

Diagnóstico, patogenicidad y antibiosis de *Trichoderma* spp., *in vitro*, de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseoli* en frijol, tomatillo y chile

AYVAR-SERNA, Sergio†*, JUÁREZ HILARIO, Héctor, HERNÁNDEZ BARRIOS, José Antonio, SANTOS-ESTEBAN, Daniel.

Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro). Iguala, Guerrero.

Recibido: Agosto, 22, 2017; Aceptado febrero 9, 2018

Resumen

Se muestrearon predios comerciales de frijol, tomate y chile con síntomas de marchitez y clorosis, en Mochitlán, Apipilulco y Cocula, Gro., respectivamente; de las raíces, se aisló, e identificó morfológicamente a *Fusarium oxysporum* (*Fo*), *Rhizoctonia solani* (*Rs*) y *Macrophomina phaseolina* (*Mp*), respectivamente. Se comprobó su patogenicidad y se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) Control, 2) *Trichoderma* sp., (nativa del lugar de origen del patógeno), 3) *T. asperellum* (nativa de Santa Teresa, Gro.), 4) *T. virens* (PHC® RootMate®), 5) *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) y 6) *T. harzianum* (PHC® T-22®); distribuidos completamente al azar con 5 repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri con 15 mL de PDA + los metabolitos del biocontrolador, los cuales se extrajeron mediante la técnica del papel celofán. Se encontró que las cepas de *Trichoderma* sp., evaluadas *in vitro*, ejercieron efecto fungistático sobre *Fo*, *Rs* y *Mp*. Las cepas de *T. harzianum* (PHC® T-22®), *Trichoderma* sp., (FITHAN^{MR}) y *T. asperellum* (nativa de Cocula, Gro.) fueron las más efectivas porque inhibieron 73.84, 50.48 y 78.29% el crecimiento micelial de *Fo*, *Rs* y *Mp*, respectivamente.

Palabras clave: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Trichoderma*.

Abstract

Commercial crops of beans, tomatoes and peppers with symptoms of wilt and chlorosis were sampled in Mochitlán, Apipilulco and Cocula, Gro., respectively; of the roots, was isolated, and morphologically identified to *Fusarium oxysporum* (*Fo*), *Rhizoctonia solani* (*Rs*) and *Macrophomina phaseolina* (*Mp*), respectively. Its pathogenicity was checked and the following treatments were evaluated: 1) Control, 2) *Trichoderma* sp. (native to the place of origin of the pathogen), 3) *T. asperellum* (native to Santa Teresa, Gro.), 4) *T. virens* (PHC® RootMate®), 5) *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) and 6) *T. harzianum* (PHC® T-22®); distributed completely randomly with 3 repetitions. The experimental unit was a Petri dish with 15 mL of PDA + the metabolites of the biocontroller, which were extracted using the cellophane paper technique. It was found that strains of *Trichoderma* spp., evaluated *in vitro* exerted fungistatic effect on *Fo*, *Rs* and *Mp*. Strains of *T. harzianum* (PHC® T-22®), *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) and *T. asperellum* (native of Cocula, Gro.) were the most effective because they inhibited 73.84, 50.48 y 78.29% growth micelial of *Fo*, *Rs* and *Mp*, respectively.

Key words: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Trichoderma*.

Citación: AYVAR-SERNA, Sergio†, JUÁREZ HILARIO, Héctor, HERNÁNDEZ BARRIOS, José Antonio, SANTOS-ESTEBAN, Daniel. Diagnóstico, patogenicidad y antibiosis de *Trichoderma* spp. *in vitro*, de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseoli* en frijol, tomatillo y chile. Foro de Estudios sobre Guerrero 2018, mayo 2018 - abril 2019 Vol. 6 No. 1 1-14

*Correspondencia al Autor :ayvarsernas@hotmail.com

†Investigador contribuyendo como primer autor.

I. Introducción

El frijol, el tomate y el chile, son sin cuestión alguna, uno de los principales componentes de la dieta de los mexicanos. En campo estos cultivos; son atacados por hongos patógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* y *Sclerotium* que pudren la raíz y matan a la planta (Agris, 2005). El daño se manifiesta por la disminución en la productividad de los cultivos, y menores ingresos para el agricultor. (Alonso, 2013). Se han reportado pérdidas de 50% de la producción de frijol provocadas por *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Sánchez (1983; Mendoza, 1996); además, 80% de incidencia de *Macrophomina* en plantas de chile criollo cultivadas en campo (Flores, 2017).

El manejo integrado es la mejor estrategia para minimizar los daños causados por esta problemática fitosanitaria, incluyendo prácticas culturales, biológicas, genéticas y químicas. No obstante, el control químico es el método más utilizado por los agricultores porque sus efectos son rápidos, están disponibles en el mercado y es rentable. Aunque estas moléculas poseen el inconveniente de que repercuten negativamente en el medio ambiente y no garantizan productos inocuos para los consumidores, por lo cual, la agricultura actual demanda la disminución de plaguicidas químicos mediante el uso de alternativas de control que garanticen la inocuidad de los productos agropecuarios (Oka y Yermiyahu, 2002).

Una de las alternativas factibles para disminuir el uso de químicos en el control de enfermedades en las plantas, es la aplicación de hongos benéficos como *Trichoderma* spp.; que poseen propiedades antifúngicas; son de amplia versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación (Benítez *et al.*, 2004; Fernández y López, 2004); además, de acuerdo con Infante *et al.* (2009) inhiben la incidencia y severidad de hongos patógenos habitantes del suelo; a través de mecanismos de competencia, antibiosis y micoparasitismo (Sivan y Chet 1986; McLean *et al.*, 2004); los cuales varían dependiendo de las cepas y especies de *Trichoderma* spp., por lo que es importante evaluar constantemente éstas en la búsqueda por obtener las más efectivas para el control de hongos de la raíz de las plantas.

II. Objetivos

Debido a las grandes pérdidas ocasionadas por hongos fitopatógenos habitantes del suelo y ante la necesidad de generar información acerca del manejo biológico de esta problemática fitosanitaria, surgió el interés de realizar la presente investigación, con los objetivos de identificar a los principales hongos causantes de pudriciones radicales en diferentes hortalizas, de diferentes regiones de Guerrero, verificar la patogenicidad de los hongos aislados y evaluar su respuesta *in vitro* al exponerlos a metabolitos secundarios de cepas nativas y comerciales de *Trichoderma* spp.

III. Metodología

Recolección de muestras

Se colectaron raíces de plantas de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.), chile criollo Apaxtleco (*Capsicum annuum* L. y tomate amarillo manzano (*Physalis ixocarpa* Brot.), que presentaban clorosis y marchitez (Figura 1); los lugares de muestreo fueron Mochitlan, Gro., Cocula Gro. y Apipilulco, Gro., respectivamente. También se obtuvo una muestra de 200 g del suelo del terreno de cultivo. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Fitopatología.

Aislamiento, identificación y patogenicidad de los hongos

De las raíces colectadas por cultivo, se aislaron los hongos en cultivo puro mediante cultivo monospórico y puntas de hifas (Waller, 2002). Se identificaron morfológicamente con las claves de Nelson *et al.* (1983), Barnet y Hunter (2000), y Watanabe (2000). Se realizaron los postulados de Koch en cada cultivo, para comprobar la patogenicidad de las cepas puras de los hongos (Agrios, 2005); las cuales se preservaron en PDA en tubo de ensayo a 5 °C.

Obtención de cepas de *Trichoderma* spp.

Cepa nativa. Del suelo de cada cultivo se obtuvo una cepa nativa de *Trichoderma* spp., utilizando la técnica de dilución en placa descrita por Salazar *et al.* (2012). Se identificó la cepa de *Trichoderma* spp. a nivel de género (Gams y Bissett, 2002; Kubicek y Harman, 2002; Chaverri *et al.*, 2003).

Cepas comerciales. Se obtuvieron del cepario del laboratorio de Fitopatología.

Tratamientos de estudio

Se realizó un ensayo por género de hongo; en cada uno se evaluaron los tratamientos: 1) Testigo absoluto, 2) *Trichoderma* sp. (cepa nativa del lugar de origen del patógeno; Mochitlán, Cocula o Apipilulco), 3) *T. asperellum* (cepa nativa Santa Teresa, Gro.), 4) *T. virens* (PHC® RootMate®), 5) *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) y 6) *T. harzianum* (PHC® T-22®).

Diseño y unidad experimental. Los 6 tratamientos evaluados en cada patógeno, se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri, con 15 mL de PDA + los metabolitos extracelulares producidos por *Trichoderma* spp.

Técnica de papel celofán

Para extraer los metabolitos secundarios de las cepas de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica del celofán (Hoda *et al.*, 2016) en medio de cultivo PDA en caja Petri, en donde primero se obtuvieron los metabolitos secundarios del hongo antagonista y después se sembró en el centro el aislamiento puro del patógeno y se incubó en el laboratorio a temperatura ambiente (± 28 °C).

Variables de estudio

Para conocer el efecto de la antibiosis de los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. Contra los hongos patógenos, se midieron las siguientes variables de respuesta:

Diámetro de la colonia del hongo patógeno.

Se midió cada 24 h hasta que en el tratamiento testigo la colonia del hongo cubrió toda la superficie del PDA en la caja Petri.

Porcentaje de inhibición de la colonia del hongo patógeno.

Esta variable se calculó con la ecuación propuesta por Patil *et al.* (2014):

$$[(D1 - D2)/D1] \times 100 \quad (1)$$

Donde:

D1 = Diámetro de la colonia del hongo patógeno en el tratamiento testigo.

D2 = Diámetro de la colonia del patógeno en el tratamiento con metabolitos de *Trichoderma* spp.

Análisis estadístico

Los datos de las variables se analizaron estadísticamente con el programa SAS Institute (2015), de acuerdo al diseño experimental completamente al azar (Steel y Torrie, 1998).

Identificación morfológica de los hongos

Cultivo de frijol. El aislamiento puro del hongo obtenido de la raíz de plantas de frijol, se identificó como *Fusarium oxysporum*, que creció a ritmo de 0.89 cm día⁻¹ en PDA a 28 ± 2 °C; presenta micelio hialino septado con abundante producción de conidióforos hialinos y cortos, producción de macroconidios falcados multicelulares; así como abundantes microconidios unicelulares elipsoidales producidos solitarios o en grupos (Figura 2A) y también se observó producción de clamidosporas de forma globosa y color marrón; estas características morfológicas de importancia taxonómica concordaron con las reportadas por Watanabe (2002) para la especie *Fusarium oxysporum* (Schl.) emend. Snyder y Hansen. P.

Cultivo de tomate verde. La cepa fungosa obtenida de raíces de tomate, se identificó como *Rhizoctonia solani*, que creció a una tasa promedio de 2.8 cm día⁻¹, en PDA a ± 28 °C; con micelio septado, hifas gruesas de color café claro a oscuro, ramificadas en ángulos rectos y con una ligera constricción en la base de la ramificación (Figura 2B); estas características morfológicas coinciden con la descripción hecha por Watanabe (2002) para *Rhizoctonia solani*.

Cultivo de chile. Del tejido radical de chile, se obtuvo un aislamiento fungoso identificado como *Macrophomina phaseolina*, que en medio de cultivo PDA, creció a un ritmo de 2.015 cm día⁻¹; presenta micelio septado, ramificado y abundante producción de microesclerocios globosos de color negro (Figura 2C). Las colonias con márgenes uniformes, micelio aéreo abundante y esponjoso de color café-grisáceo cuando jóvenes y se tornan de color oscuro conforme envejecen por la producción de densas masas de esclerocios negros. Estas características morfológicas y culturales, concuerdan con las descritas por Watanabe (2002) para *Macrophomina phaseolina*.

Prueba de patogenicidad

En plantas de frijol. Las plantas de frijol inoculadas con *F. oxysporum* (*Fo*) presentaron clorosis y marchitez (Figura 3) a los 12 días después de la inoculación (d.d.i.); se realizó el reisolamiento del hongo y se comprobó que el aislamiento puro de este hongo es patogénico en plantas sanas de frijol pinto. Al respecto, Montiel *et al.* (2004) mencionaron que *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* es una de las especies más reportadas como causantes de marchitez en el cultivo del frijol.

En plantas de tomate. El aislamiento purificado de *R. solani* (*Rs*) resultó patogénico a partir de los 7 d.d.i., debido a que provocó marchitez y muerte de las plantas de tomate (Figura 4); el reaislamiento del hongo efectuado a partir del tejido infectado, presentó las mismas características que el aislamiento originalmente inoculado, por lo tanto, se cumplió positivamente con el protocolo de los postulados de Koch (Agrios, 2005).

En plantas de chile. Se observó que el aislamiento puro de *M. phaseolina* (*Mp*), inoculado en plantas de chile criollo apaxtleco, causó la muerte de éstas, a los 6 d.d.i. (Figura 5); con respecto a estos resultados obtenidos, en una prueba similar, Flores (2017) reportó que los síntomas del hongo comenzaron a los 6 d.d.i.; se manifestaron como pérdida de turgencia en hojas y tallo, marchitez y la muerte de las plantas de chile, a los 15 d.d.i.

Aislamiento e identificación de la cepa nativa de *Trichoderma* sp.

El cultivo puro de la cepa de *Trichoderma* sp. Aislada de suelo colectado en Mochitlán, Gro., en medio de cultivo PDA forma colonias con micelio septado, hialino de crecimiento rápido; en edad joven presentan coloración blanquecina que al envejecer se torna de aspecto verdusco por la producción de masas de conidios en círculos concéntricos, los de forma ovoide, hialinos y unicelulares. Estas características taxonómicas son similares a las descritas por Kubicek y Harman (2002) para el género *Trichoderma*.

Diámetro de las colonias de los hongos patógenos y Porcentajes de inhibición provocados por *Trichoderma* spp.

Fusarium oxysporum. El análisis de varianza de los datos del último muestreo (192 h / 8 días) del crecimiento miceliar, mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) por efecto de los tratamientos.

Se encontró que en el tratamiento con los metabolitos de *T. harzianum* (PHC® T-22®), hubo el menor incremento del diámetro de la colonia de *F. oxysporum*, contrastando con *T. virens* (PHC® RootMate®) en donde se obtuvo el promedio de mayor crecimiento miceliar del patógeno; el resto de los tratamientos presentaron un crecimiento miceliar que varió de 3.9 a 4.43 cm (Grafico 1A).

Por otra parte, el resultado del análisis de varianza de los datos de la última evaluación (192 h / 8 días) del porcentaje de inhibición por *Trichoderma* spp. Del crecimiento miceliar de *F. oxysporum*, indicó que existieron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) por efecto de los tratamientos, destacando *T. harzianum* (PHC® T-22®) por presentar el mayor porcentaje de inhibición (73.84%), comparativamente, en *T. virens* (PHC® RootMate®) se registró el menor promedio de inhibición de este patógeno (31.67 %). Los demás tratamientos presentaron promedios que variaron desde 37.95 hasta 44.84 % (Grafico 1B).

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran el amplio potencial de algunas cepas de *Trichoderma* spp. que pudieran ser evaluadas en condiciones de invernadero y campo en conjunto con otras prácticas de control, para disminuir los daños ocasionados por *F. oxysporum*. Los promedios de inhibición de esta investigación, son mayores que los reportados por Otadoh *et al.*, (2011) quienes encontraron que *T. reesei*, *T. atroviride*, *T. koninngii*, *T. asperellum* y *T. harzianum* inhibieron 32.2, 28.81, 28.81, 20.34 y 22.03% el crecimiento miceliar de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* de, respectivamente; mientras que Carvalho *et al.* (2014) reportaron que distintas cepas de *T. harzianum* ejercieron un buen control sobre este patógeno en condiciones *in vitro*.

El efecto fungistático de *Trichoderma* spp. Sobre el crecimiento miceliar de *F. oxysporum* observado en el presente estudio, se debe a la secreción de diferentes metabolitos extracelulares del antagonista, incluyendo enzimas con actividad antifúngica (Hjeljord y Tronsmo, 1998), que, de acuerdo con Sanz *et al.* (2005), la β -1,3 glucanasa es una de las enzimas que participan en mayor medida en la degradación de la pared celular de hongos patógenos; al respecto, Larralde *et al.* (2008) evidenciaron una correlación positiva entre la secreción de β -1,3 glucanasa y N-acetylhexosaminidasa con la capacidad controladora de aislamientos de *Trichoderma*.

No obstante, es importante mencionar que, este hongo benéfico presenta combinación parasexual, mutación y otros factores que contribuyen a la variación genética del hongo y por ende a la variación de la producción de enzimas con propiedades antifúngicas (Harman y Kubicek 1998); es por lo anterior, que existen algunas cepas de éste biocontrolador que son más efectivas en comparación a otras para el control de un patógeno específico; en otras palabras, la capacidad antagonista de este hongo depende en gran medida, de la especificidad de las cepas; por lo cual es recomendable que siempre se evalúe preliminarmente la especificidad de la interacción *Trichoderma*-patógeno (Martínez *et al.*, 2008), antes de considerar utilizar una cepa en el control de algún patógeno en condiciones de invernadero o campo.

R. solani. Se encontraron efectos altamente significativos ($P < 0.0001$) de los tratamientos sobre el crecimiento miceliar de este fitopatógeno. Se encontró que los metabolitos de *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) inhibieron en mayor medida a *Rs* (Grafico 2A). El porcentaje de inhibición, también presentó variaciones estadísticamente significativas ($P < 0.0001$) por efecto de los tratamientos evaluados. Se determinó que los metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) provocaron la mayor inhibición (50.48 %) del crecimiento *in vitro* de *Rs*; por otra parte, la cepa nativa de Apipilulco, Gro. fue la que menos efectiva para disminuir el crecimiento de *Rs* (Grafico 2B).

Este efecto fungistático de *Trichoderma* spp. Sobre *R. solani* se ha encontrado en investigaciones similares incluyendo la realizada por Hoyos *et al.* (2008), quienes reportaron que aislamientos de *Trichoderma* spp. Presentaron 100% de efectividad biológica *in vitro* contra *R. solani* aislado de plantas de algodón. Asimismo, Saeed *et al.*, (2014) determinaron que cepas de *Trichoderma* spp. Inhibieron de 15.3 a 10.6% el crecimiento micelial *in vitro* de *R. solani* obtenido de frijol; asimismo, Tovar (2008) encontró que la cepa nativa T235 de *Trichoderma* sp. Causó 63.67% de inhibición micelial de *R. solani*.

M. phaseolina. El análisis de varianza indicó que existieron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) por efecto de los tratamientos. A las 72 h de iniciado el experimento, se determinó que en el tratamiento con metabolitos producidos por la cepa de *T. asperellum* nativa de Cocola, Gro., se registró el menor crecimiento miceliar del hongo patógeno (1.83 cm), lo contrario sucedió con *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) que, de todas las cepas evaluadas, fue la que permitió el mayor incremento del diámetro de las colonias de *M. phaseolina* (Grafico 3A).

Por otra parte, se encontró evidencia altamente significativa ($P < 0.0001$) de que *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula, Gro.), ocasiono la mayor inhibición miceliar (78.29 %) de *M. phaseolina* (Grafico 3B). Se han realizado diversos reportes con resultados variables, en cuanto a la efectividad de *Trichoderma* en el control de ésta y otras especies de hongos fitopatógenos de origen edáfico (Thrane *et al.*, 2000).

Al respecto, Aponte *et al.* (2012) encontraron que filtrados de cepas nativas de *T. harzianum*, *T. crassum* y *T. longibrachiatum* disminuyeron el 97.08, 96.03 y 83.54%, respectivamente el crecimiento de *M. phaseolina*, así mismo, Guigón *et al.* (2010), reportaron que *T. asperellum* inhibió 64% el crecimiento de *M. phaseolina*; por su parte, Baird *et al.* (2003) demostraron que *T. harzianum*, *T. virens* y *T. koningii* presentan una alta capacidad antagónica e hiperparásita contra *M. phaseolina*; además, Zaki y Ghaffar (1988) mencionaron que *T. harzianum* y *T. viride* producen metabolitos tóxicos que reducen el crecimiento de *M. phaseolina*. Hesamedin (2008) encontró que *T. harzianum* inhibió 18.2% el crecimiento de *M. phaseolina*; también Singh *et al.* (2008) utilizando la técnica de cultivos duales, descubrieron que *T. viride* y *T. harzianum*, inhibieron 61.4 y 54.6% a *M. phaseolina*, y además aumentaron el porcentaje de germinación de semillas y la longitud de las raíces de las plantas. Por otro lado, Etebarian (2006) reportó que *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride* disminuyeron 57.1, 56.6 y 19.2%, respectivamente, el crecimiento del patógeno.

Como se puede observar, son muy variados los resultados reportados sobre el control de *M. phaseolina* y otros hongos de origen edáfico como *F. oxysporum* y *R. solani*, por efecto de *Trichoderma* spp.; lo cual, probablemente es debido a que, como se mencionó anteriormente, las cepas de este biocontrolador, aun siendo de la misma especie, poseen diferente capacidad en la producción de enzimas extracelulares con propiedades antifúngicas (Harman y Kubicek 1998), por lo cual surge la necesidad de evaluar constantemente distintas cepas de este agente biocontrolador para el control de patógenos específicos en cada región agrícola, y con ello poder seleccionar la cepa que obtenga mejores resultados, y evaluarlas en conjunto con otras prácticas culturales, genéticas, orgánicas e incluso químicas, para disminuir las pérdidas ocasionadas por estos y otros fitopatógenos.

IV. Anexos



Figura 1. Plantas con marchitez y clorosis colectadas en campo. A) Frijol pinto; B) Tomate amarillo manzano y C) Chile criollo apaxtleco.

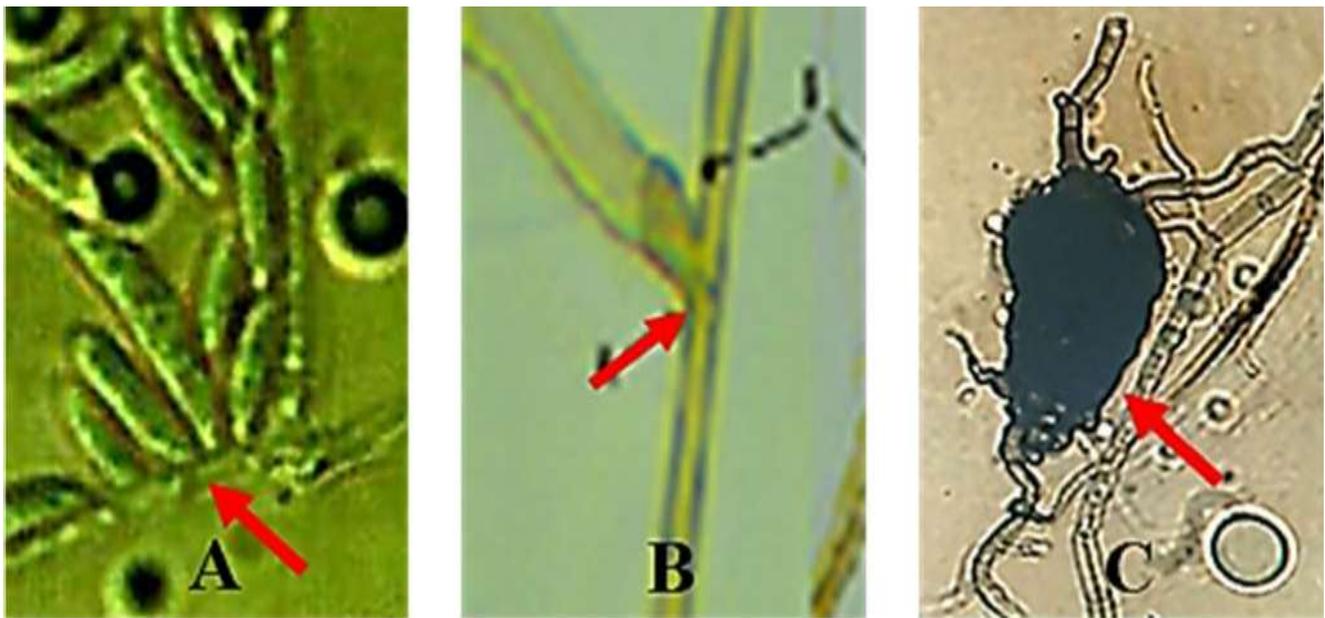


Figura 2. Estructuras morfológicas de importancia taxonómica de los aislamientos fúngicos obtenidos de muestras de raíces enfermas. A) Macroconidios de *Fusarium oxysporum*; B) Constricción de hifas de *Rhizoctonia solani*; C) Hifas y microesclerocio de *Macrophomina phaseolina*.



Figura 3. Pruebas de patogenicidad en plantas de frijol. Izquierda: Plantas sanas. Derecha: Plantas inoculadas con *F. oxysporum* después de 12 días de incubación.



Figura 4. Prueba de patogenicidad en plántulas de tomatillo. A la izquierda y derecha se muestran las plántulas inoculadas con *R. solani* a los 7 d.d.i.. R1, R2 y R3= repeticiones. O-H= olote con el hongo



Figura 5. Prueba de patogenicidad en plántulas de chile criollo. A) Plántula sana de 10 días de edad; B) Marchitez causada por *M. phaseolina*; D) Planta muerta a los 6 d.d.i.

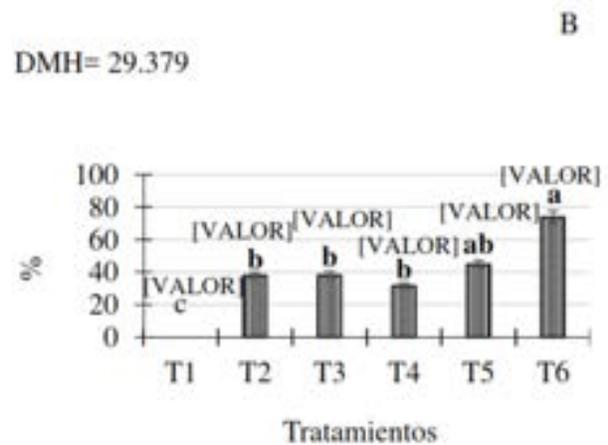
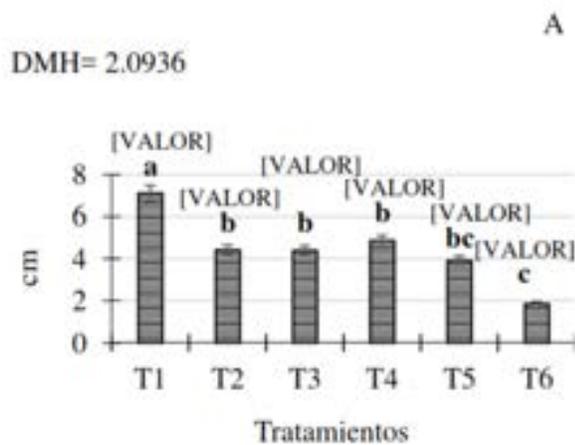


Gráfico 1. A) Crecimiento micelial, B) Porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* a las 192 h de ser expuesto a los metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp. T1= Testigo absoluto, T2=

Trichoderma sp. (Nativa de Mochitlán, Gro.), T3= *T. asperellum* (Nativa de Santa Teresa, Gro., T4= *T. virens* (PHC® RootMate®), T5= *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) y T6= *T. harzianum* (PHC® T-22®). DMH= Diferencia mínima honesta de Tukey. Columnas dentro de la misma variable, con la misma literal, no son estadísticamente diferentes (Tukey α 0.05).

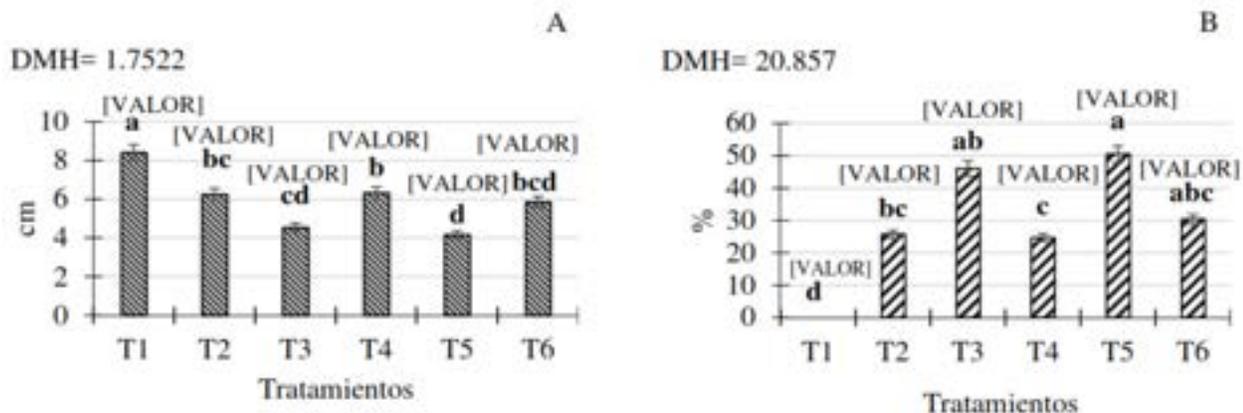


Gráfico 2. A) Crecimiento micelial, B) Porcentaje de inhibición de *R. solani* a las 72 h de ser expuesto a los metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp. T1= Testigo absoluto, T2= *Trichoderma* sp. (Nativa de Apipilulco, Gro.), T3= *T. asperellum* (Nativa de Santa Teresa, Gro., T4= *T. virens* (PHC® RootMate®), T5= *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) y T6= *T. harzianum* (PHC® T-22®). DMH= Diferencia mínima honesta de Tukey. Columnas dentro de la misma variable, con la misma literal, no son estadísticamente diferentes (Tukey α 0.05).

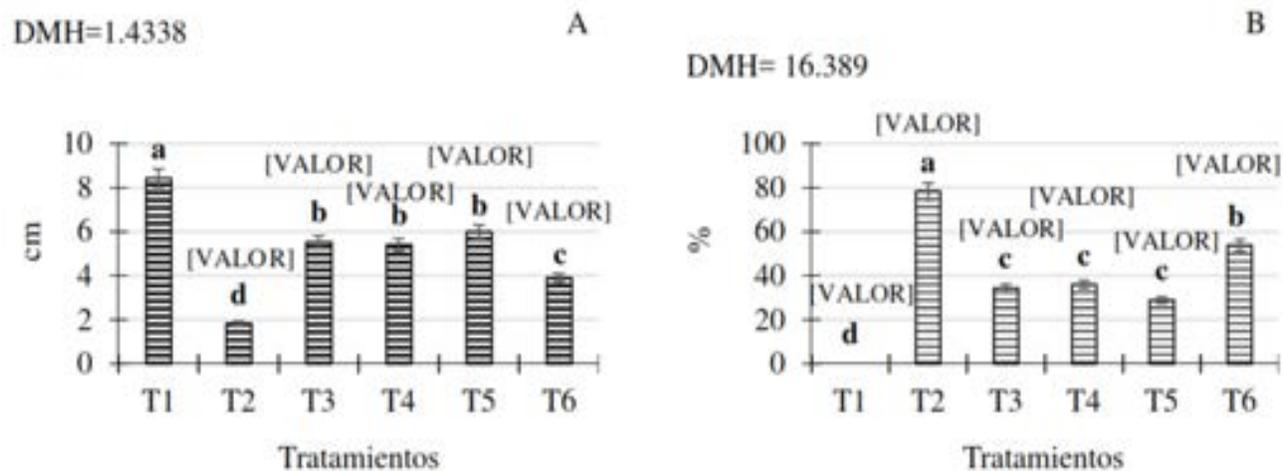


Gráfico 3. A) Crecimiento micelial, B) Porcentaje de inhibición de *M. phaseolina* a las 96 h de ser expuesto a los metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp. T1= Testigo absoluto, T2= *T. asperellum* (Nativa de Cocula, Gro.), T3= *T. asperellum* (Nativa de Santa Teresa, Gro., T4= *T. virens* (PHC® RootMate®), T5= *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) y T6= *T. harzianum* (PHC® T-22®). DMH= Diferencia mínima honesta de Tukey. Columnas dentro de la misma variable, con la misma literal, no son estadísticamente diferentes (Tukey α 0.05).

ALIMENTOS

Mayo 2018 - abril 2019 Vol. 6 No. 1 1-14
superando el efecto biocontrolador de las cepas comerciales.

V. Agradecimiento

Los autores agradecen extensamente al Laboratorio de Fitopatología del CEP-CSAEGro por el respaldo con material biológico, equipo y material de laboratorio necesarios para la realización de la presente investigación. Asimismo, a la T.L. Duvelsa Rodríguez Camacho, Ing. José Alfredo Flores Yáñez y Dr. José Francisco Díaz Nájera, por el gran apoyo para realizar el trabajo y preparar este documento.

VI. Conclusiones

Se diagnosticó morfológicamente que *Fusarium oxysporum* (*Fo*), *Rhizoctonia solani* (*Rs*) y *Macrophomina phaseolina* (*Mp*), son agentes causantes de infección de raíz en plantas de frijol, tomate y chile en cultivos establecidos en Mochitlán, Apipilulco y Cocula, Gro., respectivamente.

Los aislamientos puros de los hongos *Fo*, *Rs* y *Mp* presentan patogenicidad en plantas sanas de frijol, tomatillo y chile, respectivamente.

Se obtuvieron en cultivo puro cepas de *Trichoderma* spp. Nativas de Mochitlán y Apipilulco, y *T. asperellum* nativa de Cocula, Gro.)

Todas las cepas empleadas de *Trichoderma* spp. en condiciones *in vitro* ejercieron efecto fungistático sobre *Fo*, *Rs* y *Mp*. Aunque, *T. harzianum* (PHC® T-22®) ejerció el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* mientras que la cepa *Trichoderma* sp. (Nativa de Mochitlán, Gro.) ejerció un menor control del patógeno; por otra parte, *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) fue la cepa que redujo en mayor medida el crecimiento de *Rs*, mientras que la cepa del biocontrolador originaria de la región de *Rs*, obtuvo un menor control; por último, la cepa de *T. asperellum* nativa de Cocula, Gro. Obtuvo el mayor efecto fungistático sobre *Mp*,

VII. Referencias

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. San Diego, California, USA. 593 pp.
- Alonso, G. A. K. 2013. Control químico y biológico *in vitro* de *Phytophthora parasítica* D. y *Fusarium oxysporum* S., en cítricos. Tesis de licenciatura. Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. 117 p.
- Aponte, Y. G., Salazar, A. L., Alcano, de J. M., Sanabria, H. N., Guzmán, J. J. y Gámez J. A. 2012. Evaluación en condiciones *in vitro* de la masa micelial de hongos fitopatógenos mediante el uso de filtrados de aislamientos de *Trichoderma* spp. *Agronomía Tropical*. 62(1-4): 17-24.
- Baird, R. E., Watson, C. E. and Scruggs, M. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease* 87: 563-566.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (2000). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third Ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA. 241 pp.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.

- Carvalho, C. D. D., Lobo, J. M., Martins, I., Inglis, W. P. and Mello, M. C. S. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*. 39(5): 384-391.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton B. E. and Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia *Mycologia*, 95(6): 1100–1140.
- Etebarian, H. R. 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of Charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal Agricultural Science and Technology*. 8(1): 243-250.
- Fernández, L. V. O. and López, P. J. A. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Centro Agronómico Tropical de Investigaciones y Enseñanza. Carballo M., y Guaharay F. Serie técnica. Manual técnico N° 53. Managua, Nicaragua. 162 p.
- Flores, Y. J. A. 2017. Etiología y control integrado de *Macrophomina pseudophaseolina* en Chile. Tesis de Licenciatura. Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. 207 p. Cocula, Guerrero, México.
- Gams, W. and Bissett. (2002). Morphology and identification of *Trichoderma*. En: Kubicek, Ch. P. and Harman, G. E. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Vol 1: Basic biology, taxonomy and genetics. (pp, 3-34). Taylor & Francis Inc. Bristol, PA. USA
- Guigón, L. C., Guerrero, P. V., Vargas, A. F., Carvajal, M. E., Ávila, Q. G. D., Bravo, L. 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. *Fitopatología Mexicana* 28(1): 87-96.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96(1): 190-194.
- Harman, G. E. and Kubicek, C. P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2 Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis. London, UK.
- Hesamedin, R. 2008. Biological control of root-rot of eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. *American-Eurasian Journal Agricultural Environment Science* 4(2): 218-220.
- Hjeljord, L. and Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G., Kubicek, C. (Eds.) *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 2. Enzymes, biological control and commercial applications. pp. 131-151. Taylor & Francis. London, UK.
- Hoda, M., Soliman, G. M., Abdel, F. and Metwally, E. A. 2016. Antagonistic Interactions Between the Foliar Pathogen *Botrytis fabae* Sard. and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Asian Journal of Plant Pathology*, 10: 21-28.

- Hoyos, C. L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. and Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*. 26: 451-458.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, L. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24(1): 10-84.
- Kubicek, P. C. and Harman, E. G. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1 Taylor y Francis, London, UK.
- Larralde, C. C., Santiago, M., Sifuentes, A., Rodríguez, I., Shirai, K. and Narváez, J. 2008. Control potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from *Sorghum* and common bean. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80(1): 167-177.
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. and Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofúngicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Protección Vegetal* 23(2): 118-125.
- McLean, K. L., Dodd, S. L., Sleight, B. E., Hill, R. A., Stewart, A. 2004. Comparison of the behavior of a transformed hygromycin resistant strain of *Trichoderma atoviride* with the wild-type strain. *NZ Plant Protect*. 57(1): 72-76.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp: 4-7.
- Montiel, G. L., Gonzales, F. F., Sánchez, G. B. M., Guzmán, R. S., Gámez, V. F. P., Acosta, G. J. A., Rodríguez, G. R., Simpson, W. J., Cabral, E. M. y Mendoza, E. M. 2004. Especies de *Fusarium* Presentes en Raíces de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con Daños de Pudrición, en Cinco Estados del Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23(1): 1-7.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T. and Maras, W.F.O. 1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press. USA. pp: 142-145.
- Oka, Y. and Yermiyahu, U. 2002. Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematology* 4(8): 891-898.
- Otadoh, A. J., Okoth, A. S., Ochanda, J. and Kahindi, P. J. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. Phaseoli. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13: 99-107.
- Patil, N. N., Waghmo de M. S., Gaikwad, P. S., Gajbhiye, M. H., Gunjal, A. B., Nawani, N. and Kapadnis, B. P. 2014. Potential of *Microbispora* sp. V2 as biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii*, the causative agent of southern blight of *Zea mays* L. (Baby corn) *in vitro* studies. *Indian Journal of Experimental Biology* 52(1): 1147-1151.
- Saeed, A. A., Naeem, A., Abdul, H., Sabaz, A. K., Rafiq, A., Muhammad, B., Muhammad, S and Ayesha, T. 2014. Biocontrol Efficacy of Different Isolates of *Trichoderma* against Soil Borne Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Polish Journal of Microbiology* 63(1): 95-103.

- Salazar, L. A., Aponte, G. Y., Alcano, J. M., Sanabria, H. N. y Guzman, J. J. 2012. Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela. *Agronomía Tropical*. 62(1-4): 7-15.
- Sánchez, A. H. 1983. Etiología y Daño de las Pudriciones Radicales del Frijol en el Estado de Durango. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 57 p.
- Singh, V., Ranaware, M. A. and Nimbkar, N. 2008. Bio efficacy of antagonists against root-rot fungus *Macrophomina phaseolina* of safflower. 7th International Safflower Conference Wagga Wagga Australia.
- Sivan, A. and Chet I. 1986. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *J. Phytopathol.* 116(1): 39-47.
- Smith, D. 2002. Culturing, Preservation and Maintenance of fungi. En: Waller, J. M.; Lenné, J. M. and Waller, S. J. (Eds.). *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3rd edition. (pp, 384-409). CABI Publishing New York, NY, USA.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 2015. SAS Inc. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute in corporation, Cary, N.C. USA: Author.
- Steel, G.D. y J. Torrie. H. 1998. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Segunda Edición. Mc Graw Hill. México, D. F. 392 pp.
- Thrane, C., Jensen, D. F. and Tronsmo, A. 2000. Substrate colonization, strain competition, enzyme production *in vitro*, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. isolates P1 and T3. *European Journal of Plant Pathology* 106: 215-225.
- Tovar, C. J. L. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma* spp. Frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Waller, J. M. 2002. Detection and Isolation of Fungal and Bacterial Pathogens. En: Waller, J. M.; Lenné, J. M. and Waller, S. J. (Eds.). *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3rd edition. (pp, 208-215). CABI Publishing New York, NY, USA.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultures fungi and key to species. Second edition. CRC Press. Boca Raton, Florida. USA. 486 pp.
- Zaki, M. J. and Ghaffar, A. 1988. Effect of *Rhizobium* spp. on *Macrophomina phaseolina*. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 30(4): 305-306.