

Identificación y antibiosis *in vitro* de *Trichoderma* spp., contra hongos fitopatógenos foliares.

AYVAR-SERNA, Sergio†*, ESTRADA-CORRALES, José Manuel, CORTES GALLEGOS, Wendy Vanesa, CASTRO JIMÉNEZ, María Isel.

Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero.

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

Resumen

Se colectaron muestras de jitomate indeterminado, rosal y guayaba que presentaban manchas necróticas. Se realizaron los Postulados de Koch (Agrios, 2005) para verificar la patogenicidad de cada aislamiento, para esta prueba, se utilizaron frutos sanos y maduros de jitomate y guayaba además rosas sanas. Mediante las características morfológicas se identificó al agente causal, adicionalmente se probó la antibiosis *in vitro* de cepas nativas y comerciales de *Trichoderma* spp., contra los patógenos aislados de jitomate, rosal y guayaba. De tallos de jitomate, se aisló e identificó a *Alternaria* sp., se comprobó que es patogénico cuando se inocula en frutos sanos; patogenicidad en frutos de jitomate; en rosal se identificó a *Colletotrichum* sp., el cual resultó ser patogénico cuando se inocula en rosas sanas, finalmente en guayaba se identificó a *Pestalotiopsis* sp. como patógeno de guayaba. En condiciones *in vitro* todas las cepas nativas y comerciales de *Trichoderma* spp. registraron actividad fungistática sobre *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. y *Pestalotiopsis* sp.; *Trichoerma asperellum* nativa de Cocula y chilapa obtuvieron la mayor inhibición de *Alternaria* sp.; *Trichoderma* sp. cepa nativa de San Marcos mostró el mejor control de *Pestalotiopsis* sp., finalmente *Trichoderma* sp. cepa nativa de Tixtla, Gro. Presentó la mayor inhibición de *Colletotrichum* sp. Aislado de rosal.

Palabras clave: Hongos fitopatógenos, Inhibición, metabolitos.

Abstract

Samples of indeterminate tomatoes, rose and guava that had necrotic spots were collected. The Postulates of Koch (Agrios, 2005) were carried out to verify the pathogenicity of each isolate, for this test, healthy and ripe fruits of tomato and guava were used in addition to healthy roses. The causal agent was identified by morphological characteristics, and *in vitro* antibiosis of native and commercial strains of *Trichoderma* spp. Was tested against the isolated pathogens of tomato, rose and guava. From tomato stems, *Alternaria* sp. Was isolated and identified, it was found to be pathogenic when inoculated on healthy fruits; pathogenicity in tomato fruits; in rosal *Colletotrichum* sp. was identified, which turned out to be pathogenic when inoculated in healthy beans, finally in guava we identified *Pestalotiopsis* sp. as a pathogen of guava. Under *in vitro* conditions all the native and commercial strains of *Trichoderma* spp. recorded fungistatic activity on *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. and *Pestalotiopsis* sp.; *Trichoerma asperellum* native to Cocula and chilapa obtained the highest inhibition of *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp. native strain of San Marcos showed the best control of *Pestalotiopsis* sp., finally *Trichoderma* sp. native strain of Tixtla, Gro. He presented the greatest inhibition of *Colletotrichum* sp. Isolated of rose.

Key words: Phytopathogenic fungi, inhibition, metabolites.

Citación: AYVAR-SERNA, Sergio, ESTRADA-CORRALES, José Manuel, CORTES GALLEGOS, Wendy Vanesa, CASTRO JIMÉNEZ, María Isel. Identificación y antibiosis *in vitro* de *Trichoderma* spp., contra hongos foliares fitopatógenos. Foro de Estudios sobre Guerrero 2019, mayo 2018 - abril 2019 Vol. 6 No. 1 49-61.

*Correspondencia al Autor: ayvarsernas@hotmail.com

† Investigador contribuyendo como primer autor.

I. Introducción

En todas las regiones de México los cultivos hortofrutícolas han registrado una alta incidencia de enfermedades foliares de origen fungoso, comúnmente son denominadas tizones; al respecto, Agrios (2005) expresó que este problema fitosanitario, si no se controla a tiempo, puede ocasionar una pérdida de la producción de hasta el 70%, además, este hongo es capaz de infectar a cualquiera de los órganos aéreos de la planta en cualquier etapa fenológica (Sánchez, 2010).

Convencionalmente los productores agrícolas hacen uso de una amplia gama de fungicidas químicos para el control de este y otros fitopatógenos, muchas veces lo hacen de una manera desmedida; estos productos son los preferidos por los productores debido a su alta eficacia, su accesibilidad y a que si se usan adecuadamente resultan rentables, aunque existen muchos aspectos negativos del uso de estos agroquímicos algunos de los cuales son que su uso repercute negativamente sobre el medio ambiente en general, no garantiza inocuidad en los productos que genera y pueden producir resistencia en los microorganismos patógenos.

Es por lo anterior que se deben de utilizar alternativas al uso de agroquímicos con el fin de disminuir sus aplicaciones y hacer la actividad agrícola cada vez más amigable con el medio ambiente; actualmente el uso de microorganismos benéficos para el control de enfermedades en las plantas ha mostrado resultados muy prometedores. *Trichoderma* sp. es un hongo que tiene un gran potencial para el control de hongos fitopatógenos como *Alternaria* spp., *Colletotrichum* sp., y *Pestalotiopsis* sp.

Al respecto, Harman (2006) menciona que, desde hace más de 70 años, se conoce que este hongo benéfico es capaz de atacar a otros hongos patógenos mediante la producción de enzimas con propiedades antimicóticas.

II. Objetivos

Lo mencionado anteriormente motivo la realización de la presente investigación, la cual se hizo con el objetivo de evaluar la efectividad de distintas cepas de *Trichoderma* spp. Para disminuir el crecimiento de hongos patógenos de origen foliar que afectan a jitomate, guayaba y rosál y generar información de utilidad para ensayos posteriores en invernadero para poder reducir las aplicaciones de fungicidas químicos en el control de este patógeno y disminuir el impacto negativo de la agricultura en el medio ambiente.

III. Metodología**Obtención de material vegetal enfermo**

En enero de 2017 se colectaron muestras de jitomate indeterminado genotipo el Cid de 4 meses de edad, muestras de rosál y hojas de guayaba que presentaban manchas necróticas, todas las muestras se colocaron dentro de bolsas de papel y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Estudios Profesionales (CEP) del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro) en donde se procesaron como se describe a continuación:

Aislamiento y purificación del hongo

De las muestras obtenidas tallo y hojas de jitomate, guayaba y rosál, se hicieron cortes de 2 cm que tuvieran tejido sano y tejido enfermó y para inducir el crecimiento del patógeno para poderlo aislar, se realizó la siguiente metodología:

Los cortes de las muestras de tallo y hoja se sumergieron en hipoclorito de sodio al

1% durante 1 minuto y para eliminar los residuos del desinfectante, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril; por otra parte, se colocó papel estéril en el fondo de una caja Petri, se humedeció con agua destilada estéril y encima se colocaron dos portaobjetos flameados en forma de cruz y en cada extremos de éstos se colocó un trozo de tejido vegetal infectado con el patógeno, las cajas Petri se sellaron, se etiquetaron y se incubaron durante 72 h a ± 26 °C.

Para aislar los hongos, se observaron bajo el microscopio simple las cámaras húmedas, se localizaron las estructuras reproductivas del microorganismo y con una aguja de disección se colocaron en un portaobjetos cavado que contenía una gota de agua destilada estéril, se observaron bajo el objetivo 40x del microscopio compuesto y dentro de una Campana de Flujo Laminar Vertical (CFLV) se estrió esta suspensión con un asa bacteriológica flameada sobre la superficie del PDA (Papa Dextrosa Agar) en una caja Petri. Se hicieron 5 repeticiones y se incubaron en el Laboratorio de Fitopatología del CEP-CSAEGro durante 72 h. Pasado este tiempo, se localizaron los crecimientos fungosos y dentro de la CFLV se tomaron puntas de hifa de las colonias fungosas y se sembraron al centro de una caja Petri con PDA.

Se realizaron 5 repeticiones las cuales se monitorearon durante 10 días para asegurar que el crecimiento fungoso estuviera libre de contaminantes; de esta manera se obtuvo el aislamiento monospórico del hongo.

Identificación morfológica del hongo

De una colonia pura de cada muestra de 10 días de edad del aislamiento, se tomaron muestras que se colocaron en el centro de un portaobjetos, se le agrego lactofenol y se depositó un cubre objetos encima de la muestra, procurando que no quedaran partículas de aire.

Se observó bajo el microscopio compuesto para localizar las estructuras

vegetativas y reproductivas del hongo, las cuales se compararon con las claves de Barnett y Hunter (2000) y Simmons (2007).

Prueba de patogenicidad

Se realizaron los Postulados de Koch (Agrios, 2005) para verificar la patogenicidad de cada aislamiento, para esta prueba, se utilizaron frutos sanos y maduros de jitomate y guayaba además rosas sanas, en todos los casos el hongo se multiplicó masivamente en 10 cajas Petri con PDA. Se utilizaron colonias de 240 h de edad.

Se preparó una cámara húmeda, con una caja de cartón de 30 × 30 × 15 cm la cual se limpió por dentro y por fuera con alcohol al 90%, se colocó un plástico en el fondo de la caja y encima de este se colocó papel absorbente humedecido con agua destilada estéril.

Obtención de las cepas de *Trichoderma* spp.

La cepa nativa del lugar de origen del patógeno, se obtuvo mediante la técnica de Salazar *et al.* (2012) y se identificó en base a las claves descritas por Kubicek y Harman (2002).

El resto de las cepas de *Trichoderma* spp. (nativas y comerciales) evaluadas en el presente estudio, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Estudios Profesionales (CEP) del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro).

Las cepas se reprodujeron en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Se utilizaron cepas de 48 h de edad.

Tratamientos de estudio

En los tres estudios se utilizaron diferentes cepas nativas y comerciales, las cuales se indica a continuación:

Ensayo en Jitomate

1) Testigo absoluto, 2) *Trichoderma* sp. (nativa de San Alejo, Edo. de México), 3) *T. asperellum* (nativa de Cocula, Gro.), 4) *T. asperellum* (nativa de Chilapa, Gro.), 5) *T. asperellum* (nativa de S. Teresa, Gro.), 6) *T. virens* (PHC RootMate[®]), 7) *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}), 8) *T. reesei* (BACTIVA^{MR}) y 9) *T. harzianum* (PHC T-22[®]).

Ensayo en guayaba

1) Testigo absoluto, 2) *Trichoderma* sp. (cepa nativa de Tixtla, Gro.), 3) *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula, Gro.), 4) *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa, Gro.), 5) *T. virens* (PHC[®] RootMate[®]), 6) *Trichoderma* sp. (FITHAN) y 7) *T. harzianum* (PHC[®] T-22[®]).

Ensayo en rosal

1) Testigo absoluto, 2) *Trichoderma* sp. (cepa nativa de Tixtla, Gro.), 3) *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula, Gro.), 4) *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa, Gro.), 5) *T. virens* (PHC[®] RootMate[®]), 6) *Trichoderma* sp. (FITHAN) y 7) *T. harzianum* (PHC[®] T-22[®]).

Diseño y unidad experimental

Los tratamientos evaluados quedaron distribuidos de acuerdo al diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri de 9 cm de diámetro por 1.5 cm de altura + 15 mL de PDA + los metabolitos producidos por la cepa correspondiente de *Trichoderma* spp. y un disco de 5 mm de PDA con el hongo patógeno aislado e identificado.

Técnica de papel celofán

Para extraer los metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. se empleó la técnica descrita por Patil *et al.* (2014), la cual consiste en colocar un círculo de papel celofán esterilizado sobre la superficie del PDA en una caja Petri, sembrar un disco de PDA + *Trichoderma* spp. sobre el celofán, incubar las cajas 48 h, posteriormente retirar el papel celofán junto con el micelio del hongo benéfico y de esta manera los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. Difundidos en el PDA. Por último, se siembra al patógeno sobre el PDA.

Variables de estudio

El efecto de los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. sobre el patógeno se midió con las siguientes variables:

Diámetro de la colonia fungosa. Cada 24 horas por 10 días se midió en cm el diámetro de las colonias fungosas del patógeno.

Porcentaje de crecimiento. Este se calculó por regla de 3 considerando al crecimiento de las colonias fungosas del tratamiento testigo como el 100%.

Porcentaje de inhibición. Se calculó con la fórmula propuesta por Patil *et al.* (2014):

$$[(a - b) / a] \times 100$$

(1)

Dónde:

- a = Diámetro de la colonia del patógeno en los tratamientos testigo.
Diámetro de la colonia fungosa del patógeno creciendo sobre PDA, con metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* spp.
- b =

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de las variables mencionadas anteriormente, se les realizó el análisis de varianza de acuerdo al diseño experimental completamente al azar (Steel y Torrie, 1998) con el programa SAS (2015) y el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_j \quad (2)$$

Dónde:

Y_{ij} = Respuesta de la j -ésima unidad experimental con el i -ésimo tratamiento.

i = Subíndice de tratamiento. $i = 1, 2, \dots, 7 = t$

j = Subíndice de repetición. $j = 1, 2, \dots, 5 = r$

μ = Media general

t_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

e_j = Error experimental de la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento.

A las variables con diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos, se les realizó una prueba de rangos múltiples por el método de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

IV. Resultados

Ensayo en jitomate

Identificación morfológica

Del aislamiento puro del hongo en PDA, se observaron las siguientes características culturales: su crecimiento miceliar fue en promedio de 0.85 cm día^{-1} , sus colonias jóvenes eran de color blanquecino con micelio algodonoso y fueron tornándose a un color más oscuro conforme éstas fueron envejeciendo (Figura 1).

Al observar bajo el microscopio compuesto las muestras en lactofenol de una colonia pura del hongo aislado, se observaron las siguientes características morfológicas: micelio septado y ramificado con abundante producción de conidios en forma de granada (Figura 2), estas características morfológicas concuerdan con las reportadas por Simmons (2007) para el género *Alternaria* sp.

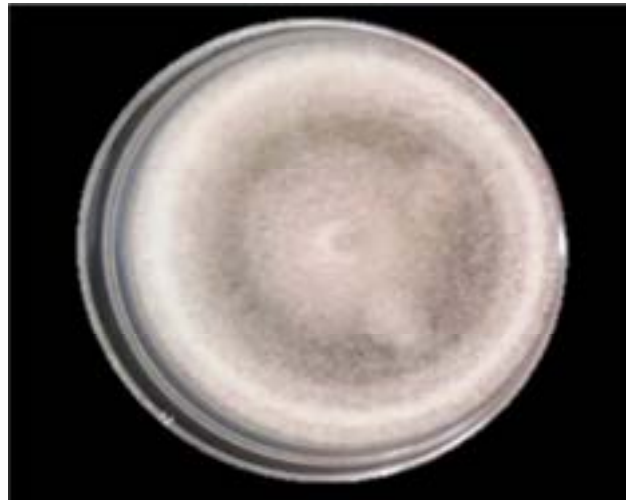


Figura 1. Colonia pura del hongo aislado de tallos de jitomate.



Figura 2. Características morfológicas de *Alternaria* sp.

Prueba de patogenicidad

En promedio, el aislamiento puro del hongo requirió de 7 días después de su inoculación en frutos de jitomate, para causarles manchas necróticas. Cabe mencionar que se observó que el hongo solo infectó a los frutos a los que se les realizaron heridas con sacabocado (Figura 3), mientras que los frutos sin heridas e inoculados con el microorganismo, no presentaron los síntomas de la enfermedad, lo que sugiere que este hongo necesita de heridas para poder penetrar en el tejido vegetal e infectarlo.



Figura 3. Prueba de patogenicidad. **A)** Fruto con herida de sacabocado + PDA estéril; **B)** Fruto con herida de sacabocado inoculado con el hongo; **C)** Fruto sin heridas inoculado con el hongo.

Porcentaje de inhibición

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$), de que *T. asperellum* (nativa de Cocula, Gro.), *T. asperellum* (nativa de Chilapa, Gro.), *T. virens* (PHC RootMate®), *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}) y *T. harzianum* (PHC T-22) fueron las cepas que inhibieron en mayor medida el crecimiento fungoso del patógeno, obtuvieron porcentajes de inhibición de: 58.82, 60, 49.8, 54.12 y 47.84%, respectivamente, aunque cabe resaltar que la máxima inhibición del patógeno fue de 60% como máximo (Figura 4), por lo cual podría esperarse que no ejerzan un buen control del hongo en condiciones de invernadero y tal vez sea necesario combinar las aplicaciones de estos microorganismos benéficos con otras medidas de control, como realizar buenas prácticas agronómicas para evitar producir heridas en las plantas de jitomate, debido a que se observó en la prueba de patogenicidad que *Alternaria* sp. Necesita de heridas para poder penetrar e infectar el tejido vegetal, e inclusive se debe de considerar realizar mezclas de *Trichoderma* spp.

Extractos orgánicos y fungicidas químicos para disminuir los daños causados por este fitopatógeno, aunque para poder hacerlo sería conveniente realizar de manera complementaria una prueba de compatibilidad de las cepas de *Trichoderma* spp. con los extractos vegetales y los fungicidas candidatos para el control de *Alternaria* sp.

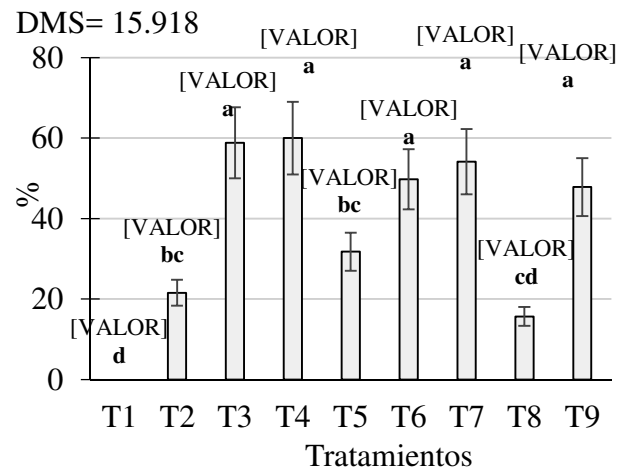


Figura 4. Porcentaje de inhibición de *Alternaria sp.* a las 240 h de iniciado el experimento. **T1:** Testigo absoluto; **T2:** *Trichoderma sp.* (Nativa de San Alejo, Edo. de México); **T3:** *T. asperellum* (nativa de Cocula, Gro.); **T4:** *T. asperellum* (nativa de Chilapa, Gro.); **T5:** *T. asperellum* (nativa de S. Teresa, Gro.); **T6:** *T. virens* (PHC RootMate®); **T7:** *Trichoderma sp.* (FITHAN^{MR}); **T8:** *T. reesei* (BACTIVA^{MR}) y **T9:** *T. harzianum* (PHC T-22®). DMS= Diferencia mínima significativa. Columnas con las mismas literales no son estadísticamente diferentes.

Ensayo en guayaba

Identificación morfológica del hongo

De las muestras de hojas con lesiones necróticas se aisló purificó e identificó a nivel género a *Pestalotiopsis sp.* (Figura 5) que de acuerdo con Barnett y Hunter (2000) se caracteriza por desarrollar micelio blanco algodonoso de joven y al madurar produce una gran cantidad de acérvulos negros en disposición radial de forma aleatoria o en círculos concéntricos sobre la superficie de PDA; produce conidios 5 septados, de coloración blanquecina de jóvenes y conforme van envejeciendo se van tornando de un color café oscuro, sus conidióforos son hialinos, ramificados irregularmente, septados, lisos y cortos, producen conidios oscuros rectos o ligeramente curvados, de forma elipsoidal que poseen 6 células (la basal y la apical son hialinas) la célula apical o terminal es puntiaguda y posee dos apéndices hialinos. Las colonias del hongo crecieron, en promedio, 0.3 cm día⁻¹ en medio de cultivo PDA.

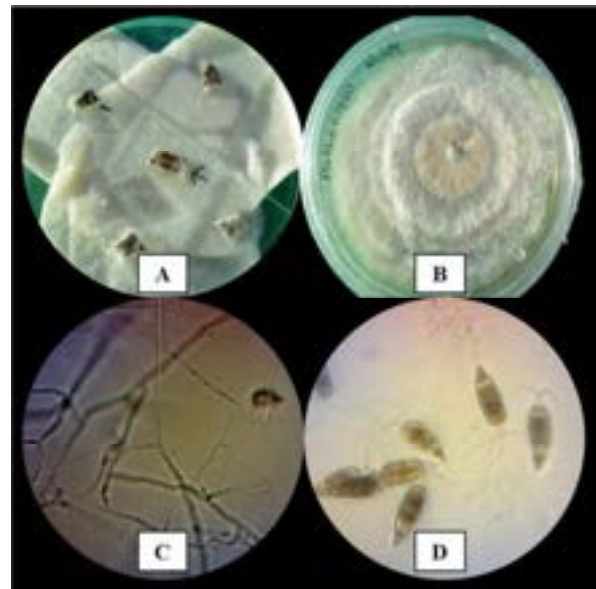


Figura 5. A) Cámara húmeda de trozos de hojas infectadas con *Pestalotiopsis sp.*; B) Cultivo puro de *Pestalotiopsis sp.*; C) Características morfológicas del micelio del hongo aislado vistas bajo el objetivo de 40x y D) Conidios característicos del género *Pestalotiopsis* observados bajo el objetivo de 40x.

Prueba de patogenicidad

Los postulados de Koch permitieron comprobar que el aislamiento purificado de *Pestalotiopsis sp.*, es patogénico cuando es inoculado en frutos sanos de Guayaba, debido a que provocó necrosis en el tejido infectado; los frutos de los tratamientos testigo permanecieron sanos (Figura 6); el reaislamiento del hongo efectuado a partir del tejido infectado, presentó las mismas características que el aislamiento originalmente inoculado, por lo cual se cumplió positivamente el protocolo de los postulados de Koch (Agrios, 2005).

Se observó que la severidad del microorganismo fue ligeramente mayor en los frutos a los que se le realizaron heridas con sacabocado seguidos de los frutos rasgados con una aguja de disección y por último en los

frutos inoculados sin heridas se observó una menor severidad del hongo, por contraparte, el tiempo para que se presentaran los síntomas de la enfermedad fue mayor en los frutos sin heridas (12 días) seguido de los frutos con heridas de aguja (10 días) y posteriormente los frutos heridos con sacabocado (8 días); lo anteriormente encontrado significa que la capacidad del hongo para penetrar el tejido vegetal de frutos de guayaba es débil, por lo tanto necesita de heridas para poder infectarlo.

Figura 6. Postulados de Koch realizados en frutos de guayaba. **T=** Frutos de guayaba utilizados como testigos; **Flechas=** Frutos inoculados con *Pestalotiopsis* sp.

Porcentaje de inhibición

El análisis de varianza de los datos de esta variable, mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) por efecto de los tratamientos, siendo la cepa *Trichoderma* sp. (nativa de San Marcos) la más efectiva contra *Pestalotiosis* sp., puesto que disminuyó 81.2% su crecimiento miceliar, por contraparte, *T. harzianum* contenida en el producto comercial PHC T-22, ejerció el menor porcentaje de inhibición (4.11%) del crecimiento del hongo patógeno (Figura 7).

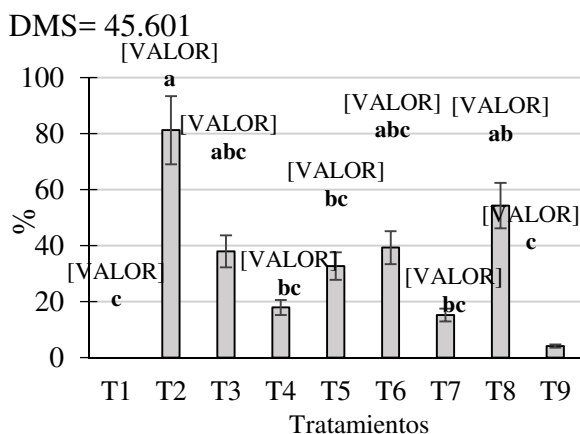


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. Por efecto

de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. **T1:** Testigo absoluto; **T2:** *Trichoderma* sp. (cepa nativa de San Marcos); **T3:** *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula); **T4:** *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa); **T5:** *T. asperellum* (cepa nativa de Santa Teresa); **T6:** *T. virens* cepa G-41. (PHC RootMate); **T7:** *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}); **T8:** *T. harzianum* (UNIFRUT) y **T9:** *T. harzianum* (PHC T-22). DMS= Diferencia mínima significativa. Columnas con las mismas literales no son estadísticamente diferentes.

Ensayo en rosal

Identificación morfológica del hongo

El hongo presentó un crecimiento promedio de 1.07 cm día⁻¹ en medio de cultivo PDA a $\pm 27^\circ\text{C}$; formó abundantes acérvulos en círculos concéntricos sobre la superficie del medio de cultivo, masas de conidios de una coloración rosácea o durazno de joven y cuando envejecen se tornaban a una coloración oscura, micelio septado color blanco y cuando tiene condiciones favorables produce apresorios, los conidios son unicelulares, elipsoidales, ligeramente acinturados, cortos, sin apéndices, no filiformes, hialinos, unidos en masas húmedas y viscosas (Figura 8) y producidos en la parte apical de los conidióforos; estas características corresponden a las reportadas por Barnett y Hunter (2000) para el género *Colletotrichum* sp.

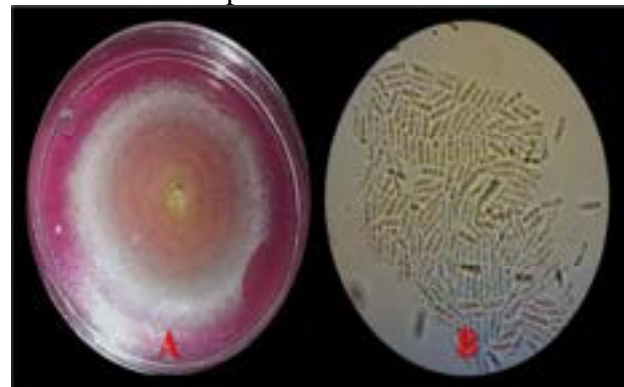


Figura 8. A) Colonia pura de *Colletotrichum* de 7 días de edad creciendo en medio de cultivo PDA; B) Conidios unicelulares hialinos típicos del género *Colletotrichum* (40x).

Prueba de patogenicidad

Los postulados de Koch permitieron comprobar que el aislamiento purificado de *Colletotrichum* sp., es patógeno al ser inoculado en flores sanas de *Rosa* sp. var. Alba, debido que a los 5 días después de su inoculación, se observaron manchas necróticas en los pétalos de las flores inoculadas (Figura 9), cabe mencionar que se observó un ligero aumento en el desarrollo de la enfermedad en las flores con heridas mecánicas inoculadas con *Colletotrichum* sp.

El reaislamiento del hongo efectuado a partir del tejido inoculado infectado, presentó las mismas características que el aislamiento original. En las rosas de tratamientos asperjadas solo con agua destilada estéril permanecieron sanas. Con respecto a lo obtenido en la presente investigación, Cabrera *et al.* (2006) mencionaron que la evolución de la enfermedad causada por *Colletotrichum falcatum* en rosal, se ve acelerada cuando existen heridas en hojas o flores de este cultivo.

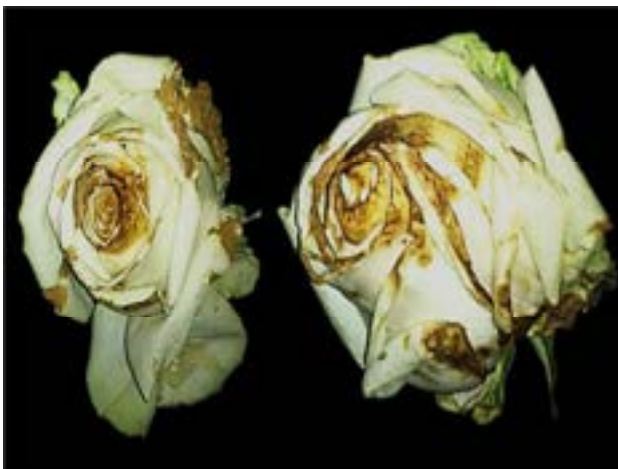


Figura 9. Manchas necróticas en pétalos de *Rosa* sp. var. Alba, ocasionados por *Colletotrichum* sp. a los 5 días después de su inoculación.

Porcentaje de inhibición

En cuanto a ésta variable, existieron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) por efecto de los tratamientos evaluados. *Trichoderma* sp. (cepa nativa de Tixtla, Gro.), *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula, Gro.) y *T. harzianum* (PHC® T-22®), fueron las cepas que provocaron la mayor inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp., con promedios de 40, 31 y 31.33%, respectivamente; por contraparte, las cepas *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa, Gro.), *T. virens* (PHC® RootMate®) y *Trichoderma* sp. (FITHAN) obtuvieron promedios de 23, 24 y 26.34%, respectivamente, siendo las menos eficaces para el control *in vitro* del fitopatógeno en cuestión (Figura 10).

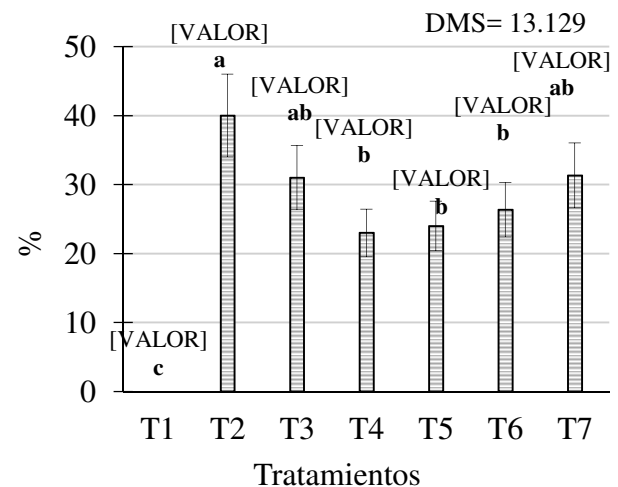


Figura 10. Datos promedio del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. a las 168 h después de ser sembrado sobre los metabolitos de *Trichoderma* spp. difundidos en PDA. T1: Testigo absoluto, T2: *Trichoderma* sp. (cepa nativa de Tixtla,

Gro.), **T3:** *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula, Gro.), **T4:** *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa, Gro.), **T5:** *T. virens* (PHC[®] RootMate[®]), **T6:** *Trichoderma* sp. (FITHAN) y **T7:** *T. harzianum* (PHC[®] T-22[®]). DMS= Diferencia mínima significativa. Columnas con las mismas literales son estadísticamente similares.

V. Discusión

Ensayo en jitomate

Infante *et al.* (2009) mencionaron que *Trichoderma* es un agente de control biológico y antagonista natural de hongos fitopatógenos de importancia económica, tales como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd. y Hans, *Botrytis cinerea* Pers, y *Alternaria* spp. La acción biocontroladora de este microorganismo se debe a que producen diversas enzimas que degradan las paredes celulares del patógeno liberando su contenido citoplasmático y provocando su muerte, las principales enzimas producidas por estos hongos, son quitinasas, glucanasas y proteasas (Küçük y Kivanç, 2004).

Camacho (2015) reportó resultados similares a los encontrados en la presente investigación, este investigador encontró que *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* disminuyeron 53 y 26%, respectivamente, el crecimiento micelial de *Alternaria porri*, por otra parte, Alfonso y Sandoval (2008) reportaron 93% de inhibición del crecimiento de *Alternaria alternata* en condiciones *in vitro*, con *Trichoderma* sp.

Ensayo en guayaba

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican que la cepa aislada de *Pestalotiopsis* sp., es susceptible a los metabolitos producidos por las cepas empleadas de *Trichoderma* spp. En especial a los producidos por la cepa aislada del lugar de

origen de este patógeno, lo que resalta la gran importancia de evaluar especies nativas de estos microorganismos benéficos.

Con respecto a lo obtenido en el presente estudio, Infante *et al.* (2009) mencionaron que la antibiosis ejercida por las especies del género *Trichoderma* se debe a la acción de metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles secretados por estos organismos, los cuales impiden el crecimiento micelial de hongos patógenos como *Pestalotiopsis* sp.; por su parte, Küçük y Kivanç (2004) mencionaron que las cepas de *Trichoderma* producen enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno liberando su contenido citoplasmático.

Ensayo en rosal

Desde la década de 1930s se reportó el potencial que poseen especies de *Trichoderma* como agentes de control biológico de patógenos de plantas (Weindling, 1932); La antibiosis de las especies de *Trichoderma* spp. se basa en la producción de metabolitos tóxicos y antibióticos como la gliotoxina, viridina, trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina; que son responsables de inhibir el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum* spp. (Infante *et al.*, 2009).

Küçük y Kivanç (2004), mencionaron que enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, producidas por *Trichoderma* spp.,

son las principales responsables de degradar las paredes celulares de hongos patógenos y liberar su contenido citoplasmático ocasionándoles la muerte; por su parte, Sanz *et al.* (2005) reportaron que la enzima β -1,3 glucanasa, está estrechamente relacionada con la degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos, además, 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*.

La capacidad que posee *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a éstos metabolitos, aspecto relevante desde el punto de vista práctico. Estos resultados ejemplifican la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo benéfico (Martínez *et al.*, 2013).

Admasu (2014) en un experimento similar al realizado, encontró que *T. harzianum* inhibió 57.9 % el crecimiento de *C. gleosporioides*, lo cual es una evidencia positiva del potencial de estos hongos benéficos como agentes de control biológico para el manejo de la antracnosis. Por otro lado, Joshi y Misra (2013) evaluaron el efecto de metabolitos no volátiles y volátiles de *Trichoderma* spp., y reportaron promedios de 51.5 y 14.7% de efectividad para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum falcatum* Went respectivamente, lo cual sugiere que los metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma* spp., resultan más efectivos en el control de éste patógeno.

VI. Agradecimiento

Se agradece extensamente al Laboratorio de Fitopatología del CEP-CSAEGro por proporcionar las cepas de

Trichoderma spp. Evaluadas en esta investigación, así como por la facilitación de todos los reactivos, y material de Laboratorio necesario durante el desarrollo del presente trabajo. Del mismo modo se agradece la amplia colaboración a la T. L. Duvelsa Rodríguez Camacho, al Dr. José Francisco Díaz Nájera y al Ing. José Alfredo Flores Yáñez por el apoyo en la integración del documento.

VII. Conclusiones

Ensayo en jitomate

Se identificó a *Alternaria* sp. Como causante de necrosis en tallos de jitomate, además su comprobó su patogenicidad en frutos de esta hortaliza.

Alternaria sp. Presentó un ritmo de crecimiento de 0.85 cm día⁻¹ en promedio, en medio de cultivo PDA y a ± 26 °C.

Trichoderma sp. (nativa de San Alejo, Edo. de México), *T. asperellum* (nativa de Cocula, Gro.), *T. asperellum* (nativa de Chilapa, Gro.), *T. asperellum* (nativa de S. Teresa, Gro.), *T. virens* (PHC RootMate[®]), *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}), *T. reesei* (BACTIVA^{MR}) y *T. harzianum* (PHC T-22[®]) ejercieron acción fungistática sobre *Alternaria* sp. en condiciones *in vitro*.

T. asperellum (nativa de Chilapa, Gro.) fue la cepa que presentó la mayor inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria* sp.

Ensayo en guayaba

Se identificó morfológicamente a *Pestalotiopsis* sp., esta cepa pura fue capaz de causar pudrición cuando se inoculó en frutos sanos de guayaba.

Las heridas ocasionadas en frutas de guayaba favorecieron la infección y la severidad de *Pestalotiopsis* sp., en frutos de guayaba inoculados.

Trichoderma sp. (cepa nativa de San Marcos), *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula), *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa), *T. asperellum* (cepa nativa de Santa Teresa), *T. virens* cepa G-41. (PHC RootMate), *Trichoderma* sp. (FITHAN^{MR}), *T. harzianum* (UNIFRUT) y *T. harzianum* (PHC T-22) ejercen acción fungistática sobre *Pestalotiopsis* sp. En condiciones *in vitro*.

La cepa de *Trichoderma* sp. aislada del lugar de origen del patógeno resultó más eficaz para su control en condiciones *in vitro*.

Ensayo en rosal

El cultivo puro del aislamiento se identificó morfológicamente como *Colletotrichum* sp., éste hongo fue capaz de producir manchas necróticas en flores de *Rosa* sp. var. Alba, a los 5 días después de ser inoculado, la enfermedad evoluciono más rápido en flores con heridas mecánicas.

Trichoderma sp. (cepa nativa de Tixtla, Gro.), *T. asperellum* (cepa nativa de Cocula, Gro.), *T. asperellum* (cepa nativa de Chilapa, Gro.), *T. virens* (PHC[®] RootMate[®]), *Trichoderma* sp. (FITHAN) y *T. harzianum* (PHC[®] T-22[®]), en condiciones *in vitro* ejercieron efecto fungistático sobre el patógeno aislado e identificado.

La cepa *Trichoderma* sp. (cepa nativa de Tixtla, Gro.), ejerció el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp.

VIII. Referencias

Admasu, W., Sahile, S. y Kibret, M. 2014. Assessment of potential antagonists for anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease of mango (*Mangifera indica* L.) in North Western

Ethiopia (Pawe). Taylor y Francis Online. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 47(18): 2176-2186.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. San Diego, California, USA. 593 pp.

Alfonso, P. D. P. y Sandoval, S. E. R. 2008. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Tesis de licenciatura. Pontificia universidad javeriana. Bogotá, Colombia.

Barnett, H. and Hunter, B. 2000. Illustrated genera of imperfect fungi. Third Ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA. 241 pp.

Cabrera, M. G., Álvarez, R. E., Sosa, C. y Nélica, T. 2006. Patologías que afectan a *Rosa* sp. en Corrientes, Argentina. Nota científica. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

Camacho, L. V. 2015. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. Sobre *Alternaria porri* y su efecto en la actividad enzimática de cebolla. Instituto politécnico nacional.

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96(1): 190-194.

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.

Joshi, D. y S. Misra. C. 2013. Characterization of *Trichoderma* Isolates from Sugarcane Agro-Ecosystem and their Efficacy Against *Colletotrichum falcatum* Causing Red Rot of Sugarcane. SpringerLink. 15(2): 192-196.

- Kubicek, P. C. y Harman, E. G. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1 Taylor y Francis, London, UK.
- Küçük, Ç. and Kivanç. M. 2004. *In vitro* Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum*. Turk J. Biol. 28(1): 111-115.
- 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., Infante, D. y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. 28(1): 1-11.
- 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.
- Salazar, L. A., Aponte, G. Y., Alcano, J. M., Sanabria, H. N. y Guzmán, J. J. 2012. Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela. Agronomía Tropical. 62(1-4): 7-15.
- Sánchez, M. A. C., 2010. Manejo de enfermedades del Tomate. Curso de INCAPA Manejo integrado de enfermedades de tomate, chile y papa. Pp. 22-39. [EN LÍNEA] Disponible en: <http://www.funprover.org/formatos/manualTomate/Manejo%20de%20Enfermedades%20del%20Tomate.pdf> Consultado el 22/08/2017.
- Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A. and Monte, E. 2005. Expression of an -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. FEBS Journal. 272: 493-499.
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. CBS Biodiversity Series 6. 775pp.
- 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.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22: 837-845.