²)	Inhibición (%)*	Clasificación de antagonismo	Área de intersección (cm ²)	Crecimiento micelial (cm ²)	Inhibición (%)*
SS1-6	1,00 a	2,07 b	2,07 a	59,5	1,00 a	11,22 b	11,22 a	67,2
SS2-5	2,86 b	0,26 a	2,60 a	49,1	3,14 b	2,70 b	19,36 b	43,3
TFR3	1,00 a	1,50 b	1,50 a	70,6	1,00 a	11,05 b	11,05 a	67,7
TA4	1,00 a	1,66 b	1,66 a	67,5	1,00 a	11,67 b	11,67 a	65,8
Testigo	No aplica	No aplica	5,11 b	No aplica	No aplica	No aplica	34,16 c	No aplica

*en relación al testigo. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas por la prueba LSD ($p \leq 0,05$).

inhibición de crecimiento micelial comprendidos entre 24,7 a 38,3 %. Por otra parte, Jiménez *et al.* (2009) plantean que la aplicación de un producto comercial (Bioten®) que contiene *T. asperellum* y *T. gamsii* redujo en 30 % la severidad de síntomas causados por *V. dahliae* en el cultivo de olivo (*Olea europea* L); mientras que, Villalpando *et al.* (2016) demostraron que 11 aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos en Argentina inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* en un intervalo de 46 % a 36 % en cultivos duales.

Antibiosis por metabolitos volátiles

El efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas de *Trichoderma* spp. se evidenció en las cepas SS1-6 y SS2-5; con marcadas diferencias respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 2); aunque, el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* se observó en la cepa SS2-5 (46,8 %). Resultados similares fueron observados en el efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp.; pero, en el crecimiento micelial de *B. cinerea* donde los mejores resultados se observaron para las cepas SS1-6 y SS2-5 con diferencias marcadas respecto a las cepas TFR3; TA4 y el tratamiento testigo. El mayor porcentaje de inhibición del patógeno se observó en la cepa SS1-6 —65,2 %— (Cuadro 2).

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función; también inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no

hacen contacto físico y tales sustancias inhibidoras son consideradas antibióticos (Infante *et al.* 2009). De manera análoga, Vinale *et al.* (2006) afirman que algunas cepas de *Trichoderma* spp. producen trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticona, richotoxina, metabolitos que son responsables del mecanismo antagónico. Fernandes *et al.* (2013) evaluaron el antagonismo y la producción de enzimas hidrolíticas de cuatro especies de *Trichoderma* contra varios patógenos de plantas entre ellos: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Los resultados mostraron que las especies *T. harzianum* y *T. asperellum* fueron los antagonistas más efectivos contra los patógenos de plantas probados. Se agrega, que la mayoría de las especies de *Trichoderma* probadas produjeron metabolitos volátiles tóxicos con efectos significativos en la inhibición del crecimiento y desarrollo de los patógenos vegetales mencionados.

Antibiosis por metabolitos difusibles

El efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por las cepas de *Trichoderma* spp. se observó más marcado en las cepas SS1-6 y SS2-5; con diferencias significativas en relación al resto de los tratamientos (Cuadro 3). Donde se logró un área de crecimiento micelial del patógeno de 4,41 cm² con la cepa SS1-6; aunque, el área de crecimiento micelial de *V. dahliae* fue de 4,12 cm² con la cepa SS2-5. Los mayores porcentajes de inhibición del patógeno se obtuvieron en los tratamientos con las cepas SS1-6 (48.8 %); y SS2-5 (52.1 %) con diferencias marcadas al resto de los tratamientos evaluados. De manera

Cuadro 2. Efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *V. dahliae* y contra *B. cinerea*.

Cepas nativas	<i>V. dahliae</i>		<i>B. cinerea</i>	
	Crecimiento micelial del patógeno (cm ²)	Porcentaje de inhibición (%)*	Crecimiento micelial del patógeno (cm ²)	Porcentaje de inhibición (%)*
SS1-6	3,94 a	42,9	13,92 a	65,2
SS2-5	3,67 a	46,8	16,68 a	58,3
TFR3	5,92 b	14,2	37,95 c	5,2
TA4	6,36 bc	7,8	25,62 b	36,0
Testigo	6,90 c	No aplica	40,04 c	No aplica

*en relación al testigo. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas por la prueba LSD ($p \leq 0,05$).

Cuadro 3. Efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *V. dahliae* y contra *B. cinerea*.

Cepas nativas	<i>V. dahliae</i>			<i>B. cinerea</i>		
	Crecimiento micelial (cm ²)	Porcentaje de inhibición (%)*	Porcentaje de estimulación (%)	Crecimiento micelial (cm ²)	Porcentaje de inhibición (%)*	Porcentaje de estimulación (%)
SS1-6	4,41 a	48,8	0	37,68 ab	7,3	0
SS2-5	4,12 a	52,1	0	30,16 a	25,8	0
TFR3	11,42 c	0	32,63	46,90 b	0	15,4
TA4	11,84 c	0	37,50	41,41 ab	0	1,9
Testigo	8,61 b	No aplica	No aplica	40,65 ab	No aplica	No aplica

*en relación al testigo. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas por la prueba LSD ($p \leq 0,05$).

similar, se encontró efecto de los metabolitos difusibles en relación al porcentaje de estimulación en las cepas TFR3 (32,63 %) y TA4 (37,5 %) con diferencias marcadas al resto de las cepas estudiadas y al tratamiento testigo; sin embargo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos en el efecto de los metabolitos difusibles de las cepas de *Trichoderma* spp., en relación al crecimiento micelial de *B. cinerea*.

El mayor porcentaje de inhibición se logró con la cepa SS2-5 (25,8 %). En la estimulación del crecimiento los mayores porcentajes se encontraron en las cepas TFR3 (15,4 %) y TA4 (1,9 %) (Cuadro 3). Martínez *et al.* (2008) plantean que la desactivación de los factores de patogenicidad de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos constituye un mecanismo de antagonismo

indirecto poco estudiado; sin embargo, Howell (2003) explica que es posible que el potencial enzimático de *Trichoderma* spp. actúe como antibiótico para detener el proceso infeccioso de los patógenos. Harman (2000) planteó que *T. viride* Pers produce glucosidasa para degradar una fitotoxina de *Rhizoctonia solani* Kühn.

Micoparasitismo

Las cepas SS1-6, TFR3 y TA4 mostraron simbiosis del tipo parasítica. En la cepa SS1-6 se observó una interacción muy estrecha con el micelio de *V. dahliae*, lo cual se manifestó por medio de adhesión de las hifas y enrollamiento (Figura 2). Las cepas TFR3 y TA4 reconocieron al patógeno y se adhirieron al mismo (Figuras 3 y 4); mientras que en el tratamiento con la

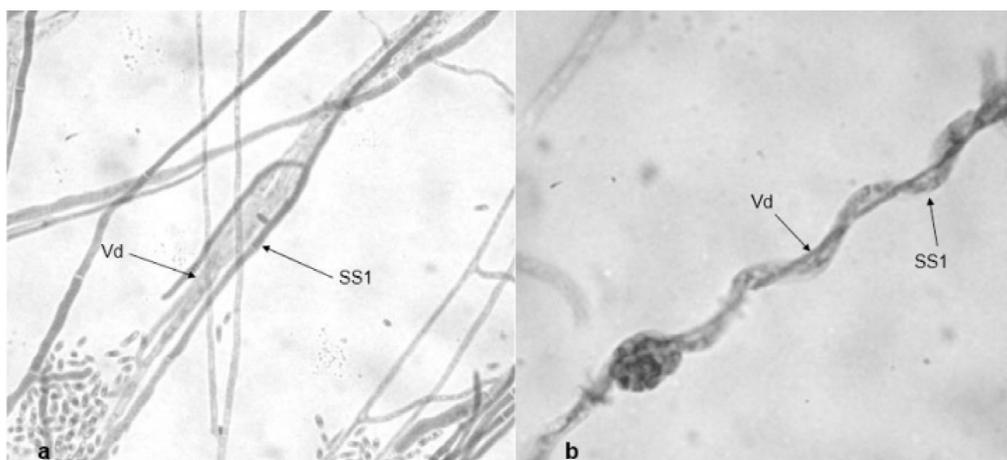


Figura 2. Micoparasitismo de *T. tomentosum* (cepa nativa SS1-6) en el patógeno *V. dahliae*. A: reconocimiento y adhesión del micelio de *T. tomentosum* al patógeno (Vd) (40x). B: enrollamiento del antagonista al micelio de *V. dahliae*, 100x.

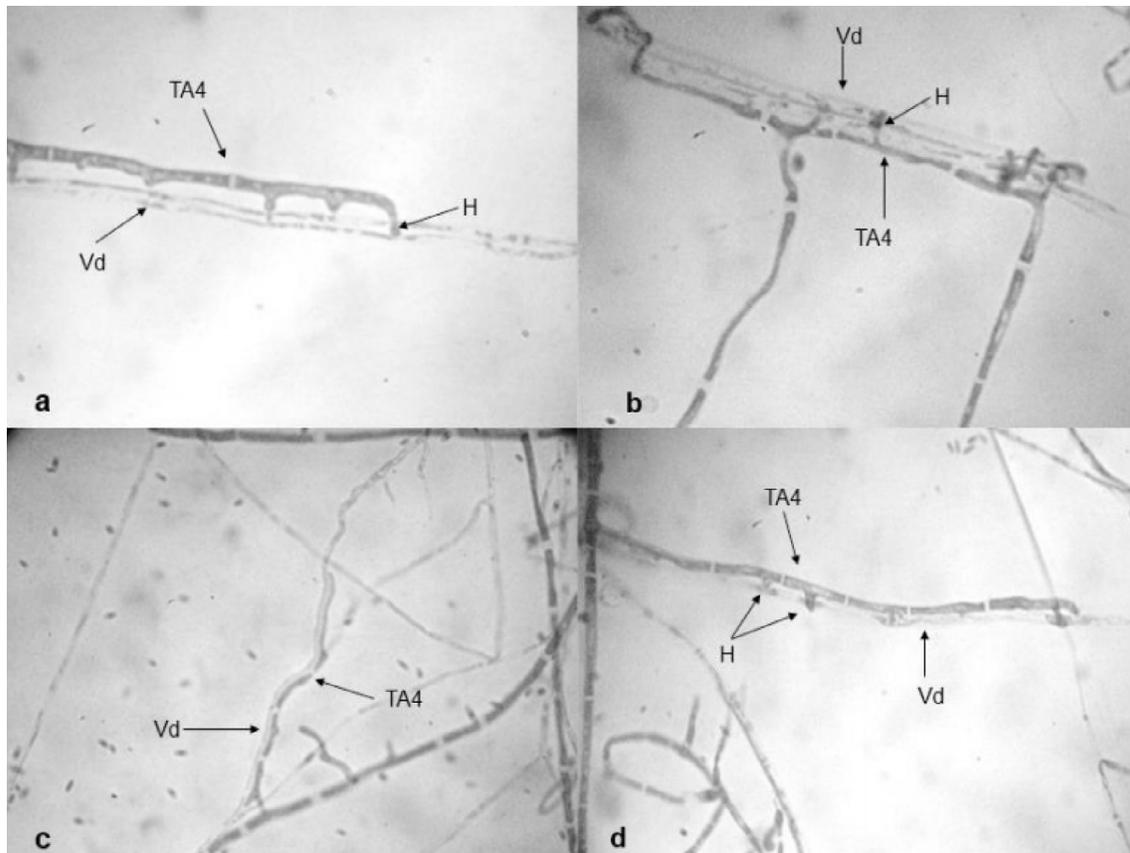


Figura 3. Micoparasitismo de *T. harzianum* (cepa TA4) en el patógeno *V. dahliae*. A, B y D: crecimiento adyacente de *T. harzianum* que forma haustorios (H) de penetración para alimentarse del patógeno (Vd) (100x). C: adhesión del antagonista (TA4) al micelio de *V. dahliae*, 40x.

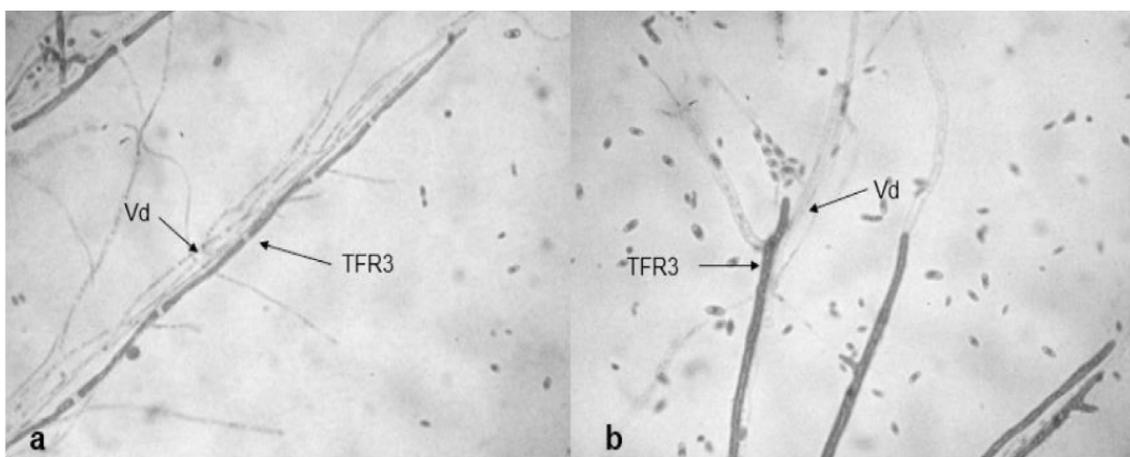


Figura 4. Micoparasitismo de *T. asperellum* (cepa TFR3) en el patógeno *Verticillium dahliae*. A y B: reconocimiento y adhesión del micelio del antagonista al micelio de *V. dahliae* (Vd), 40x.

cepa TA4 se evidenció la penetración del micelio de *V. dahliae* por medio de haustorios (Figura 3).

El micoparasitismo constituye el principal mecanismo antagonista mostrado por *Trichoderma*. Este inicia cuando el hongo antagonista reconoce al hospedador y se une a las hifas por apresorios. Luego, degrada la pared celular secretando enzimas, en especial la quitinasa y la β -1, 3-glucanasas, celulasas, proteasas y fosfatasas (Qualhato *et al.* 2013). En los ensayos de confrontamiento, Peláez *et al.* (2016) mostraron la capacidad de *T. asperellum* (T8a) para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* (ATCCMYA456) en 91 %; alcanzado a través de mecanismos micoparasíticos observando un sobrecrecimiento en el hongo fitopatógeno, por la cepa T8a evidenciando la capacidad antagonista como alternativa promisorio de control de origen microbiano contra el agente causal de la antracnosis en el

mango (de los Santos-Villalobos *et al.* 2013). Martínez *et al.* (2020), en las cepas T1 y T2 de *T. harzianum* demostraron microscópicamente los mecanismos de micoparasitismo sobre ocho cepas de fitopatógenos. El comportamiento micoparasítico observado en la cepa SS1-6 ha sido evidenciado para el género *Trichoderma* (estado teleomorfo: *Hypocrea*). La capacidad de micoparasitar mediante la biosíntesis de enzimas líticas se ha utilizado de forma amplia para la protección de plantas contra diversas enfermedades fúngicas (Atanasova *et al.* 2013).

El micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea* se evidenció en todas las cepas del microorganismo antagonista. Se observó contacto micelial, lo cual provocó la adhesión y penetración de haustorios al micelio de *B. cinerea* (Figura 5 y 7). Las cepas SS1-6 y la TA4 mostraron super enrollamiento al micelio del patógeno (Figura 5 y 6).

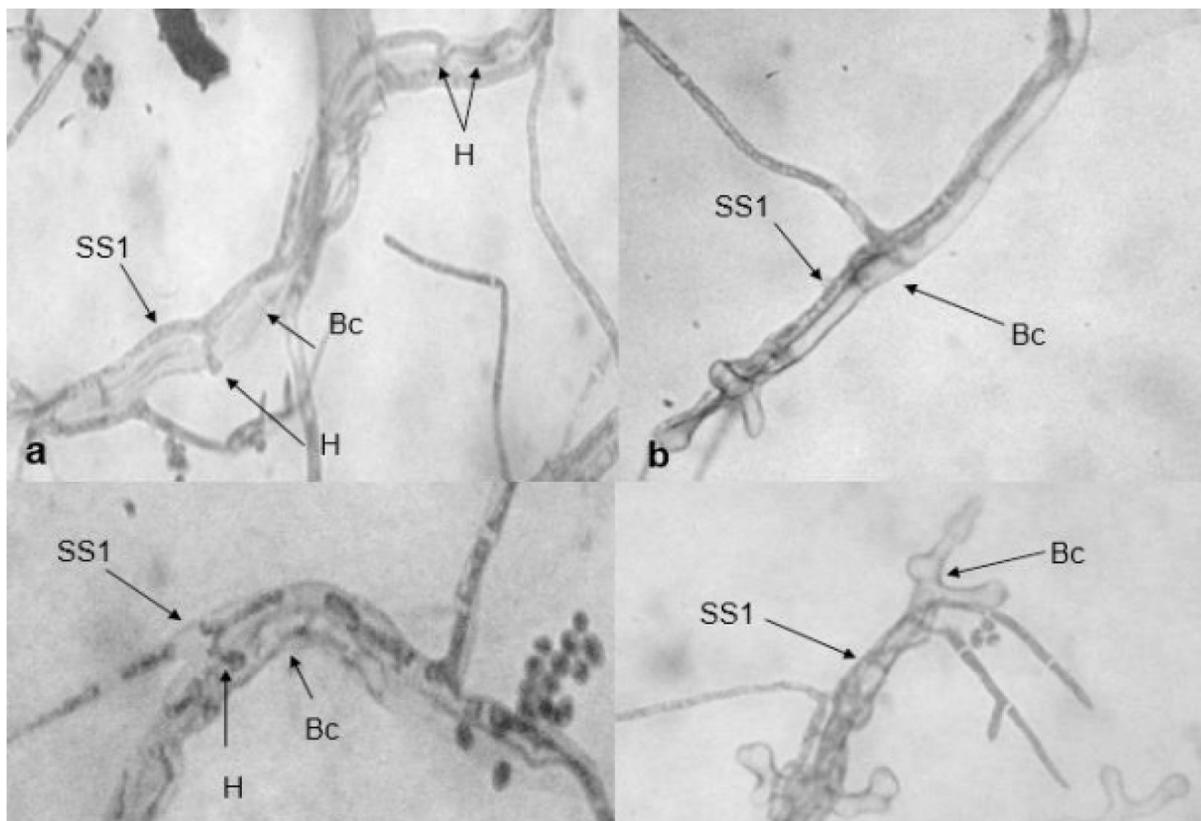


Figura 5. Micoparasitismo de *T. tomentosum* (cepa nativa SS1-6) en el patógeno *B. cinerea*. A y C: formación de haustorios (H) por el antagonista para alimentarse del patógeno (Bc), y ocasionarle la muerte. B: adhesión del micelio del antagonista (SS1) al micelio de *B. cinerea* (Bc). D: enrollamiento de *T. tomentosum* al micelio del patógeno (Bc), 100x.

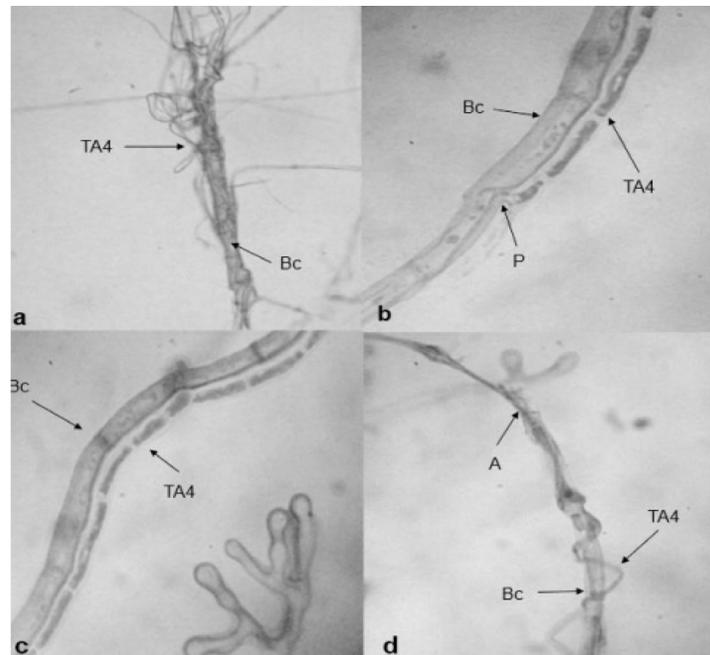


Figura 6. Micoparasitismo de *T. harzianum* (TA4) en *B. cinerea*. A: enrollamiento al micelio del patógeno (40 x). B: penetración (P) al micelio de *B. cinerea* (100x). C: reconocimiento y adhesión al micelio del patógeno (100x). D: enrollamiento y absorción del contenido celular (A) del micelio de *B. cinerea* (40x).

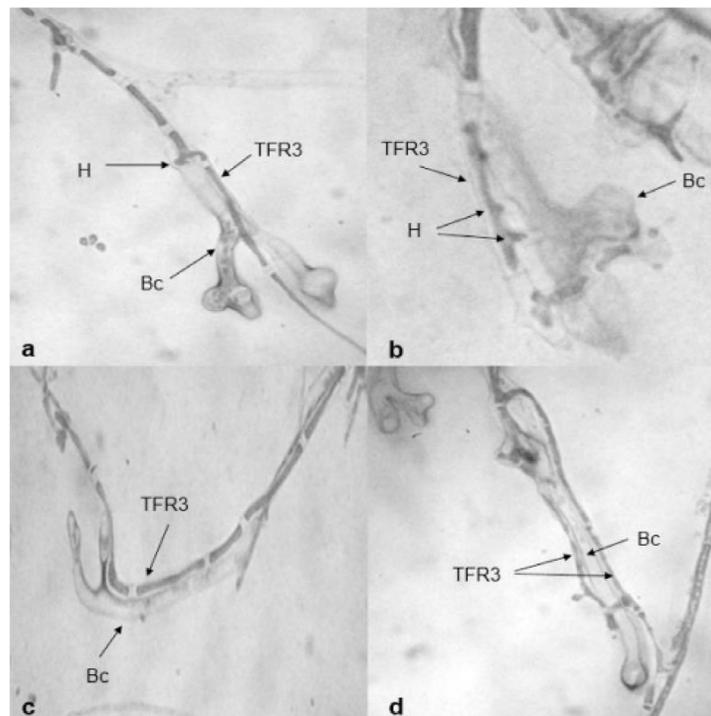


Figura 7. Micoparasitismo de *T. asperellum* (cepa TFR3) en el patógeno *B. cinerea*. A y B: crecimiento y formación de haustorios de penetración (H). C y D: crecimiento y adhesión al micelio del patógeno, 100x.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Trichoderma* spp. ensayadas mostraron antagonismo contra *V. dahliae* y *B. cinerea*, siendo promisorias para su utilización en un programa de control biológico en el Estado de México.

En el cultivo dual, la cepa SS1-6 mostró el mayor efecto antagónico hacia *V. dahliae*; mientras que, las cepas SS1-6, TA4 y la TFR3, lo fueron frente a *B. cinerea*.

Los efectos de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas de *Trichoderma* spp. se evidenciaron en las cepas SS1-6 y SS2-5, para ambos patógenos.

El mecanismo de micoparasitismo estuvo presente en todas las cepas estudiadas de *Trichoderma*, para ambos patógenos.

LITERATURA CITADA

- Allori, SE; Yasem, MG; Ploper, LD. 2014. Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del género *Trichoderma* (en línea). Revista Agronómica del Noroeste Argentino 34(2):197- 199. Consultado 9 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3vLt9DI>
- Atanasova, L; Le Crom, S; Gruber, S; Couplier, F; Seidl-Seiboth, V; Kubicek, CP; Druzhinina, IS. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism (en línea). BMC Genomics 14: 121. Consultado 18 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3cORq2x>
- Bell, DK; Wells, HD; Markaham, CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens (en línea). Phytopathology 72:379-382. Consultado 10 dic. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3lw0TQe>
- Benítez, T; Rincón, AM; Codón, AC. 2004. Biocontrol of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7(4): 249-260. Consultado 10 dic. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3BvHTrX>
- Camacho, LMD. 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. Centro Universitario UAEM, Universidad Autónoma del Estado de México, Tenancingo. 87 p.
- de los Santos-Villalobos, S; Guzmán-Ortiz, DA; Gómez-Lim, MA; Délano-Frier, JP; de-Folter, S; Sánchez-García, P; Peña-Cabriales, JJ. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). Biological Control 64(1):37-44. Consultado 7 nov. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3r2WEgh>
- Dennise, C; Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: I. Production of volatile antibiotics. Transaction of the British Mycological Society 57: 25-39. Consultado 22 oct. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3vFEN2q>
- Fernandes, QT; Cardoso, LF; Stecca, SA; Silva, BR; Amorim, JR; Uihoa, CJ. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnology letters 35(9): 1461-1468. Consultado 5 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/2WDxplm>
- García-Velasco, R; Alonso, A; Domínguez, G; Aguilar, S; Mora, Martha E; Companioni, B. 2021. Efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* en México. Agronomía Tropical. Volumen 71: e4605221:1-15. Consultado 20 mar. 2021. Disponible en <https://doi.org/gtg2>
- García-Velasco, R; Domínguez, G; Chavarro, EA; Mora, ME. 2017. Pathogenicity of *Verticillium dahliae* klebahn in rootstock rose cv. Manetti (en línea). APS Anual Meeting, August 5-9. San Antonio, Texas. Consultado 5 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/2QbDckz>
- García-Velasco, R; González, JG; Domínguez, G; Ayala, V; Aguilar, S. 2012. *Rosellinia necatrix* en Rosa sp. y su evaluación a sensibilidad de fungicidas (en línea). Revista Chapingo Serie Horticultura 18(1): 39-54. Consultado 11 ago. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3rZlGhw>
- Harman, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 (en línea). The American Phytopathological Society 84(4):377-393. Consultado 10 mar. 2021. Disponible en <https://doi.org/dgm942>

- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts (en línea). *Plant Disease* 87(1):4-10. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3s7PAjz>
- Infante, D; Martínez, B; Gonzáles, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos (en línea). *Protección Vegetal* 24(1): 14-21. Consultado 5 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3DDF7Tt>
- Jiménez, DR; Trapero, CJ; Boned, BB; Landa, JA; Navas, C. 2009. Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. *Departamento de protección de cultivos. Boletín Sanidad Vegetal de Plagas* 35: 295-615.
- Kenneth, H; Cloyd, A. 2007. Compendium of Rose Diseases and Pests (en línea). *Infectious Disease. USA: APS*. 5-40 p. Consultado 11 jul. 2020. Disponible en <https://bit.ly/38v24tv>
- López, AN. 2019. Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. FR. Estado de México: Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México Centro Universitario UAEM Tenancingo, 66 p. 86.
- Mackay, C; Franco, Z; Ruiz, K.; González, G; Poveda, G. 2020. El sector florícola ecuatoriano y su afectación en el mercado internacional producto de la pandemia causada por el COVID-19 (en línea). *In Rivera-Espinoza, R (ed.). I Congreso Internacional virtual sobre Covid-19. Consecuencias psicológicas, sociales, políticas y económicas.* p. 53-65. Consultado 11 jul. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2Uj935t>
- Martínez, TO; Guerrero, BZ; Pecina, V; Rivas, P; González, E; Angeles, JG. 2020. *Trichoderma harzianum* antagonism against chickpea fusariosis and its biofertilizing effect. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 11(5):1135-1147. Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3r7lFa0>
- Manzanos, D; López, N; Domínguez, G; García-Velasco, R. 2019. Efectividad *in vitro* de tiabendazol frente a *Botrytis cinerea* (en línea). *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 29. Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3kLSwQw>
- Martínez, B; Infante, D; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en cultivos (en línea). *Protección vegetal* 28(1):1-11. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3s4d8pE>
- Martínez, M; Nieto, DA; Teliz, D; Rodríguez, J; Martínez, MT; Vaquera, H; Carrillo, MO. 2008. Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa Duch*) de cultivares mexicanos y estadounidenses (en línea). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2):113-119. Consultado 2 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/317dpfu>
- Peláez-Álvarez, A; de los Santos-Villalobos, S; Yépez, EA; Parra-Cota, FI; Reyes-Rodríguez, RT. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y C aptan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (en línea). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(6):1401-1412. Consultado 9 jun. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3E4hHGw>
- Pineda-Insuasti, JA; Benavides, EN; Duarte, AS; Burgos, CA; Soto, CP; Pineda, CA; Fierro, FJ; Mora, ES; Álvarez, SE. 2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión (en línea). *ICIDCA sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 51(1):47-52. Consultado 11 may. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31290ui>
- Qualhato, TF; Lopes, FAC; Steindorff, AS; Brandao, RS; Jesuino, RSA; Ulhoa, CJ. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production (en línea). *Biotechnology letters* 35(9):1461-1468. Consultado 11 ago. 2018. Disponible <https://bit.ly/3s3ZyTh>
- Rajesh, RW; Shelake, MR; Sabalpara, AN. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment (en línea). *African Journal of Agricultural* 11(22): 1952-1965. Consultado 11 ago. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3jzvnQE>
- Ramírez, RM; Urzúa, HMC; Camacho, CA; Tsuzuki, RG; Esquivel, R. 2015. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. Editorial Trillas. México. 375 p.
- Ruiz, RA. 2010. Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum*-*Sclerotium rolfsii*. Yautepec, Morelos. Tesis de maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. México. 136 p.

- Schneider, CA; Rasband, WS; Eliceiri, KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis (en línea). *Nature Methods* 9:671-675. Consultado 22 oct. 2019 Disponible en <https://doi.org/gcwb4q>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México). 2018. Avance de siembra y cosechas resumen por estado (en línea, pág. web). Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2X96CmW>
- SIAVI (Sistema de Información Arancelaria Vía Internet, México). 2019. Sistema de información arancelaria vía internet. Consultado 22 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3vMXzFi>
- Sivila, N; Jujuy, SA. 2013. Producción artesanal de *Trichoderma* (en línea). Argentina. Consultado 11 ago. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3sffS4q>
- Villalpando, C; Murillo, B; Zapata, SR; Buerrero, EEF; Monaco, C. 2016. Comparación *in vitro* de *Trichoderma* sp. como control biotecnológico de *Botrytis cinerea*. *Avance en energía y medio ambiente* 20: 29-36.
- Vinale, F; Marra, R; Scala, F; Ghisalberti, L; Lorito, M; Sivasithamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens (en línea). *Letters in Applied Microbiology* 43(2): 143-148. Consultado 20 ago. 2019. Disponible en <https://bit.ly/2V5NLbT>
- Xiaojun, C; Wongkaew, S; Jie, Y; Haiyong, H; Shiping, W; Quigun, T; Buensateai, N; 2014. *In vitro* inhibition of pathogenic *Verticillium dahliae*, causal agent of potato wilt disease in China by *Trichoderma* isolates (en línea). *African Journal of Bacteriology* 13(33):3402-3411. Consultado 20 jun. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3DxDsyN>
- Youssef, S; Tartoura, K; Abdelraouf, G. 2016. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani* (en línea). *Biological Control* 100:79-86. Consultado 9 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3c8h3fO>