

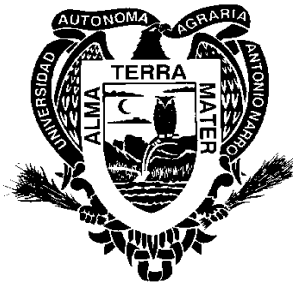
**MECANISMOS DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE
Trichoderma spp. SOBRE *Phytophthora capsici*,
Phytophthora cinnamomi y *Rhizoctonia solani* in vitro**

EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ

TESIS

**Presentada como requisito parcial para
obtener el grado de
Maestría en Ciencias
en Parasitología Agrícola**

**Universidad Autónoma Agraria
“Antonio Narro”**



PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Diciembre del 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIRECCIÓN DE POSTGRADO

**MECANISMOS DE LA ACTIVIDAD ANTAGONICA DE *Trichoderma spp.*
SOBRE *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* y *Rhizoctonia
solani in vitro***

TESIS

POR

EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:

Dr. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO

Asesor:

Dr. GABRIEL GALLEGOS MORALES

Asesor:

Dr. RAUL RODRIGUEZ HERRERA

Asesor

M.C. EMILIO PADRON CORRAL

Dr. JERÓNIMO LANDEROS FLORES

Director de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi “ALMA TERRA MATER” por brindarme la oportunidad de superarme y forjarme como hombre de bien y por abrirme puertas en cualquier lugar de México.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por sus conocimientos y sugerencias y por el apoyo brindado para la culminación de este trabajo de investigación.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera por sus sugerencias, orientación y opiniones aportadas para el término del trabajo.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales por sus aportaciones y sugerencias durante esta investigación.

Al M.C. Emilio Padrón Corral por su colaboración en al área estadística del trabajo de investigación.

A mis amigos, Ing. Alberto Díaz Díaz, y Biol. Reyna Ivonne Torres Acosta, son pocos pero muy valiosos.

A los laboratoristas T.L.Q. Cristina Sánchez Flores Nava y T.L.Q. Silvia Ovalle Nava por su valiosa colaboración y guía para la realización de los trabajos de laboratorio del experimento.

A las secretarias Tere y Yolanda por las facilidades que me dieron para el tramite para el examen de grado y por su motivación.

DEDICATORIAS

A **Dios**, por ser el guía de mi vida, porque siempre me ha acompañado en los momentos de triunfos y fracasos, gracias a Él, he podido ser lo que siempre anhelé, gracias Dios por concederme este sueño.

Con todo mi amor y respeto a mis padres.

Sra. Guadalupe Hernández Hernández

Sr. Agustín Osorio Martínez

A quienes dedico este humilde trabajo con profundo amor; a quienes me dieron lo más preciado en este mundo, “**LA VIDA**” pero en especial a mi madre quién siempre a estado conmigo en los buenos y en los malos momentos, a quien nunca tendré con que pagarle por todos los consejos, regaños y los malos momento que le he hecho pasar y a quien siempre esta al pendiente de mí, por todo esto gracias.....

A mis Hermanos (as)

German, Claudina, Rosaura, Isabel, Victorino, Patricia, Eulogia y Beatriz quienes me han acompañado en los momentos felices y difíciles en especial a mis hermanas quienes depositaron su confianza en mí y son una motivación para alcanzar mi meta.

A mis Tíos (as) Marcos, Mario y Estela que siempre me brindaron su confianza y por sus consejos tan acertadas para poder alcanzar mi meta.

A mi novia **Martha Emilia Ocaña** por darme la oportunidad de ser parte de su confianza y animo

COMPENDIO

**MECANISMOS DE LA ACTIVIDAD ANTAGONICA DE *Trichoderma* spp.
SOBRE *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* y *Rhizoctonia solani* *in vitro***

POR:

EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA
UNIVERSIDAD AUTONÓMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. Diciembre 2009

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo– Asesor

Palabras clave: *Trichoderma*, Antagonista, Antibiosis, Compuestos volátiles

Se determino el efecto antagónico de 31 aislados de *Trichoderma* de diferentes regiones de México. Para ello se establecieron ensayos por confrontación en papa dextrosa agar (PDA) entre cada aislado de *Trichoderma* contra *P. capsici*, *P. cinnamomi* y tres cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO56). Se observo que 13/31 cepas de

Trichoderma muestran un buen nivel de competencia (100%) contra *P. capsici*, mientras que para *P. cinnamomi* 24/31 tienen buen nivel de competencia, en las tres cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO56) se observó que *Trichoderma asperellum* (T18) mostró buena actividad antagonista. En ensayo de sustancias volátiles se observó que *Trichoderma* muestra efecto inhibitorio sobre *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *R. solani* (HSO56) destacando ciertas cepas de *Trichoderma*. El sobrenadante de crecimiento de 7/14 cepas de *Trichoderma* mostró efecto inhibitorio sobre *P. capsici*, y solo 2/14 mostraron inhibición sobre *P. cinnamomi*, y 5/14 inhiben a *Rhizoctonia solani* (HSO56). Se identificó a nivel especie 13 de los 14 cepas las cuales 11 son de *T. asperellum*, uno *T. hamatum*, uno *T. rossicum*.

ABSTRACT

**MECHANISMS OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *Trichoderma* spp.
AGAINST *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* and
Rhizoctonia solani in vitro**

BY:

EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ

**MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL
PARASITOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 2009

Ph. D. Francisco Daniel Hernández Castillo– Adviser-

Keywords: *Trichoderma* antagonist, antibiosis, volatile compounds.

Abstract

It was determined the antagonistic effect of thirty one *Trichoderma* strains from different regions of México. In this were established by comparison tests in potato dextrose agar (PDA) between each *Trichoderma* strain and *P.*

capsici, *P. cinnamomi* and three strains of *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 and HSO56). It was observed that *Trichoderma* strains 13/31 showed a good level of competence (100%) against *P. capsici*, twenty-four/thirty-one for has a good level of competency against were *P. cinnamomi*, the three strains of *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 and HSO56) inhibited by *Trichoderma asperellum* (T18). In the volatile test showed that *Trichoderma* inhibited effect *P. capsici*, *P. cinnamomi* and *R. solani* (HSO56) highlighting certain *Trichoderma* strains. The supernatant from growth of seven/fourteen strains of *Trichoderma* showed inhibitory effect on *P. capsici*, and only two/fourteen showed inhibition on *P. cinnamomi*, and five/fourteen inhibited *Rhizoctonia solani* (HSO56). Eleven *Trichoderma* strains were identified as *T. asperellum*, one as *T. hamatum*, and one a *T. rossicum*.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- OBJETIVOS.....	3
III.- HIPÓTESIS.....	3
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
<i>Phytophthora capsici</i>	4
Importancia Económica.....	4
Etiología.....	5
Epidemiología.....	6
Síntomas.....	6
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	7
Importancia Económica.....	7
Etiología.....	8
Epidemiología.....	9
Síntomas.....	9
<i>Rhizoctonia solani</i>	10
Importancia Económica.....	10
Etiología.....	11
Epidemiología.....	12

Síntomas.....	13
Metodos de control.....	14
Control Fisico.....	14
Control Cultural.....	15
Control Genetico.....	16
Control Quimico.....	17
Control Biológico.....	18
Importancia del control biológico.....	19
Genero <i>Trichoderma</i>	19
Etiología.....	20
Importancia económica de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
Mecanismos de Acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
Antagonismo.....	22
Micoparasitismo.....	23
Antibiosis.....	23
Compuestos Volátiles.....	24
V.- ARTICULO.....	25
MECANISMOS DE LA ACTIVIDAD ANTAGONICA DE <i>Trichoderma</i> spp. SOBRE <i>Phytophthora capsici</i> <i>Phytophthora cinnamomi</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> In vitro...	25
VI.- LITERATURA CITADA.....	57
VII.- APÉNDICE.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1.- Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i> , días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.....	38
2.- Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.....	43
3.- Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> TJ53, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.....	48
4. Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> ACH42, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.....	50
5. Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> HSO56, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.....	51
6. Especies de <i>Trichoderma</i> y su porcentaje de similitud.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pàg.
1.- Comparacion de medias del porciento de inhibición de <i>Phytophthora capsici</i> por compuestos volátiles producidos por 31 cepas de <i>Trichoderma</i> y el TEST (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si (Tukey, $P \leq 0.0001$).....	40
2.- Comparación de medias del porciento de inhibición de <i>Phytophthora capsici</i> por compuestos toxicos de 14 aislados de <i>Trichoderma</i> y el TEST (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).....	42
3.- Comparación de medias del porciento de inhibición de <i>Phytophthora cinnamomi</i> por compuestos volátiles producidos por 31 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 10 días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).....	45
4.- Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial <i>Phytophthora cinnamomi</i> por compuestos tóxicos de 14 aislados de <i>Trichoderma</i> y el Test (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).....	47

Figura	Pàg
<p>5.-Comparacion de medias del porciento de inhibición de <i>Rhizoctonia solani</i> (HSO56) por compuestos volátiles producidos por 31 cepas de <i>Trichoderma</i> a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si (Tukey, $P \leq 0.0001$).....</p>	54
<p>6.- Comparación de medias del porciento de inhibición de <i>Rhizoctonia solani</i> (HSO56) por compuestos toxicos de 14 aislados de <i>Trichoderma</i> Y Test (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).....</p>	55

INTRODUCCIÓN

Muchos de los hongos habitantes del suelo subsisten en las plantas vivas y causan grandes pérdidas a diversos cultivos. Estos pueden dañar las raíces y otras partes subterráneas de las plantas e interferir seriamente su desarrollo. Entre estos patógenos del suelo que causan grandes pérdidas están: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, los que afectan una gran cantidad de cultivos, algodón, arroz, cacahuate, café, cebolla, chile, tabaco, tomate, papa, aguacate etc., (Agrios, 2005). *P. capsici* puede llegar a causar pérdidas de un 60 a 100 % cada año en el cultivo de chile (Guillen *et al.*, 2006); otros de los patógenos de gran importancia económica es *P. cinnamomi*, este patógeno tiene incidencias de 45 y 90% en el cultivo de aguacate en estados como Morelos y Puebla (Ochoa *et al.*, 2005); patógenos como *Rhizoctonia solani* para el cultivo de papa llegan a tener incidencias en tallos en 35% y en tubérculos 97.7% (Hernández *et al.*, 2008).

Actualmente, las medidas utilizadas para el control de las enfermedades del suelo es con el uso de productos químicos, sin embargo el uso indiscriminado de estos ha tenido grandes consecuencias ya que se han encontrado aislamientos de hongos resistentes a fungicidas, como es el caso del ingrediente activo Pencycuron sobre *Rhizoctonia solani* (Hernández, *et al.*, 2005), y el matalaxil en patógenos como *Phytophthora* sp. (Riveros, *et al.*, 2003). También hay evidencia importante de una grave contaminación derivada de los plaguicidas, que no sólo afecta a la flora y la

fauna que se ha expuesto en forma significativa a dichas sustancias, así mismo han contribuido al deterioro en la calidad del aire, agua, suelo y alimentos, así como también en la salud de jornaleros y consumidores (Hausbeck y Lamour, 2004; Parra y Ristaino, 1998; Riveros *et al.*, 2003). La incorporación de agentes de control biológico (antagonistas) al suelo tales como *Trichoderma* spp. es ampliamente conocida como método de lucha contra enfermedades causadas por hongos de suelo. Hay evidencias que indican que *Trichoderma* spp. tiene amplio rango de acción e induce la supresión de varios fitopágenos como: *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium*, *Mycosphaerella fijiensis*, entre otros (Arzate, *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007; Ezziyyani *et al.*, 2004; Djonovic *et al.*, 2006, López *et al.*, 1999, Sempere *et al.*, 2007, Zavaleta, 1999).

El amplio espectro de *Trichoderma* como antagonista de fitopatógenos se le atribuye a sus distintos mecanismos, estos pueden ser por micoparasitismo, competencia (espacio y nutrientes), por la producción de metabolitos secundarios o enzimas (glucanasas, quitinasas) o por la inducción de resistencia sistémica en plantas, (Howell, 2003; Harman, 2005; Michel *et al.*, 2005; Tondje *et al.*, 2007). En la actualidad ya se cuentan formulados a base de *Trichoderma*, sin embargo estos no han sido efectivos para el control de un amplio rango de fitopatógenos, además que solo se puede aplicar en ciertas regiones de México.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. contra y *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* y *Rhizoctonia solani* *In vitro*.
2. Identificar las cepas de *Trichoderma* spp. a nivel especie por secuenciación de la Region 18S rDNA.

HIPÓTESIS

1. Al menos uno de los aislados de *Trichoderma* spp. tendrá diferente actividad antagónico sobre los hongos fitopatógenos de suelo.
2. Existirá más de una especie de *Trichoderma* entre los aislameinto evaluados.

REVISIÓN DE LITERATURA

Phytophthora capsici

Importancia Económica

Este agente fitopatogeno, fue encontrado por primera vez en Nuevo México, E.U.A., atacando a cultivos de chile. En México fue descubierto por Galindo (1956) atacando plantaciones de chile en los campos de la Escuela Nacional de Agricultura de Chapingo, México; en los años siguientes se encontró en calabaza y calabacita en la misma región por Romero-Cova (1988) (Cruz *et al.*, 2000; Lagunas *et al.*, 2001).

P. capsici L. es el principal causante de la marchitez del chile de plantas en etapas de prefloración y en estado de maduración del fruto; se le ha encontrado responsable a nivel nacional de la disminución de los rendimientos, ocasionando perdidas considerables bajo condiciones de lluvias frecuentes (Romero 1993). Algunos componentes de esta interacción planta-patógeno se han identificado, como la capsiceina, una elicitorina producida por *P. capsici* y enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas en *Capsicum annum*, sin embargo, poco se conoce de las bases moleculares de la patogenicidad de este hongo (Bailey *et al.*, 2001).

Etiología

El ciclo biológico de este patógeno inicia con la germinación de las oosporas mediante un tubo germinativo que termina en un esporangio después de haber pasado su período de reposo (Ramírez *et al.*, 1980). El micelio es bien desarrollado, con hifas cenocíticas y robustas. Los esporangios son ramificados y generalmente ovoides, piriformes, limoniformes, elipsoides, esféricos o irregularmente elongados, con papilas prominentes, simples y apicales, algunas veces con más de tres y variablemente dispuesta; su germinación normalmente es por zoosporas y bajo condiciones especiales por tubos germinativos. El tamaño del esporangio es extremadamente variable midiendo de 35 a 85 μ . Es una especie con oogonios esféricos, terminales; anteridios claviformes, terminales, anfígenos, oosporas lisas y apleróticas (Alexopoulos *et al.*, 1996). También produce clamidosporas esféricas como estructuras de resistencia a las condiciones adversas (Nuez *et al.*, 2003).

La enfermedad se caracteriza por la presencia de zoosporas de tipo A1 o A2 capaces de nadar en agua y responsables en buena medida de la diseminación e infección del alga, o pueden existir dos micelios compatibles (A1 y A2) y aparearse para formar las oosporas, o continuar con el ciclo asexual formando esporangios en los tejidos infectados para luego liberar zoosporas y continuar con el ciclo siguiente, dentro del cual el agua de riego juega un papel importante, ya que, además de ser capaz de diseminar el inoculo en el campo, su exceso favorece el desarrollo de la enfermedad, siendo los ataques más graves en riego rodado que en riego por goteo. Los embalses y los canales de riego pueden estar contaminados, siendo esta

una posible vía de entrada del fitopatógeno en la parcela (Ramírez *et al.*, 1980; Gómez, 2000).

Epidemiología

P. capsici puede sobrevivir en el suelo por medio de clamidosporas (esporas de conservación que dan origen a las infecciones primarias) o sobre restos vegetales. En efecto, el alga puede vivir saprofiticamente sobre los restos descompuestos de la planta; con los riegos sucesivos, produce esporangios y zoosporas que, distribuidas por el agua van difundiendo la enfermedad (Nuez *et al.*, 2003). *P. capsici* es un fitopatógeno sumamente agresivo a una temperatura óptima de 25 a 28°C y alta humedad, ya que puede destruir campos enteros de chile, calabaza, pepino, tomate, berenjena, etc., en un tiempo muy corto, debido a su gran velocidad de crecimiento y abundante esporulación (Romero, 1993; Pérez *et al.*, 2004).

Sintomatología

P. capsici puede provocar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. La podredumbre del cuello y la subsiguiente marchitez rápida son los síntomas más característicos. En el cuello de la planta enferma puede observarse una zona anular deprimida color negrusco que afecta primero los tejidos corticales y posteriormente a los vasculares. Esta lesión se desarrolla tanto en sentido ascendente como descendente a partir del punto de infección y termina produciendo la asfixia de la planta. Este fenómeno se produce de una forma rápida de modo que las hojas se muestran colgantes, pero conservando inicialmente su color verde. Infecciones a partir de puntos más altos en la planta, también han sido

señaladas, pero suelen ser menos frecuentes. En estos casos se producen por salpicaduras de gotas de agua portadoras de zoosporas que pueden germinar sobre tallos, hojas y frutos, en éstos a través de la inserción peduncular o de heridas (García, 1996; Nuez *et al.*, 2003).

Phytophthora cinnamomi

Importancia Económica

P. cinnamomi fue descrito por Rands en 1922 en árboles de canela (*Cinamomum burmanii*) en Sumatra, y posteriormente se ha reportado en 67 países reconociéndose como uno de los patógenos de plantas más cosmopolitas y destructivos. Su acción se intensifica en terrenos húmedos, escasos en oxígeno y a una temperatura de 25-30°C, siendo esta especie la de mayor rango de hospederos y la de más distribución en el mundo (Edwin *et al.*, 1996).

En 1927 se observó por primera vez en Puerto Rico atacando aguacate, en 1940 se informa de su existencia en Sudáfrica, para 1942 fue aislado de aguacate en California, y para 1951 se le encontró en Honduras y en México. El origen de este patógeno ha sido controversial, ya que se ha considerado nativo de Sudamérica, Sudeste Asiático y Sudeste Australiano (Zentmyer, 1976); sin embargo, Gallegos (1983) supone que fue llevado de Australia a Centroamérica, Hawái, México, Guatemala y California con las primeras introducciones de 1871. La pudrición de raicillas ocasionada por *P. cinnamomi* ha sido encontrado en casi toda área donde se cultiva esta especie frutal (Zentmyer *et al.*, 1994). *P. cinnamomi* es un parásito

facultativo y cosmopolita, es decir, es un habitante natural de la mayoría de los suelos de todo el mundo; se alimenta de restos de cosecha en descomposición, pero bajo condiciones favorables puede atacar raíces vivas y cuello de más de 600 plantas de interés económico para el hombre incluyendo piña, durazno, manzano, mango, macadamia, papaya, azaleas, pino, ciprés, eucalipto y encino, entre otras (Téliz, 2000).

Etiología

P. cinnamomi presenta micelio cenocítico, muy toruloso, con vesículas globosas a piriformes, las hifas tienen un diámetro variable de 3.5 a 21.0 μm , la colonia micelial presenta aspecto de camelia, debido al crecimiento deprimido y algodonoso del micelio, que tiene lugar a intervalos regulares; esporangioforos simples o ramificados en simpodio. Las clamidiosporas son numerosas, esféricas, ovales, piriformes, frecuentemente en racimo. Los gametangios (anteridio y oogonio) se forman solo en cultivos duales entre aislamientos de aguacatero (A2) y aislamiento de papaya (A1); oogonios esféricos de 40 μm de diámetro, amarillo pálido al envejecer, anteridios subclaviformes largos de 21 x 23 x 17 μm y las oosporas casi llenan el oogonio. Las zoosporas tienen flagelos que les permiten nadar distancias cortas (25-35 mm) en agua o película de agua en los poros del suelo. Las zoosporas son de vida corta, pero se producen en números grandes y es probablemente la causa de las nuevas infecciones (Edwin *et al.*, 1996).

Epidemiología

Las clamidiosporas actúan como "semillas" de propagación y son resistentes a condiciones adversas del ambiente como sequía, temperaturas

bajas, falta de alimento, etc, (Téliz, 2000). El patógeno puede ser diseminado de varias maneras, como lo son: movimiento del suelo en vivero, agua, la que puede llevar zoosporas y otros propagulos e infectar trozos de raíces, y ocasionalmente por semillas provenientes de frutos infectados (Ochoa *et al.*, 2006).

La humedad del suelo es un factor clave en el ciclo de la enfermedad, el alto contenido de humedad del suelo favorece la liberación de zoosporas desde los esporangios, el agua facilita el movimiento de las zoosporas hacia la superficie de las raicillas absorbentes. Así mismo, la liberación de exudados radiculares crea un gradiente quimiotáxico capaz de atraer un gran número de zoosporas (Ochoa *et al.*, 2006). La atracción primaria es aparentemente por aminoácidos exudados de las raíces de esa área, siguiendo la atracción y enquistamiento de las zoosporas sobre raíces de aguacate susceptibles y la invasión toma lugar a través de penetración inter e intracelular, las lesiones aparecen en 24 h y el micelio es encontrado a lo largo de las raicillas después de 72 h (Zentmyer *et al.*, 1994).

Sintomas

El fitopatogeno vive en el suelo y pudre las puntas de raíces con diámetro menor de 5 mm produciendo una coloración café negruzca. Las raíces dañadas se quiebran fácilmente. La absorción del agua y transporte ascendente se reduce y este es el origen de los síntomas en el follaje. La falta de agua también reduce la capacidad de las hojas para formar la clorofila, que les da el color verde y esto es causa de la clorosis o amarillamiento de las hojas. El fruto que se infecta por salpique de agua o

contacto con el suelo infectado presenta una pudrición firme de coloración café o negro (Téliz, 2000). Los síntomas externos son: decaimiento progresivo del árbol, las hojas, son pequeñas, pálidas o amarillentas y a menudo se marchitan. Ocurre una defoliación progresiva de los árboles, con carencia de nuevos crecimientos y disminución en la producción de frutos, los cuales son pequeños y de mala calidad; las ramas se secan y se defolian en la copa. Las raíces primarias y secundarias se vuelven quebradizas con coloraciones rojizas-castañas, por lo que la destrucción lenta del sistema radicular lleva finalmente a la muerte del árbol (Ochoa, 2005).

***Rhizoctonia solani* Kühn**

Importancia Económica

R. solani tiene una distribución mundial, y ocasiona pérdidas en plantas anuales, hortalizas, ornamentales y plantas perennes, *R. solani* también puede causar lesiones en el tallo en más del 90% de las plantas y reducir significativamente el rendimiento hasta en un 31,5% (Carling *et al.* 1986). Este patógeno está presente en todas las áreas productoras de papa, provoca cáncer de tallo y estolón, como costras sobre los tubérculos (Hooker 1986), además reduce la emergencia de los brotes, el vigor de la planta y frecuentemente, los tubérculos infectados se agrietan o se deforman (Powelson *et al.* 1993). *Rhizoctonia solani* es una enfermedad endémica al cultivo de la papa que provoca importantes pérdidas. *R. solani* sobrevive de una temporada a otra en el suelo y sobre los tubérculos-semilla, existiendo la

posibilidad que la planta sea atacada por el inóculo de suelo y/o de semilla desde la emergencia hasta la cosecha (Warton *et al.*, 2007).

Etiología

La enfermedad es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn. (fase asexual), *Thanatephorus cucumeris* (Frank.) Donk. (fase sexual). *R. solani*, pertenece a la Clase Hyphomycetes; es la fase patogénica y se caracteriza porque no produce conidias, las hifas son de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación tiene una constricción. *T. cucumeris* pertenece a la Clase Basidiomycetes. Las hifas de este hongo tienen la particularidad de anastomosarse, condición que se ha tomado en cuenta para clasificarlo en grupos de anastomosis (GA) (Parmeter *et al.*, 1969; Ogoshi y Ui, 1985). Hasta la fecha, se conocen 13 grupos de anastomosis de *R. solani*, sin embargo, el comportamiento del hongo no puede basarse solamente en términos de grupo de anastomosis; los grupos de anastomosis que afectan a la papa son GA2, GA3, GA4, GA5 y GA7 (Lehtonen, 2009). De estos, los más importantes son GA3 y GA4 (Warton *et al.*, 2007). El GA3 se caracteriza porque en la superficie de los tubérculos forma esclerocios (masas compactas de micelio, cuyas células han reducido su tamaño y adquirido el color negro por la presencia del pigmento melanina), soporta temperaturas bajas y afecta especialmente a la planta de papa y a las raíces de la cebada. El GA4, es el más patogénico, no forma esclerocios, soporta temperaturas más altas y afecta a muchos cultivos incluyendo papa (Anguis y Martin, 1990).

Epidemiología

R. solani se desarrolla bien en suelos húmedos, ácidos y con temperaturas bajas. Tiene gran capacidad saprofítica, logrando sobrevivir en forma de esclerocios por largos períodos de tiempo en condiciones desfavorables, siendo estas estructuras la principal fuente de inóculo para el inicio de la enfermedad (Prado *et al.*, 2001) y la forma más común de propagar el hongo es la siembra de tubérculos con esclerocios. La lluvia, el riego y las operaciones de labranza, aumentan la distribución del patógeno en el terreno (Garcés de Granada *et al.*, 2003). La formación de esclerocios sobre la superficie de los nuevos tubérculos ocurre en condiciones de buena humedad y temperatura óptima de 18 °C, sin embargo, el máximo desarrollo de esclerocios se produce cuando los tubérculos que se encuentran listos para ser cosechados, se mantienen en el campo por un tiempo prolongado (CIP, 1996).

Inicialmente los esclerocios presentes en el suelo son estimulados por exudados producidos por la actividad de crecimiento celular de las plantas y por la descomposición de residuos orgánicos. Estos emiten micelio que al entrar en contacto con la planta ataca la superficie externa; el proceso de infección es promovido por la producción de diferentes enzimas extracelulares que degradan varios componentes de la pared celular de las plantas como la celulosa, la quitina y la pectina. Después de este primer ataque, el hongo continúa su desarrollo en la superficie externa de la planta causando enfermedad por la formación de apresorios que penetran las células vegetales tomando nutrientes de ésta para continuar su crecimiento y desarrollo. Como el hongo destruye las células de las plantas, las hifas

continúan el crecimiento y colonización del tejido muerto, muchas veces formando nuevos esclerocios. El nuevo inoculó es producido dentro o fuera del tejido del hospedero, repitiéndose sucesivamente nuevos ciclos cuando nuevos tubérculos-semilla y el material vegetal están disponibles (Warton *et al.*, 2007).

Síntomas

Los síntomas típicos de la enfermedad costra negra en la papa incluyen la muerte de brotes pre-emergentes, cáncer de tallos subterráneos y estolones, disminución del sistema radical y la formación de esclerocios en tubérculos maduros y en formación (Tsor *et al.*, 2001). El hongo puede matar los brotes subterráneos anulando su emergencia, especialmente en suelos húmedos. Los brotes que emergen también se pueden infectar ocasionando la enfermedad llamada pudrición de tallo, evidenciándose por la formación de chancros en los tallos en desarrollo, los que a menudo presentan depresiones profundas que progresan hasta rodear completamente el tallo, llegando a estrangularlos produciendo volcamiento y muerte de la planta. El estrangulamiento de los tallos puede ocasionar retardo en el desarrollo de la planta, encrespamiento del ápice, pigmentación púrpura de los folíolos, formación de tubérculos aéreos y a menudo clorosis y amarillamiento que se manifiesta con mayor severidad en la parte apical de la planta. Las lesiones que se forman en los estolones son de color castaño oscuro y provocan la muerte de los mismos. Las raíces también son atacadas y destruidas. En la superficie de los tubérculos maduros se forman esclerocios de color negro o castaño oscuro. Los esclerocios son superficiales e irregulares en forma de terrones o “costra negra”, otros síntomas en los tubérculos incluyen grietas y

malformaciones (Rodríguez, 2001, Warton *et al.*, 2007). Esta enfermedad no siempre está asociada a reducciones en los rendimientos, pero la formación de esclerocios sobre los tubérculos reduce su calidad comercial, esto asociado con el desarrollo de tubérculos malformados, alteraciones en el tamaño y en el número de los mismos, lo cual resulta en pérdidas económicas considerables en el cultivo (Jeger *et al.* 1996).

Métodos de Control

Control Físico

En la lucha contra fitopatógenos se utilizan algunas técnicas que involucran varios procesos. Estos pueden corresponder al área biológica, cultural, física o química. Considerado el control físico mediante la solarización del suelo, la temperatura es un factor importante que ayuda a controlar microorganismos fitopatógenos, si se incrementa a 37 y 52 °C en los primeros centímetros del suelo que van de 0 a 10 cm. Además La solarización del suelo estimula el crecimiento vegetal debido a que las parcelas solarizadas contienen niveles más altos de nutrientes minerales solubles como nitrógeno amoniacal, nitrógeno nítrico, calcio y otros en comparación con suelos no solarizados, esto ayuda al crecimiento rápido de microorganismos benéficos los cuales controlan a patógenos del suelo (De la Garza, 1996). Herrera *et al.*, (1997) reportan que temperaturas entre 35 y 42°C, afectan la viabilidad de *P. cinnamomi* en suelo, en raíces de aguacate infectadas; en sustrato nutritivo enterrado a 30-60 cm de profundidad, se redujo drásticamente la población del fitopatógeno después de 6-8 semanas

de solarización, tanto en las zonas soleadas como en las sombreadas. El patógeno no se aisló de las raíces de los árboles tratados hasta pasados 14 meses desde la solarización. El tratamiento no afectó al crecimiento de los árboles y la cosecha se incremento.

Control Cultural

Las prácticas culturales sirven para prevenir y disminuir la enfermedad. Entre esta se cita la nivelación del terreno para evitar encharcamientos; un buen control de riego, además de sembrar semilla certificada y/o desinfectada, usar plantas sanas y fuertes en el transplante, y cuando se presente la enfermedad, aislar y quemar las plantas enfermas y la eliminación total de los residuos (Laborde y Pozo, 1984; Gómez 2000). También se sugiere seleccionar suelos con buen drenaje, erradicar las malezas, rotar cultivos, considerar fechas de siembra y ampliar espacios entre surcos (Romero, 1996). La fertilización adecuada puede ser una práctica que puede reducir el presencia de estos patógenos y reducir los daño en los cultivos. Tambien es recomendable la rotación de cultivos en terrenos con alta infección; eliminar los residuos de cosecha, utilizar plantas sanas y no dejar que el agua de riego inunde el suelo (Jaramillo, 2003). Para disminuir la incidencia de *Rhizoctonia* se recomienda, evitar sembrar en suelo húmedo. Realizar rotación de cultivos. El daño puede ser más severo al sembrar papa después de alfalfa, trébol o si existen residuos de cosecha no descompuestos (Macias *et al.*, 2006).

Control Genético

Se basa en la tolerancia o resistencia genética de las plantas aplicado a la agricultura, por lo tanto, es oportuno y estratégico la formación de materiales genéticos que presenten los niveles de producción cercanos a los híbridos, y que sean costeables por el bajo costo de la semilla, alto rendimiento y calidad de fruto, así como por la tolerancia a enfermedades (Acosta y Luján, 2004). La resistencia genética de plantas de chile constituye la solución más práctica, duradera y económica para el control de *P. capsici* debido a que existen reportes tanto en el extranjero como en nuestro país de fuentes de resistencia, en México recientemente, se encontró una variedad de chile “criollos de Morelos”, con alta resistencia a *P. capsici* y buena compatibilidad con las variedades comerciales (poblano, mulato y ancho, etc.) a diferencia del chile pasilla, el cual, aunque resistente no es compatible con las variedades comerciales (Romero, 1996). En el caso de *P. cinnamomi* el control genético se ha encontrado en porta injertos, resistentes al ataque del fitopatógeno como el Colin V-33, así como el uso actual de los cultivares de aguacate como el Fuerte y Hass utilizados a nivel mundial y en la actualidad no ha surgido un cultivar que desplace a estos (Mora *et al.*, 1994).

Control Químico

Esta basado en la aplicación de agroquímicos para el control de enfermedades, es decir, dependen del uso y la acción de una sustancia química que reduce la cantidad de inóculo del patógeno, por lo que comúnmente se utiliza el término fungicida para referirse a los productos químicos que controlan las enfermedades de las plantas (Pérez *et al.*, 2004).

En los últimos años, se ha logrado un cierto control de las pudriciones de raíz y de la parte inferior del tallo ocasionadas por *Phytophthora* utilizando varios fungicidas sistémicos como el etridiazol, metalaxyl, fosetyl de aluminio, azoxystrobin, ethazol y propamocarb los cuales se usan para tratar semilla o suelo en agua de riego (Agrios, 2005; Guillén *et al*, 2006). García (1996) menciona que entre las materias activas aplicadas a *P. capsici* el metalaxyl (Ridomil®) y etridiazol (Terrazole®) son las que mejor contrarrestan la enfermedad producida por el patógeno si se hacen mezclas como metalaxil en gránulos (Ridomil 5G®) aplicando 20-40 kg por ha; y metalaxil en polvo mojable (Ridomil®) en aplicaciones al cuello a las dosis de 0.1-0.2 g de materia activa por litro de agua.

El control químico es parte de las estrategias del manejo integrado de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora cinnamomi*. El control químico puede estar enfocado a fungistáticos (inhiben la germinación de las esporas) o fungicidas que matan la espora, con acción erradicante, pero causan fototoxicidad. Para el manejo químico de *Rhizoctonia solani* se utilizan los fungicidas: Monceren 25 PH® (Pencycuron), en dosis de 3.0 a 5.0 kg/ha hasta 10 kg/ha, dependiendo de la gravedad del ataque de *Rhizoctonia*. Tecto® (Tiabendazol) a razón de 2.0 a 3.0 kg, se recomienda la aspersion en banda, al fondo del surco. Para ello, se tira la semilla, se asperjan los tubérculos y a la tierra próxima a ellos y posteriormente se tapa., PCNB (Qintozeno), utilizando de 12.0 a 20.0 lt/ha, aplicado en bandas de 30 cm de ancho al momento de la siembra cubriendo simultáneamente suelo y semilla. También puede sumergir los tubérculos en una solución de 1.5 a 2.0 kg de

Moncerenen en 100 litros de agua, por un tiempo de 3 minutos y secar a la sombra antes de sembrar (Macias *et al.*, 2006).

Control Biológico

El control biológico de patógenos en plantas es un área de investigación relativamente nueva, y promete ser una de las formas aceptables en el control de las enfermedades de las plantas, debido al poco desequilibrio ecológico que ocasiona y a la amplia posibilidad de usarse en programas de manejo integrado (Zavaleta, 1994). En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico funciona naturalmente (Méndez, 2003; García, 2007). El control biológico utiliza microorganismos de la microflora del suelo nativa o introducida antagonistas, competidores y/o sus metabolitos secundarios; con la finalidad de disminuir la capacidad del agente patógeno para causar una enfermedad. Los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo de los patógenos (Sid *et al.*, 1999). El objetivo del biocontrol es el abatimiento o eliminación del organismo considerado como nocivo y se basa en interacciones negativas entre el agente de biocontrol y el patógeno (Lara *et al.*, 2007). Hay reportes que indican que *Trichoderma harzianum* disminuye la incidencia de *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *Rhizoctonia solani* (Garcia *et al.*, 2002; Eziyyani *et al.*, 2004; Trillas *et al.*, 2006).

Importancia del Control Biológico

La necesidad de reducir el uso de fungicidas químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado paso al uso de microorganismos benéficos. En efecto, la demanda impuesta por la sustentabilidad está conduciendo al uso de estrategias que mantengan una protección del medio ambiente. En este contexto el uso de inóculos microbianos, incluyendo algunos que han sido modificados genéticamente, está cobrando nuevamente interés. Los microorganismos más usados pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, etc. (Sid et al., 2000).

Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Pérez, 2006).

El género *Trichoderma* se encuentra en suelos abundantes en materia orgánica, es aeróbico y pueden estar en los suelos con pH neutro hasta ácido. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha permitido su uso en el control biológico. *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. La competencia por el espacio y los nutrientes es más favorable, principalmente para los hongos que se desarrollan en la superficie de las

hojas antes de efectuar la penetración, no actuando sobre aquellos que penetran rápidamente (Orietta *et al.*, 2001; Fubicek y Harman, 2002).

Etiología

Trichoderma es un hongo que pertenece a la Clase: Deuteromycetes y al Orden: Moniliales (clasificación asexual), entre las especies más destacados de este género son *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, y *T. hamatum*. Presenta conidioforos hialinos, no verticiladas, las fialides son pequeñas e intercaladas, las hifas pueden oscilar entre 3 a 12 µm de diámetro, los conidios tienen de 2 a 3 µm de diámetro en promedio son redondos o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio. Las clamidosporas tienden a ser globosas a subglobosas, terminales a intercalares de tono verde y menores a 15 µm de diámetro (Trabanino *et al.*, 2003; Kubicek y Harman, 2000)

Importancia Económica

Trichoderma resulta ser una herramienta importante, de bajo costo y de alta eficiencia para el control de patógenos de plantas (Duran, 2003). La velocidad de crecimiento de este organismo es alta, por esto es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades fúngicas que en él se encuentran, de entre las cuales se pueden citar a los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Mohammed, 2004).

Pruebas de antagonismo realizadas con *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* muestran que estas especies producen metabolitos no volátiles, que reducen

el crecimiento de *P. nicotianae* y *R. solani* realizando así una actividad antifúngica sobre estos hongos (Stefanova, 1999).

Reportes en la inhibición de *Phytophthora capsici* ejercido por *Trichoderma harzianum* en medio de PDA enriquecido con laminarina-glucosa muestran un 65% de reducción en el crecimiento micelial de este patógeno (Ezziyani, 2004). Actualmente existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de hongos del género *Trichoderma* los cuales han sido muy estudiados contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* (Orietta, 2001), *Pytium*, *Phytophthora* y *Fusarium* (Stefanova *et al.*, 1999).

Mecanismos de Acción de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* pueden ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa o produciendo antibióticos (Benitez, 2004).

También pueden realizar biocontrol directamente mediante micoparasitismo; son hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas a las que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, facilitando la inserción del micelio de *Trichoderma*, para que absorba los nutrientes del interior del hongo huésped, al final el micelio del hongo parasitado queda vacío y con perforaciones (Benitez, *et al.*, 2004;

Michel, *et al.*, 2005). Se han estudiado cuatro modos de acción de esta especie de hongo: la competencia por nutrientes, la antibiosis, el micoparasitismo y la estimulación de defensas de la planta (Duran, *et al.*, 2003; Harman, 2006).

Antagonismo

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista. Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógenos el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en la rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

Micoparasitismo

El micoparasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanasas y proteasas, que lisan (rompen) las paredes de las hifas, o esclerocios de hongos parasitados

(Orietta *et al.*, 2001; Méndez, 2003). *Trichoderma* se ha reportado como hiperparásito de un gran número de hongos fitopatógenos al atacar directamente y producir la lisis de micelio y también de esclerocios de hongos (Correa *et al.*, 2007). Los hongos micoparasíticos son clasificados en dos grandes grupos: biotróficos (aquellos que mantienen una relación de equilibrio con el hospedero) y necrotróficos (llamados también destructivos). Las enzimas son un componente de gran importancia en el micoparasitismo; estas degradan la pared celular del hospedero (Lara *et al.*, 2007, Howell, 2006).

Antibiosis

Es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1995). Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos. La antibiosis se considera como uno de los principales mecanismos de biocontrol que tiene como base la producción de metabolitos tipo antibióticos. Estos se definen como “un grupo químicamente heterogéneo y de bajo peso molecular, secretados por algunos microorganismos que, en bajas concentraciones, demeritan el crecimiento o actividades metabólicas de otros organismos. El efecto de la antibiosis en los Oomycetos es por la inhibición del desarrollo al detener el crecimiento y deformación del tubo germinativo, lo que evita la proliferación de la enfermedad. La producción de antibióticos confiere a los microorganismos una ventaja selectiva en la competencia por nutrientes y espacio en cualquier nicho ecológico (Méndez, 2003; Lara *et al.*, 2007).

Compuestos Volátiles

Dal Bello *et al* (1997) mencionan que *Trichoderma* posee mecanismos fungistáticos que impiden el desarrollo de los hongos fitopatógenos, al sintetizar sustancias volátiles como son; dióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol, los cuales en diferentes concentraciones intervienen en la regulación del mecanismo fungistático.

**MECANISMOS DE LA ACTIVIDAD ANTAGONICA DE *Trichoderma* spp.
SOBRE *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* Y
Rhizoctonia solani in vitro**

**MECHANISMS OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *Trichoderma* spp.
ABOUT *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* and
Rhizoctonia solani in vitro**

**Eduardo Osorio-Hernández, Francisco Daniel Hernández-Castillo*,
Gabriel Gallegos-morales.**

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Dpto. de Parasitología
Agrícola, Calzada Antonio Narro 1923, Col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo,
Coahuila, México.

*Autor para correspondencia: e-mail: fdanielhc@hotmail.com

Raúl Rodríguez-Herrera

Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Blvd. V.
Carranza y José Cárdenas s/n, C.P. 25000, Saltillo, Coahuila, México.

Emilio Padron-Corral.

Universidad Autónoma de Coahuila, Conjunto Universitario Camporredondo,
Edificio D, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México.

Abstract

It was determined the antagonistic effect of thirty one *Trichoderma* strains from different regions of México. In this were established by comparison tests in potato dextrose agar (PDA) between each *Trichoderma* strain and *P. capsici*, *P. cinnamomi* and three strains of *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 and HSO56). It was observed that *Trichoderma* strains 13/31 showed a good level of competence (100%) against *P. capsici*, twenty-four/thirty-one for has a good level of competency against were *P. cinnamomi*, the three strains of *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 and HSO56) inhibited by *Trichoderma asperellum* (T18). In the volatile test showed that *Trichoderma* inhibited effect *P. capsici*, *P. cinnamomi* and *R. solani* (HSO56) highlighting certain *Trichoderma* strains. The supernatant from growth of seven/fourteen strains of *Trichoderma* showed inhibitory effect on *P. capsici*, and only two/fourteen showed inhibition on *P. cinnamomi*, and five/fourteen inhibited *Rhizoctonia solani* (HSO56). Eleven *Trichoderma* strains were identified as *T. asperellum*, one as *T. hamatum*, and one as *T. rossicum*.

Keywords: *Trichoderma* antagonist, antibiosis, volatile compounds.

Resumen

Se determino el efecto antagónico de 31 aislados de *Trichoderma* de diferentes regiones de México. Para ello se establecieron ensayos por confrontación en papa dextrosa agar (PDA) entre cada aislado de *Trichoderma* contra *P. capsici*, *P. cinnamomi* y tres cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO56). Se observo que 13/31 cepas de *Trichoderma* muestran un buen nivel de competencia (100%) contra *P.*

capsici, mientras que para *P. cinnamomi* 24/31 tiene buen nivel de competencia, en las tres cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO56) se observó que *Trichoderma asperellum* (T18) mostró buena actividad antagonista. En el ensayo de sustancias volátiles se observó que *Trichoderma* muestra efecto inhibitorio sobre *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *R. solani* (HSO56) destacando ciertas cepas de *Trichoderma*. El sobrenadante de crecimiento de 7/14 cepas de *Trichoderma* mostró efecto inhibitorio sobre *P. capsici*, y solo 2/14 mostraron inhibición sobre *P. cinnamomi*, y 5/14 inhiben a *Rhizoctonia solani* (HSO56). Se identificó a nivel especie 13 de los 14 cepas las cuales 11 son *T. asperellum*, uno *T. hamatum* y uno *T. rossicum*.

Palabras clave: *Trichoderma*, Antagonista, Antibiosis, Compuestos volátiles

Introducción

Muchos de los hongos habitantes del suelo subsisten en las plantas vivas y causan grandes pérdidas a diversos cultivos. Estos pueden dañar las raíces y otras partes subterráneas de las plantas e interferir seriamente en su desarrollo. Entre estos patógenos están: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, los que afectan una gran cantidad de cultivos, algodón, arroz, cacahuate, café, cebolla, chile, tabaco, tomate, papa, aguacate etc. (Agrios, 2005). *P. capsici* puede llegar a causar pérdidas de un 60 a 100 % cada año en el cultivo de chile (Guillen *et al.*, 2006); Mientras que *P. cinnamomi*, tienen incidencias de 45 y 90% en el cultivo de aguacate en los estados de Morelos y Puebla (Ochoa *et al.*, 2005); y *Rhizoctonia*

solani en el cultivo de papa llega a tener incidencias en tallos de 35% y en tubérculos 97.7% (Hernandez *et al.*, 2008).

Actualmente, las medidas utilizadas para el control de las enfermedades del suelo es con el uso de productos químicos, sin embargo el uso indiscriminado de estos a tenido graves consecuencias ya que se han encontrado aislamientos de hongos resistentes a fungicidas, como es el caso del ingrediente activo Pencycuron sobre *Rhizoctonia solani* (Hernández, *et al.*, 2005), y el matalaxil en patógenos como *Phytophthora* sp. (Riveros, *et al.*, 2003). También hay evidencia importante de una grave contaminación derivada de los plaguicidas, que no sólo afecta a la flora y la fauna que se ha expuesto en forma significativa a dichas sustancias, así mismo han contribuido al deterioro en la calidad del aire, agua, suelo y alimentos, así como también en la salud de jornaleros y consumidores (Hausbeck y Lamour, 2004; Parra y Ristaino, 1998; Riveros *et al.*, 2003). La incorporación de agentes de control biológico (antagonistas) al suelo tales como *Trichoderma* spp. es ampliamente conocida como método de lucha contra enfermedades causadas por hongos de suelo. Hay evidencias que indican que *Trichoderma* spp. tiene amplio rango de acción e induce la supresión de varios fitopágenos como: *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium*, *Mycosphaerella fijiensis*, entre otros (Arzate, *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007; Ezziyyani *et al.*, 2004; Djonovic *et al.*, 2006, López *et al.*, 1999, Sempere *et al.*, 2007, Zavaleta, 1999).

El amplio espectro de *Trichoderma* como antagonista de fitopatógenos se le atribuye a sus distintos mecanismos, estos pueden ser

por micoparasitismo, competencia (espacio y nutrientes), por la producción de metabolitos secundarios o enzimas (glucanasas, quitinasas) y por la inducción de resistencia sistémica en plantas, (Howell, 2003; Harman, 2005; Michel *et al.*, 2005; Tondje *et al.*, 2007). En la actualidad ya se cuentan formulados a base de *Trichoderma*, sin embargo estos no han sido efectivos para el control de un amplio rango de fitopatógenos, además que solo se puede aplicar en ciertas regiones de México. Por lo anterior se planteó como objetivo determinar los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi* y *Rhizoctonia solani* *In vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los microorganismos

Se evaluaron 31 aislados de *Trichoderma* recuperados de suelo, semilla y plantas colectadas en el Noreste de México, e identificadas de acuerdo a las claves de Fubicek y Harman (2002). El patógeno *P. capsici* fue aislado de raíces de chile (*Capsicum annuum* L), con síntomas de la enfermedad; *P. cinnamomi* se aisló de raíces de plantas de aguacate. Ambos generos se identificaron a nivel de especie de acuerdo a las claves de Erwin y Ribeiro (1996). Se estudiara tres cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53 de Tlapalpa, Jalisco, ACH42 de Aldama, Chihuahua y HSO56 de Huatapambo, Sonora) aislados de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*), con síntomas de la enfermedad y se identificaron de acuerdo a las claves

de Sneh *et al.*, (1991). Todos los patógenos se conservaron en tubo con medio de cultivo PDA inclinado y conservado en refrigeración a 4 °C.

Incremento de Microorganismos

Los microorganismos bajo estudio fueron incrementados en cajas Petri con medio de cultivo PDA, por resiembra de una porción de micelio con medio de cultivo de 5 mm de diámetro tanto de *Trichoderma* como del fitopatógeno en el medio de cultivo, incubándose a 28 ± 1 °C durante 2 días para *Trichoderma* y cinco días para *P. capsici*, *P. cinnamomi* y tres días para *Rhizoctonia solani* (cepas TJ53, ACH42 y HSO56 resistente a pencycurum).

Antagónismo de *Trichoderma* sobre *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *Rhizoctonia solani* en cultivos duales.

Se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990), estudiando cuantitativamente la zona de intersección o traslape entre el hongo antagonista y el fitopatógeno. En cajas Petri con PDA se depositó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias del fitopatógeno de cinco días de edad y en el otro extremo se colocó un disco de micelio y PDA de 5 mm de diámetro con *Trichoderma* spp. Las cajas se incubaron a 28 ± 1 °C y se observó cada 24 h para cuantificar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el fitopatógeno; además se midió el crecimiento de ambas colonias y el diámetro de intersección y/o traslape. El antagonismo se clasificó según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) donde: clase 1, *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo; clase 2, *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo;

clase 3, *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ningún organismo parece dominar al otro; clase 4, el hongo patógeno coloniza al menos 2/3 partes de la superficie del medio de cultivo y resiste la invasión por *Trichoderma*; clase 5, el hongo patógeno coloniza toda la superficie del medio de cultivo. El número de tratamientos para esta prueba correspondió a las 31 cepas de *Trichoderma* spp. distribuidos bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Sustancias volátiles de *Trichoderma* sobre *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *Rhizoctonia solani* (HSO56)

En cajas Petri con medio PDA se depositó, una explante de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* y se incubó a 28 ± 1 °C por dos días, el mismo procedimiento se realizó para *P. capsici*, *P. cinnamimo* y *R. solani* (HSO56). Posteriormente con un sacabocados de 1.5 cm de diámetro calentado al mechero, bajo condiciones asépticas se perforo la tapa de las cajas Petri con *Trichoderma* spp., y se unió a la caja del fitopatogeno (la caja Petri en la cual se depositó el hongo fitopatogeno se colocó sin tapa) sellándose con kleen pack. La caja Petri que contenía el fitopatogeno se colocó en la parte inferior las primeras 24 h para que el disco de 5 mm se adheriera al medio de cultivo con su micelio evitando así que el explante caiga por el orificio a la caja Petri inoculada con *Trichoderma*; posteriormente se invirtieron las placas, para que de esta forma los compuestos volátiles que produzcan las cepas de *Trichoderma* pasen por el orificio a la caja donde se depositó el disco del fitopatogeno. Los tratamientos se mantuvieron en observación hasta que el testigo (fitopatogeno sin *Trichoderma*) cubrió la caja Petri con

medio de cultivo, y se midió el crecimiento micelial del fitopatógeno en centímetros. El número de tratamientos correspondió a las 31 cepas de *Trichoderma* spp., distribuidas bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los tres fitopatógenos, que se determinó con la fórmula: % de inhibición micelial = $[(D1-D2)/D1]*100$; donde D1=diámetro de la colonia de cada fitopatógeno en cajas con PDA libre de inhibidores y D2=diámetro de la colonia de cada patógeno creciendo junto con *Trichoderma*.

Actividad de sustancias tóxicas de *Trichoderma* sobre *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *R. solani* (HSO56)

Para la obtención de sustancias tóxicas se probaron tres especies de *Trichoderma*; *Trichoderma asperellum* (T2, T3, T4, T8, T10, T14, T18, T30 y T31), *Trichoderma rossicum* (T1), *Trichoderma hamatum* (T25) y T15 sin identificar a nivel de especie. Se utilizaron matraces Erlenmeyer (250 mL) previamente esterilizados, con medio de cultivo líquido a base de papa fresca-dextrosa. Los matraces con 150 ml de medio se inocularon con tres discos de micelio y PDA de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* de cultivos vigorosos de cinco días de edad, los que se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 días. Después de este tiempo el sobrenadante de crecimiento se filtró dos veces en bomba de vacío con papel Whatman no. 44 y se filtró en membrana millipore de $0.22 \mu\text{m}$ para obtener un líquido estéril de cada cepa de *Trichoderma*. Posteriormente el filtrado obtenido se refrigeró a 4°C hasta su utilización. Para la evaluación de la actividad antagónica de *Trichoderma* sobre *P. capsici*, *P. cinnamomi* y

R. solani (HSO56) se utilizaron cajas Petri con medio PDA a las que se les agregó 200 µL del filtrado de *Trichoderma* y se distribuyó sobre la superficie del medio con una varilla bacteriológica, enseguida en el centro de la caja Petri se depositó un disco de micelio de 5 mm de cada uno de los tres patógenos (*P. capsici*, *P. cinnamomi* y *R. solani* (HSO56)), posteriormente se incubó a 28 ± 1 °C hasta que el testigo llenó la caja Petri (8 días), transcurrido este tiempo se determinó el porcentaje de inhibición de los tres patógenos. Se utilizó un diseño completamente al azar con 14 tratamientos y 4 repeticiones.

Diseño Experimental

Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza para detectar diferencias entre tratamientos; para la comparación múltiple de medias se utilizó la prueba de Tukey con el programa estadístico SAS (1999). En el caso de los datos en porcentajes, antes de someterlos al análisis de varianza (ANOVA), se les realizó la transformación angular de arcoseno $\sqrt{x+1}$ (Steel y Torrie, 1986) estandarizar los datos.

Identificación de *Trichoderma* a nivel especie

Se realizó la identificación a nivel especie por técnicas moleculares, debido a la confusión que existe en la identificación morfológica. Para reportar especies de *Trichoderma* es recomendable realizar la

secuenciación de las regiones conservadas (18S y 5,8S rRNA) (Fubicek y Harman, 2002).

Producción de la biomasa de cepas de *Trichoderma* spp.

Se utilizaron matraces de Erlenmeyer (250 mL) previamente esterilizados, con medio de cultivo líquido a base de glucosa (3.0), KH_2PO_2 (2.47), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.38), CaCl_2 (0.48), NaCl (0.32) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1246) g/L. Los matraces con 150 ml de medio se inocularon con tres discos de micelio y PDA de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* de cultivos vigorosos de cinco días de edad, los que se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante tres días. Pasado este tiempo, se recuperó el micelio por filtración en papel Whatman no. 44; enseguida se puso en papel aluminio previamente esterilizado y etiquetado, y se guardó en refrigeración a -4°C hasta su uso.

Extracción de ADN de *Trichoderma* spp.

Se seleccionaron 14 cepas de *Trichoderma* en base a la actividad antagónica mostrada en las diferentes pruebas. Para la extracción del ADN de *Trichoderma* se empleó el método CTAB. Se colocó en papel aluminio 0.20 g de biomasa de micelio, se etiquetó y se congeló en nitrógeno líquido durante 15 min. Este material se maceró hasta obtener un polvo fino de color blancuzco, el cual se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml con 1 ml de CTAB (2% cetyltrimetil- amoniobromide, 20 mM EDTA 0.5 M TRIS (pH 8), 1.4 M NaCl con 2- mercaptanol). Se agitó en vortex por 15 seg y colocó en baño María a 55°C durante 20 min. Enseguida se centrifugó a 10635 g por 5 min.

Con un micropipeta se recupero 400 μ L del liquido sobrenadante (ADN) y se transfirieron a un tubo de 1.5 ml. Previamente esterilizado y etiquetado. Posteriormente se agregó el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló con inversiones suaves durante 2 min, y se centrifugo por 10 min a 10635 g. En otro tubo estéril de 1,5 ml se colocó la fase acuosa (fase superior de la solución) y se le agrego 50 μ l de acetato de amonio de 7.5 M más 800 μ l de etanol frio al 96%, se mezclo por inversiones suaves. Los tubos Eppendorf con la muestra se colocaron en el congelador por 60 min. Enseguida se centrifugo a 10635 g por 5 min y retiro todo el sobrenadante, con el fin de obtener la pastilla adherida al tubo (ADN), que se lavó con 300 μ L de etanol al 70%, por inversiones suaves, se decantó el etanol y se dejó evaporar los restos de alcohol. La pastilla se resuspendió en 60 μ L de agua desionizada estéril, finalmente las muestras se almacenaron a -20 °C.

Integridad del ADN genómico de *Trichoderma* spp.

La integridad del ADN genómico se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % para ello se colocó en el pocillo del gel de electroforesis 3.5 μ L de muestra con 10 μ L de azul de bromofenol-xilenglycol mezclados previamente. Se corrió a 60 volts durante los primeros 15 min, posteriormente se incremento el voltaje a 80 volts durante 50 min. El gel se visualizó en el Spectroline Ultraviolet trasluminator adaptado al digitalizador de imagen UVP Mini Darkrom.

Amplificación del 18S de *Trichoderma* spp.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Px2

Thermal Cycler. Las componentes y las condiciones de reacción para la amplificación fueron los siguientes: ADN (2.0 µL), Buffer 10 X (35 µL), MgCl₂ 2.5 mM (14 µL), dNTPs 2.5 mM (7 µL), iniciador 18 S NP3 (28 µL), iniciador 18 S NP10 (28 µL), *Taq* polimerasa 5 U (7 µL), Agua mili – Q (203 µL) por muestra, y las condiciones de la reacción fueron: 35 ciclos, 95 °C / 5 min, 95 °C/ 1 min, 55 °C/ 1 min, 72 °C/ 1 min, 72 °C/ 7 min y 4 °C. Los oligonucleótidos empleados para la reacción de amplificación del gen 18 S3 fueron (CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C) y 18 S10 (TCC GCT TAT TGA TAT GCT TAA G) a una temperatura de alineamiento de 54 °C. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, en corrimientos a 60 volts por 1 h.

Secuenciación del fragmento 18S de *Trichoderma* spp.

La secuenciación fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad FES Iztacala. Donde las muestras purificadas se colocaron en las gradillas del secuenciador Modelo 3100 Genetic analyzer de 16 capilares, movilidad soporte polímero DT3100pop6(BD)v3, capilar de 50 cm. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron comparadas con los bancos de genes por Blast en National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), y la pagina dedicada a las especies de *Trichoderma* TrichOkey versión 1.0 (<http://isth.info/tools/molkey/index.php>), para verificar el porcentaje de identidad y que las secuencias correspondieran a las especies identificadas.

Resultados Y Discusión

Antagonismo de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici* en cultivos duales

El sobrecrecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre *P. capsici* (traslape) varió de 6.0 a 3.3 cm (Cuadro 1). El análisis de varianza mostró que hay diferencia significativa ($p \leq 0.0001$) entre los tratamientos. 13 cepas de *Trichoderma* mostraron el máximo efecto antagónico; considerando la escala de Bell *et al.* (1982), estas cepas se ubicaron en la escala 1. De acuerdo a la comparación de medias (Cuadro 1) se observó que entre las especies de *Trichoderma* T15 y las cepas de *T. asperellum* (T18, T16, T14 y T30) no hubo diferencia significativa entre ellos pero si con los demás tratamientos. Los resultados que se obtuvieron con *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. concuerdan con los obtenidos por Ezziyyani *et al.*, (2004), con *Trichoderma harzianum*, en ambos casos se muestra alto nivel de antagonismo contra *P. capsici*, el que además presenta un desarrollo micelial menos denso y es limitado por el antagonista. Este efecto es atribuido a la producción de las enzimas β -1,3- glucanasa, quitinasa, proteasa y celulosa.

Cuadro 1. Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.

Cepas	Traslapé (cm)	Días a contacto	Clase de antagonismo
T15	6.0 A	2	1
T18	6.0 A	2	1
T16	6.0 A	2	1
T14	6.0 A	2	1

T30	6.0 A	2	1
T4	5.7 AB	2	1
T8	5.7 AB	2	1
T17	5.7 AB	2	1
T1	5.7 AB	2	1
T2	5.6 AB	2	1
T3	5.5 AB	2	1
T19	5.5 AB	2	1
T31	5.4 AB	2	1
T10	5.1 B	2	2
T27	4.4 C	2	2
T11	4.2 DC	2	2
T29	4.1 DC	2	2
T9	4.0 DCF	2	2
T12	3.9 DEFG	3	2
T7	3.8 DEFG	2	2
T28	3.8 DEFG	2	2
T6	3.7 DEFG	2	2
T20	3.7 DEFG	2	2
T5	3.6 DEFG	2	2
T23	3.6 DEFG	2	2
T13	3.5 EFG	2	2
T24	3.5 EFG	2	2
T22	3.5 FG	2	2
T25	3.4 FG	2	2
T21	3.4 FG	2	2
T26	3.3 G	2	2

1. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si. 2. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982).

Otros estudios señalan que algunas cepas de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*, también mencionan que *T. harzianum* muestra una elevada actividad antagónica sobre *Rhizoctonia solani* y *Pyricularia grisea* al colonizar totalmente a los patógenos (Correa *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2007). En nuestros ensayos el periodo de contacto entre *Trichoderma* y *P. capsici* fue de dos días, excepto en la cepa 12 donde el contacto entre los microorganismos fue de tres días (Cuadro 1). Resultados similares fueron obtenidos por Michel *et al.*, (2005) con *T. harzianum* contra *Sclerotium rolfsii*, sin embargo el mismo autor reporta que

contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* los días a contacto fue de hasta cinco días.

Sustancias volátiles de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*

La inhibición del crecimiento micelial de *P. capsici* inducida por los compuestos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* varió de 4.3 a 48.8% (Figura 1). Lo anterior indica que las 31 cepas son capaces de producir compuestos volátiles en mayor o menor proporción esto comparado con el testigo. La prueba de medias indica que 21 cepas de *Trichoderma* mostraron el mayor porcentaje de inhibición ($P \leq 0.0001$). El mayor efecto se observó con *Trichoderma asperellum* (T25), y el menor con la cepa de *Trichoderma* T9 (Figura 1); el desarrollo del testigo alcanzó 8.5 cm. En otros estudios se muestra que *Trichoderma* producen compuestos volátiles que provocan un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia en fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae* (Stefanova *et al.*, 1999). Dal Bello *et al.* (1997) reportaron el efecto inhibitorio causado por los compuestos volátiles como dióxido de carbono, oxígeno y etileno, producidos por *T. hamatum* sobre *Alternaria citri*, *Bipolaris cynodontis*, *B. sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *C. lunata*, *C. oryza* y *R. solani* sobre las cuales observaron alteraciones en crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos. En este sentido, Michel *et al.*, (2004) consignan que *Trichoderma* spp. producen compuestos volátiles como 6-pentil- α -pirona (6PAP) indicando que a mayor concentración presenta mayor inhibición micelial sobre especies de *Fusarium* (2 a 42% de inhibición), resultados inferiores a los presentados en este estudio sugiere que las cepas evaluadas producen mayor cantidad de metabolitos.

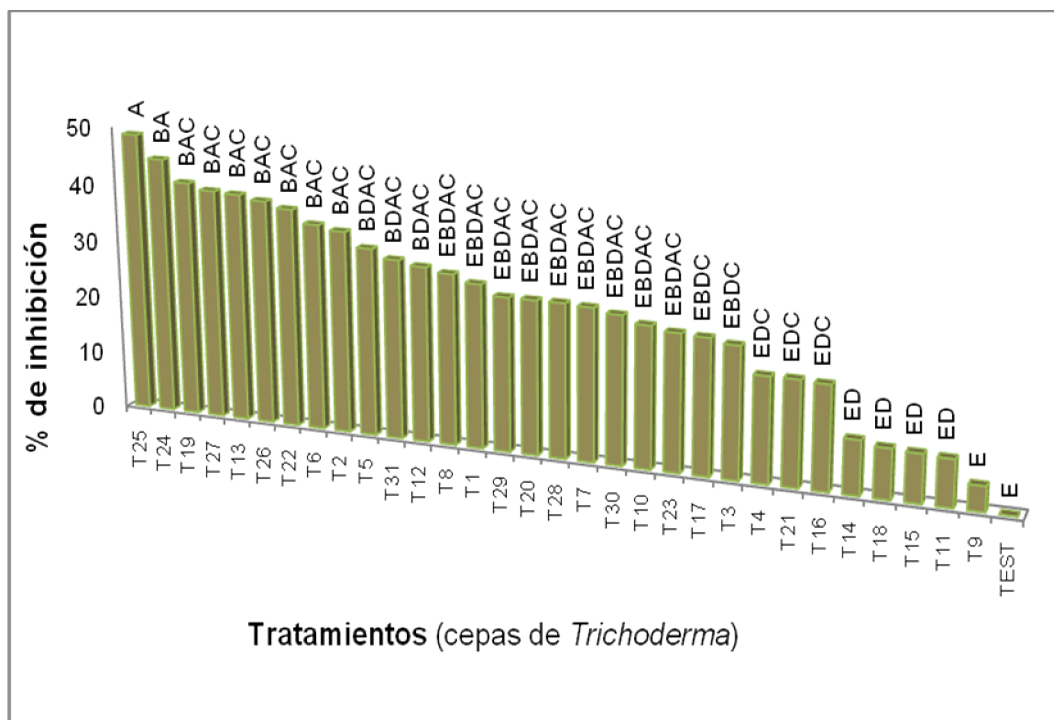


Figura 1. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Phytophthora capsici* por compuestos volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* y el TEST (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si (Tukey, $P \leq 0.0001$).

Actividad de sustancias toxicas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*

Dos especies de *Trichoderma* mostraron efecto inhibitorio, sobre *P. capsici*. De acuerdo a la comparación de medias (Figura 2) *Trichoderma asperellum* (T31) fué la especie con mayor inhibición (15.29%) sobre *P. capsici*, cabe destacar que cuatro aislados de *Trichoderma asperellum* (T31, T2, T16) alcanzaron las mas altos porcentaje de inhibición las cuales no mostraron diferencias significativa entre ellos ($P \leq 0.0001$) mientras que *Trichoderma hamatum* (T25) inhibe 9.68%. *Trichoderma rossicum* (T1) además de algunas cepas de *T. asperellum* (T14, T3, T30 y T10) no mostraron actividad en la inhibición de *P. capsici* debido que tuvieron la

misma velocidad de crecimiento que el testigo; esto indica que la especie no es determinante en la mayor o menor proporción y/o tipos de compuestos toxicos. Además de los anterior se observó un crecimiento anormal en el desarrollo micelial de *P. capsici*, este mostró un micelio raquítrico, en todos las cepas evaluadas. LeLay *et al.* (2007) quienes ensayaron seis aislados de *Trichoderma* indican que estos tienen una inhibición del 14 a 27% de inhibición en el crecimiento micelial de *Rosellinia necatrix*. Los mismos autores mencionan que algunas cepas de *Trichoderma* estimularon el crecimiento del patógeno, atribuyéndolo a la poca concentración de metabolitos como gliotoxina, viridina, pacibasina, trichodermina, furanona, trichorziamina y 6-pentil- α -pirona.

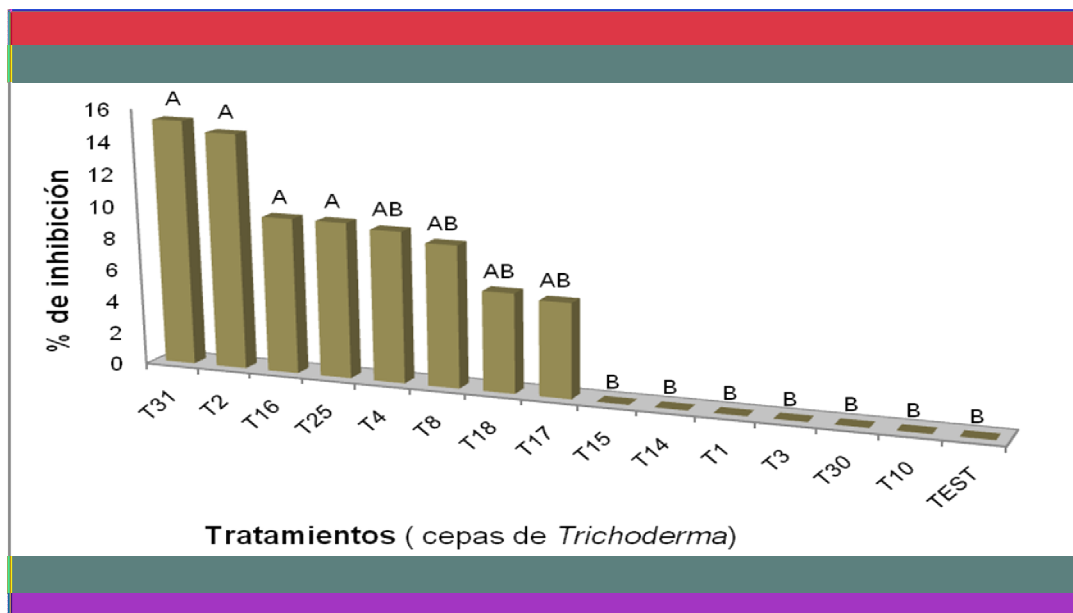


Figura 2. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Phytophthora capsici* por compuestos toxicos de 14 aislados de *Trichoderma* y el TEST (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).

Antagónismo de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi* en cultivos duales.

El sobrecrecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre *P. cinnamomi* (traslape) vario de 6.0 a 4.1 cm (Cuadro 2). El análisis de varianza mostró que no hay diferencia significativa ($p \leq 0.0004$) entre los tratamientos. Veinticuatro cepas de *Trichoderma* mostraron el máximo efecto antagónico; considerando la escala de Bell *et al.*, (1982), estas cepas se ubicaron en la escala 1. Es importante mencionar que seis cepas de *Trichoderma* (T28, T6, T27, T26, T5, T13 y T15) se ubicaron en la escala 2 de Bell *et al.*, (1982). Los resultados que se obtuvieron con *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. concuerdan con los obtenidos por Ezziyyani *et al.*, (2004), con *Trichoderma harzianum*, en ambos casos se muestra alto nivel de antagonismo contra *P. cinnamomi*, el que además presenta un desarrollo micelial menos denso y es limitado por el antagonista.

Cuadro 2. Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.

Aislamientos	Crecimiento (cm)	Día al Contacto	Clase de antagonista
T12	6 A	2	1
T11	5.7 A B	2	1
T23	5.6 AB	2	1
T31	5.6 AB	2	1
T1	5.5 AB	2	1
T8	5.5 AB	2	1
T10	5.4 ABC	2	1
T22	5.4 ABC	2	1
T3	5.4 ABC	2	1
T25	5.4 ABC	2	1
T17	5.3 ABC	2	1
T16	5.3 ABC	2	1

T24	5.3 ABC	2	1
T9	5.3 ABC	2	1
T21	5.3 ABC	2	1
T18	5.2 ABC	2	1
T14	5.2 ABC	2	1
T4	5.2 ABC	2	1
T20	5.2 ABC	2	1
T29	5.2 ABC	2	1
T2	5.2 ABC	2	1
T7	5.1 ABC	2	1
T19	5.1 ABC	2	1
T30	5.1 ABC	2	1
T28	5.0 BC	2	2
T6	4.9 BC	2	2
T27	4.9 BC	2	2
T26	4.8 BC	2	2
T5	4.6 BC	2	2
T13	4.6 BC	2	2
T15	4.1 C	2	2

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$). 2. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982).

Este efecto es atribuido a la producción de las enzimas β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulosa. Otros estudios señalan que algunas cepas de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*, también mencionan que *T. harzianum* muestra una elevada actividad antagónica sobre *Rhizoctonia solani* y *Pyricularia grisea* al colonizar totalmente a los patógenos (Correa *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2007). Los resultados concuerdan con los obtenidos por López *et al.*, 1999, quienes mencionan que *Trichoderma* demostró un claro efecto antagónico contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*. Estudios contra otros fitopatogenos muestran que algunas cepas de *Trichoderma* presentan actividad antagónica sobre *Mycosphaerella fijiensis* (Arzate *et al.*, 2006).

El periodo de contacto entre *Trichoderma* y *P. cinnamomi* fue de dos días en todas las cepas (Cuadro 2). Resultados similares fueron obtenidos por Michel *et al.*, (2005) con *T. harzianum* contra *Sclerotium rolfsii*, sin

embargo el mismo autor reporta que contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* los días a contacto fue de hasta cinco días lo que sugiere que nuestras cepas tienen una gran capacidad de agresividad y colonización.

Sustancias volátiles de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi*

La inhibición del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* inducida por los compuestos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* varió de 100 (*Trichoderma* sp. T7) a 17.8% (*Trichoderma asperellum* T3) (Figura 3). Lo anterior indica que las 31 cepas son capaces de producir compuestos volátiles en mayor o menor proporción. La prueba de medias indica que las cepas de *Trichoderma* T7, T26, T19, T29 presentan el mayor efecto de inhibición, no presentando diferencia estadística significativa entre ellos. La prueba de medias indica que 21 cepas de *Trichoderma* mostraron el mayor porcentaje de inhibición ya que no mostraron diferencias entre ellos ($P \leq 0.0001$).

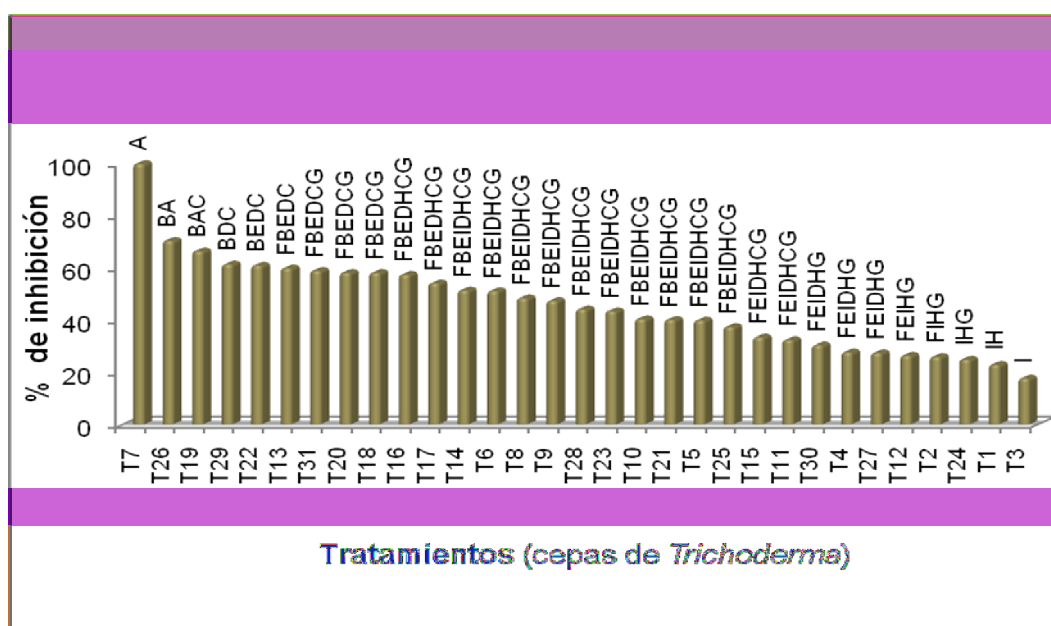


Figura 3. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por compuestos volátiles producidos por 31 cepas

de *Trichoderma* a los 10 días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).

En otros estudios se muestra que *Trichoderma* producen compuestos volátiles que provocan un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia en fitopatógenos como en *Phytophthora nicotianae* (Stefanova *et al.*, 1999). Dal Bello *et al.* (1997) reportaron el efecto inhibitorio causado por los compuestos volátiles como dióxido de carbono, oxígeno y etileno, producidos por *T. hamatum* sobre *Alternaria citri*, *Bipolaris cynodontis*, *B. sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *C. lunata*, *C. oryza* y *R. solani* sobre las cuales observaron alteraciones en crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos. En este sentido, Michel *et al.*, (2004) consignan que *Trichoderma* spp. producen compuestos volátiles como 6-pentil- α -pirona (6PAP) indicando que a mayor concentración presenta mayor inhibición micelial sobre especies de *Fusarium* (2 a 42% de inhibición), resultados inferiores a los presentados en este estudio sugiere que las cepas evaluadas producen mayor cantidad de metabolitos.

Actividad de sustancias tóxicas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi*.

Dos especies de *Trichoderma* mostraron efecto inhibitorio, sobre *P. cinnamomi*. De acuerdo a la comparación de medias (Figura 4) *Trichoderma asperellum* (T2) fue la especie con mayor inhibición (51.5%) sobre *P. cinnamomi* (Figura 4), cabe destacar que *Trichoderma asperellum* (T4) induce un 10.5% de inhibición, mostrando diferencias significativas entre todos los tratamientos ($P \leq 0.0001$). *Trichoderma hamatum* (T25) y *Trichoderma rossicum* (T1) no mostraron efecto inhibitorio, además de

algunas cepas de *T. asperellum* (T3, T8, T10, T14, T16, T17, T18, T30 y T31) esto indica que la especie no es determinante en la mayor o menor proporción y/o tipos de compuestos tóxicos. Además de los anteriores se observó un crecimiento anormal en el desarrollo micelial de *P. cinnamomi*, mostrando un micelio raquítico, esto para todas las cepas evaluadas. Küçük y Kivanç (2003) reportan que *Trichoderma harzianum* induce un 100% de inhibición sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *sclerotium rolfsii*, sin embargo los mismos autores observaron que no afectó a otros patógenos.

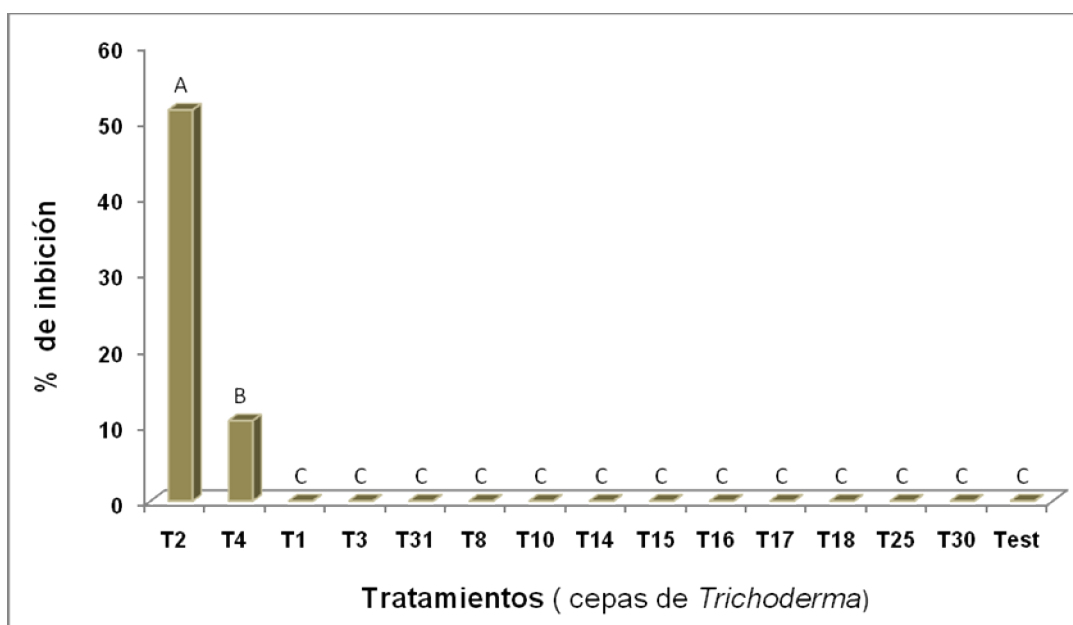


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *Phytophthora cinnamomi* por compuestos tóxicos de 14 aislados de *Trichoderma* y el Test (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.0001$).

Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO56) en cultivos duales.

El sobrecrecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre *R. solani* (TJ53) (traslape) varió de 6.0 a 3.32 cm (Cuadro 3). El análisis de varianza

mostró que hay diferencia significativa ($P < 0.0001$) entre los tratamientos. 14 cepas de *Trichoderma* mostraron el máximo efecto antagónico; considerando la escala de Bell *et al.* (1982), estas cepas se ubicaron en la clase 1, de acuerdo a la comparación de medias (Cuadro 3) se observó que entre *Trichoderma* T15 y las cepas de *T. asperellum* (T18, T16, T14 y T30) no hubo diferencia significativa entre ellos ($P \leq 0.0001$). Bara *et al.*, (2003) reporta que *Trichoderma asperellum* aumenta la cantidad de exo-L-1,3-glucanase cuando se pone en contacto con *Rhizoctonia solani* y sugiere que esta proteína actúa para inhibir al patógeno. Como se puede observar las especies que más destacan pertenecen a *T. asperellum*.

Cuadro 3. Traslapo en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* TJ53, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.

cepa	Traslape (cm)	Días a contacto	Clase de antagonismo
T15	6 A	2	1
T18	6 A	2	1
T16	6 A	2	1
T14	6 A	2	1
T30	6 A	2	1
T4	5.7 AB	2	1
T8	5.675 AB	2	1
T17	5.65 AB	2	1
T1	5.65 AB	2	1
T2	5.65 AB	2	1
T3	5.525 AB	2	1
T19	5.5 AB	2	1
T31	5.35 AB	2	1
T10	5.125 B	2	1
T27	4.35 C	2	2
T11	4.225 DC	2	2
T29	4.125 DCE	2	2
T9	4 DFCE	2	2
T12	3.925 GDFCE	2	2
T7	3.775 GDFCE	2	2

T28	3.75 GDFCE	2	2
T6	3.675 GDFE	2	2
T20	3.65 GDFE	2	2
T5	3.6 G DFE	2	2
T23	3.575 GDFE	2	2
T13	3.5 GFE	2	2
T24	3.475 GFE	2	2
T22	3.475 GFE	2	2
T25	3.425 GF	2	2
T21	3.375 GF	2	2
T26	3.325 GF	2	2

1.-Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si. 2. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982).

El sobrecrecimiento (traslape) de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* cepa ACH42, vario de 6 a 2.97 cm (Cuadro 4), el análisis de varianza mostro que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.0001$). Seis cepas de *Trichoderma* mostraron el máximo efecto antagónico de las cuales cinco pertenecen a *Trichoderma asperellum* (T2, T8, T16, T18 y T31) y uno a *Trichoderma hamatum* (T25); considerando la escala de Bell *et al.* (1982), estas cepas se ubicaron en la clase 1. Es importante destacar que en las cepas de *Trichodema* que cubrieron totalmente la superficie del medio de la caja Petri se observo abundante esporulación.

En el ensayo de *Rhizoctonia solani* (HSO56) con las 31 cepas de *Trichoderma* el sobrecrecimiento (traslape) vario de 5 a 2.9 cm (Cuadro 5) el análisis de varianza mostro diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.0001$). Cinco cepas de *Trichoderma asperellum* (T1, T4, T16, T17, T18) y una cepa (T19) de *Trichoderma* fueron los mas sobresalientes fueron los mas sobresalientes, estas cepas de ubican en la clase 1. *Rhizoctonia solani* (HSO56) mostro mayor crecimiento en comparación con las demás

cepas. Lo anterior se puede atribuir a que esta cepa es resistente al fungicida pencycurum. Küçük y Kivanç (2003) reportan que *T. harzianum* mostro 88% de inhibición de *Rhizoctonia solani* en cultivos duales, ellos también observaron que no todas las cepas de *Trichoderma* pertenecen a la misma especie tienen la misma efectividad de inhibición, esto coincide con lo encontrado en este ensayo.

Cuadro 4. Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* ACH42, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.

Cepa	Traslape (cm)	Días a contacto	Clase de antagonismo
T25	6 A	2	1
T8	5.425 AB	2	1
T18	5.275 AB	2	1
T2	5.125 CB	2	1
T31	4.925 BCD	2	1
T16	4.9 BECD	2	1
T17	4.8 BECD	2	2
T3	4.725 FBECD	2	2
T10	4.5 FBECD	2	2
T19	4.475 FBECD	2	2
T14	4.4 FGEC DH	2	2
T1	4.35 FGEC DH	2	2
T15	4.15 FGEC DH	2	2
T4	4.025 FGIJH	2	2
T20	4 FGIJH	2	2
T30	3.825 GKIJH	2	2
T9	3.775 GKIJH	2	2
T7	3.65 GKIJH	2	2
T11	3.625 LKIJ	2	2
T6	3.525 LKJ	2	2
T21	3.5 LKJ	2	2
T22	3.5 LKJ	2	2
T12	3.5 LKJ	2	2
T5	3.425 LKJ	2	2
T29	3.225 LK	2	2
T13	3.175 LK	2	2
T27	3.15 LK	2	2
T28	3.1 LK	2	2

T24	3 L	2	2
T23	3 L	2	2
T26	2.975 L	2	2

1. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si. 2. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982).

Cuadro 5. Traslape en centímetros del crecimiento micelial de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* HSO56, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.

Cepas	Traslape (cm)	Días a contacto	Clase de antagonismo
T1	5.275 A	2	1
T4	5.075 AB	2	1
T19	5.05 AB	2	1
T18	5.05 AB	2	1
T17	5 AB	2	1
T16	4.9 AB	2	1
T25	4.825 BAC	2	2
T3	4.8 BAC	2	2
T8	4.775 BAC	2	2
T31	4.575 BDAC	2	2
T30	4.5 BDAC	2	2
T10	4.5 BDAC	2	2
T7	4.5 BDAC	2	2
T14	4.475 BDAC	2	2
T2	4.475 BDAC	2	2
T26	4.475 BDAC	2	2
T28	4.325 BDAC	2	2
T15	4.3 BDAC	2	2
T12	4.2 EBDAC	2	2
T27	4.175 EBDC	2	2
T5	4.075 EBDC	2	2
T9	3.8 EDFC	2	2
T13	3.675 EDFC	2	2
T29	3.675 EDFC	2	2
T11	3.625 EDFC	2	2
T20	3.6 EDFC	2	2
T24	3.525 EDFC	2	2
T6	3.5 EDFC	2	2
T21	3.15 EF	2	2
T22	3.125 EF	2	2

1. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre si. 2. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982).

En nuestros ensayos el periodo de contacto entre *Trichoderma* y *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42, HSO56) fue de dos días (Cuadro 3, 4 y 5). Resultados similares fueron obtenidos por Michel *et al.*, (2005) con *T. harzianum* contra *Sclerotium rolfsii*, sin embargo el mismo autor reporta que contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* los días a contacto fue de hasta cinco días.

Es importante destacar que los aislados de *Rhizoctonia solani* son de tres estados de México (Jalisco, Chihuahua y Sonora), sin embargo se observo que hubo cepas de *Trichoderma* que mostraron buena capacidad antagónica; ya que cuatro cepas de *Trichoderma* (T2, T8, T16, T31) coinciden en el sobrecrecimiento sobre dos cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53 y ACH42), y tres cepas mostraron sobrecrecimiento sobre *Rhizoctonia solani* (TJ53 y HSO56), cabe destacar que *Trichoderma asperellum* (T18) mostro sobrecrecimiento (traslape) en las tres aislados de *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO) (Cuadro 3 , 4, y 5), estas cepas de *Trichoderma* se ubican en la clase 1 de la escala de Bell *et al.* (1982). Reyes *et al.* (2007), reportan que *Trichoderma harzianum* presento una elevada actividad antagónica e hiperparasitica contra los patógenos *R. solani* y *Pyricularia grisea*, añaden que no todos las cepas de *Trichoderma* tienen la misma nivel de competencia contra estos patógenos, lo que concuerda con nuestros resultados.

Sustancias volátiles de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani* (HSO56)

La inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* (HSO56) inducida por las sustancias volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* vario de 7.8 a 51.56% (Figura 5). De las 31 cepas evaluadas, 23 manifestaron inhibición sobre *R. solani* y no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.0009$). Dos cepas de *Trichoderma* (T13 y T26) mostraron arriba del 50 % de inhibición. Autores como Küçük y Kivanç (2003) reportan que *T. harzianum* mostro efecto inhibitorio por compuestos volátiles sobre *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cereale*, *Dresshelera sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium. Moniliform*, *Gaeumnnomyces graminis var. tritici* y *sclerotium rolsfii*, estos autores mencionan que *Trichoderma harzianum* no es tan efectivo en la inibicion por compuestos volátiles comparado a lo encontrado en compuestos no volatiles. En otros estudios se muestra que *Trichoderma* producen compuestos volátiles que provocan un desarrollo micelial menos denso y reduce el tamaño de la colonia de fitopatogenos como en *Phytophthora nicotianae* (Stefanova et al., 1999). Dal Bello et al. (1997) reportaron que el efecto inhibitorio causado por los compuestos volátiles como dióxido de carbono, oxigeno y etileno, producidos por *T. hamatum* sobre *Alternaría citri*, *Bipolaris cynodontis*, *B. sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *C. lunata*, *C. oryza* y *R. solani* sobre las cuales observaron alteraciones en crecimiento y desarrollo de los fitopatogenos. En este sentido, Michel et al., (2004) consignan que *Trichoderma* spp. producen compuestos volátiles como 6-pentil- α -pirona (6PAP) indicando que a mayor concentración presenta mayor inhibición micelial sobre especies de *Fusarium* (2 a 42% de inhibición), resultados inferiores a los presentados en

este estudio, lo que sugiere que las cepas evaluadas en este estudio producen mayor cantidad de metabolitos.

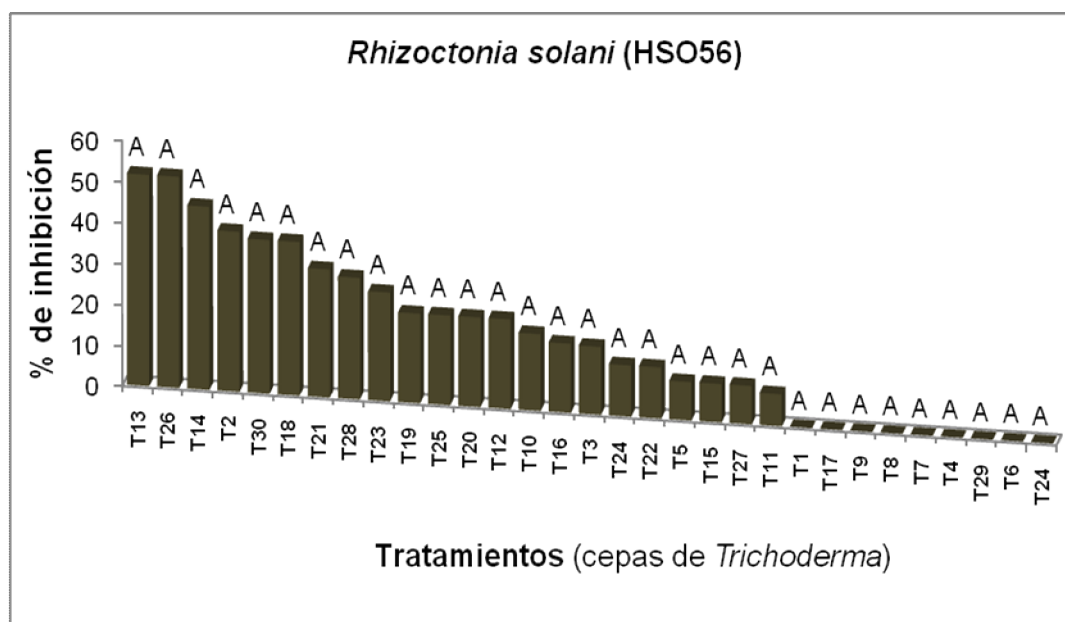


Figura 5. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Rhizoctonia solani* (HSO56) por compuestos volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.0001$).

Actividad de sustancias toxicas de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani* (HSO56)

Dos especies de *Trichoderma* mostraron efecto inhibitorio, sobre *Rhizoctonia solani* variando de 9.4 a 2.3 %. De acuerdo a la comparación de medias (Figura 6), *Trichoderma rossicum* (T1) y las cepas de *Trichoderma asperellum* (T14, T16) mostraron el mayor efecto inhibitorio y no mostraron diferencia entre estos tratamiento, pero si con las cepas T8 y T18 pertenecientes a *Trichoderma asperellum* ($P \leq 0.0001$), mientras que *Trichoderma hamatum* (T25) y algunas cepas de *T. asperellum* (T2, T3, T4,

T10, T17, T30 y T31) no mostraron actividad en la inhibición de *Rhizoctonia solani* esto indica que la especie no es determinante en la mayor o menor proporción y/o tipos de compuestos toxicos.

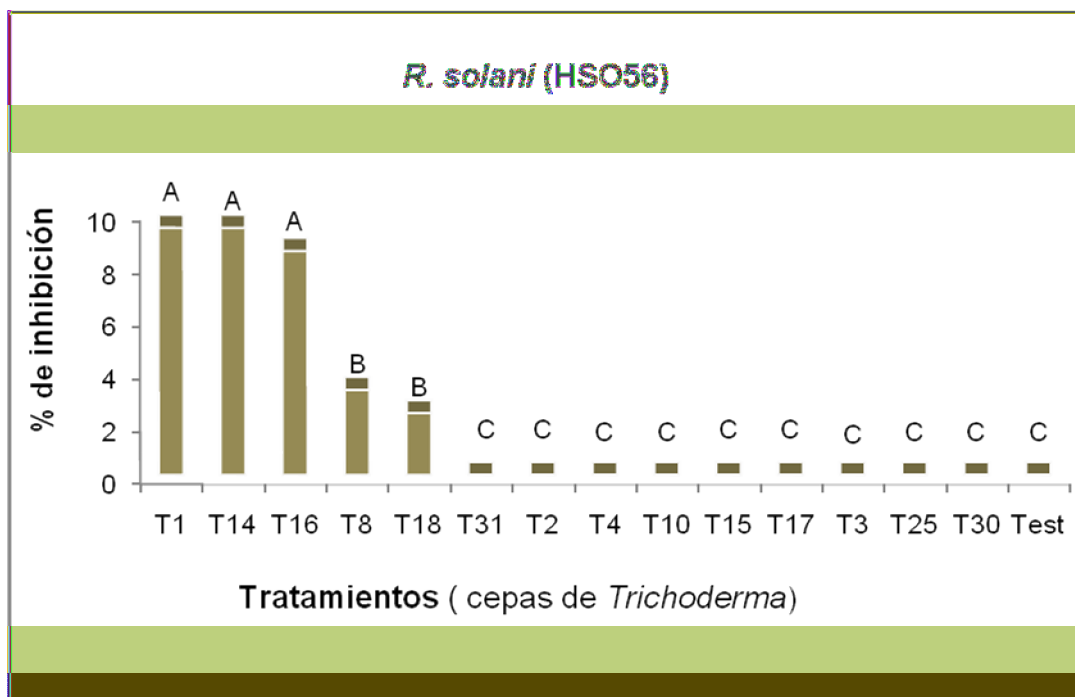


Figura 6. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Rhizoctonia solani* (HSO56) por compuestos toxicos de 14 aislados de *Trichoderma* Y Test (testigo) a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.0001$).

Además de los anterior se observo un crecimiento anormal en el desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani*, este hongo mostro micelio poco abundante, con todos las cepas evaluadas. Küçük y Kivanç (2003) reportan que una de siete cepas que ensayaron de *T. harzianum* mostro 100% de inhibición por sustancias no volátiles sobre *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, ellos también observaron que no todas las cepas pertenecientes a la misma especie tiene la mismo porcentaje de inhibición lo cual coinciden con los resultados obtenidas en este estudio. LeLay *et al.*, (2007) quienes

ensayaron seis aislados de *Trichoderma* mostraron de 14 a 27% de inhibición en el crecimiento micelial de *Rosellinia necatrix*, los mismos autores mencionan que algunas cepas de *Trichoderma* estimularon el crecimiento del patógeno, lo que fue atribuido a la poca concentración de metabolitos como gliotoxina, viridina, pacibasina, trichodermina, furanona, trichorziamina, 6-pentil- α -pirona.

Identificación de especies de *Trichoderma* por PCR

La integridad del ADN genómico extraído de las cepas de *Trichoderma*, fue de buena calidad, puesto que no se presentó ningún barrido en los carriles. De igual manera, se distinguió que la concentración de ADN obtenido era la adecuada y se podía llevar a cabo la PCR para la ampliación del 18S rDNA. Se obtuvo bandas específicas para cada muestra lo que da una certeza de amplificación; se amplificaron fragmentos de 300 y 400 pb de los diferentes cepas de *Trichoderma* los cuales se secuenciaron, después del análisis de las secuencias en los diferentes bancos, se identificaron tres especies diferentes de *Trichoderma*.

Cuadro 6. Especies de *Trichoderma* y su porcentaje de similitud

Cepas	Especie	Porcentaje de identidad
T1	<i>Trichoderma rossicum</i>	97
T2	<i>Trichoderma asperellum</i>	95
T3	<i>Trichoderma asperelum</i>	95
T4	<i>Trichoderma asperellum</i>	97
T8	<i>Trichoderma asperellum</i>	99
T10	<i>Trichoderma asperellum</i>	98
T16	<i>Trichoderma asperellum</i>	99
T17	<i>Trichoderma asperellum</i>	100
T14	<i>Trichoderma asperellum</i>	95
T15	<i>Trichoderma sp.</i>	95
T18	<i>Trichoderma asperellum</i>	95
T25	<i>Trichoderma hamatum</i>	96

T30	<i>Trichoderma asperellum</i>	98
T31	<i>Trichoderma asperellum</i>	97

Once cepas corresponden a *T. asperellum*, una *T. rossicum*, una a *T. hamatum* y una no presento similitud a alguna de las especies reportadas (Cuadro 6), esto se puede atribuir a la secuencia tan corta que se obtuvo la que no pudo coincidir con las especies reportadas.

Conclusiones

La identificación molecular de *Trichoderma* determinó tres especies; *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma rossicum* y un aislado sin coincidir taxonómicamente con ninguna de los reportados de esta a la fecha.

Trichoderma spp. mostro actividad en cultivos duales, por compuestos volátiles y por sustancias toxicas en menor o mayor proporción contra *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *R. solani*.

Trichoderma mostro actividad antagonica en cultivos duales contra *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *R. solani* de las cuales destacan ocho cepas de (T2, T4, T8, T16, T17, T18, T19 y 31) y se ubicaron en la clase 1 de Bell *et al.* (1982).

Veintidos cepas de *Trihoderma* muestran inhibición por sustancias volátiles en los tres patógenos.

Trichoderma asperellum (T18) fue la cepa que mostro mayor efecto antagonico en los tres ensayos realizados en este estudio contra los tres

cepas de *Rhizoctonia solani* (TJ53, ACH42 y HSO56). Esta cepa tiene potencial para evaluarse en invernadero y campo.

Agradecimiento

El presente proyecto fue financiado por CONACYT-clave ECO-2006-CO1-52776 y a la empresa GreenCorp Biorganiks de Mexico, S. A de C. V.

Literatura Citada

Acosta, R. G. F., Luján y F. M. 2004. Selección de genotipos de chile de arbol y cayenne en el Estado de Chihuahua. Memorias Primera Convención Mundial del chile. León, Guanajuato, México. Resumen, 14 p.

Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. 838 p.

Andrade, M., R. L., y Elizondo, A.,D. 2008. Control biológico de enfermedades de importancia económica en chile y tomate en zacatecas. Resumen de las Memorias del simposio, XXXI congreso nacional de control biológico, Zacatecas, Zacatecas. 130 p.

Anguis, R. y Martin, C.1990. Caracterizacion y Patogenicidad de *Rhizoctonia solani* Kühn., que afecta a la papa en tres zonas ecologicas del Peru. Fitopatologia 25:16-22.

Apodaca, S. M. Á., E, Zavaleta, M., S. Osada, K. y García, R., E. 2004. Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:22-29.

Arzate, V. J., Michel, A. A. C., Dominguez, M. V. M. y Santos, E. O. A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *mycosphereella fijiensis*

- Morelet, agente causal de la sigatoka negra del platano (*Musa sp.*) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 24(2) 98-104.
- Bailey, A.M., Muñoz, S. C. I., Martínez, H., P. and Manriquez, E. M. 2001. Detection of additional gene products induced by the interaction between *Phytophthora capsici* and its host, *Capsicum annuum*, and the identification of an elicitor-coding gene. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 23-31.
- Baker, R., and Griffin, G. J. 1995. Novel approaches to integrated pest management, pp.153-182. *In: Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Plant Pathogens*. Reuveni R. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Bandy, BP; Leach, S. S., and Tavantzis, S. M. 1988. Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. Plant Dis. 72:596-598.
- Bara, M. T. F., Lima, A. L., and Ulhoa, J. C. 2003. Purification and characterization of a nexo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. Federation of Microbiological Societies, 219:81-85.
- Bell, D. K., Well, H. D., and Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 73:379-382.
- Benitez, T., Rincon, A., Limon, M. y Codon, A. C. 2004 Mecanismos de biocontrol de cepas de *Trichoderma*. International Microbiology 7:249-260.
- Calabrese, F. 1992. El aguacate. Ediciones Mundi-Prensa. España. 249 p.

- Carling, D., E., and Leiner, R.H. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 76:725-729.
- Carling, D., Kuninaga, S. and Brainard, K. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*. 92(1):43-50.
- Cherif, M., and Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80:1406-1414.
- CIP. Centro Internacional de la Papa. 1996. Principales enfermedades, nemátodos e insectos de la papa. Lima, Perú. 42 p.
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Minaré, B. L., Pádua, R. R. y Gomes, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium Rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11:3-8.
- Cruz-A. A., Mendoza, Z. C., y Romero, C., S. 2000. Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el suereste del estado de México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6(1):25-32.
- Dal Bello, G. M., Mónaco C. I., y Chávez A. R. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana Micología*, 14: 131-134.

- De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín N. L. 515 p.
- Djonovié, S., Pozo, M. M., and Kenerley, C. M. 2006. Tvbn3, a beta- 1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol. 72 (12):7661-70.
- Durán, P. E., Robles M. F., Martínez, T. J., Brito, A. M. 2003 *Trichoderma* un hongo combatiente de patógenos. Revista Técnico Ambiental 92:20-27.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, 562 p.
- Ezziyani, M., Perez, S. C., Sid, A. A., Emilia, R.M., y Emilia, C. M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L). Anales de Biología 26:35-45.
- Fernández, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana. Cuba, pp. 23-24.
- Ferrera, C., R. 2007. . Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismos. Capítulo 15 y 16. Editorial Trillas. México. 568 p.
- Fubicek, C., P. and Harman, G. E. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium* volume 1 (basic biology, taxonomy and genetics), Taylor and Francis, usa, pp. 7-32.

- Garcés de Granada, E., Orozco de A. M. y Zapata, Á., C. 1999. Fitopatología en Flores. Acta Biológica Colombiana. 4(2): 5-27.
- García y Castro, 2008. "El aguacate en México, origen y amenazas". Revista Ciencia y Desarrollo, 34 (225): 16-22.
- García, R., García, A., y Garnica, C. 2002. Distribucion, incidencia y alternativas e control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa en el Estado de Merida, Venezuela. Revista Latinoamericana de la Papa 13:24-40.
- García-Morató, M. 1999. Enfermedades fúngicas, bacterianas y fisiopatías. Pimientos. Capitulo 7. Edición de Horticultura. Barcelona, España. 167 p.
- Gómez, G. V. 2000. Principales enfermedades que afectan al cultivo del pimiento. Rev. Vida Rural. 107:1- 7.
- Guigón, L. C., y González, G. P. A. 2007. Manejo de plagas en el cultivo de chile y su impacto ambiental en la zona agrícola de Jiménez-Villa López, Chihuahua, México. Tecnociencia Chihuahua, I (2):36-47.
- Guillén, C. R., Hernández, C. F, D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., y Padrón, C. E. 2006. *Bacillus* spp. Como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonina y su efecto en el desarrollo y rendimiento de chile (*Capsicum annum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología.23:105-113.
- Harman, E. G. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.

- Hausbeck, M., K. and Lamour, K. H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant disease* 88(12):1292-1297.
- Hernández, F. D., Osorio H, E., F. Lara, F., Morales, G., Rodriguez, y R. (2008). Estudios *in vitro* de *Trichoderma* como agente de control biológico de la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solani*). II Congreso Nacional de Fitoprotección, X Congreso Mundial de *Trichoderma*, VII Congreso Nacional de Fitopatología; San Jose Costa Rica, 24 p.
- Hernández, F.D., Carvajal, C. R., Guerrero, E., Sánchez, A., Gallegos, G., y Lira, R. H. 2005. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo de *Rhizoctonia solani* Kühn colectados en zonas paperas de Chihuahua, México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* pp. 259-269 .
- Hofman, T. and Jongebloed, P. 1998. Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicidas. *Neth. J. Pl. Path.* 94:243-252.
- Hooker, W., J. 1986. *Compendium of potato diseases*. APS. 125 p.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:(1)4-10.
- Howell, C. R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96:178-180.

- Jager, G. and Velvis, H. 1988. Inactivation of sclerotia of *Rhizoctonia solani* on potato tubers by *Verticillium biguttatum*, a soil-borne mycoparasite. Neth. J. Pl. Path. 94(5):225-231.
- Jaramillo Villegas S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 120 p.
- Kataria, H. R., Verma, P. R., and Gisi, V. 1991. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. Phytopathology 81:121-133.
- Küçük, Ç. and Kivanç, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turk J Biol. 27:247-253
- Laborde, J. A. y O. Pozo. 1984. El presente y pasado del chile en México. SARH-INIA, México. 80 p.
- Lagunas, L., J., Zavaleta, M., E., Osada-Kawasoe, S., Aranda-Ocampo, S., Luna-Romero, I., y Vaquera-Huerta, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista Mexicana de Fitopatología 19: 57-65.
- Lehtonen, M. J. 2009. *Rhizoctonia solani* as a potato pathogen variation of isolates in Finland and host response. Academic dissertation in plant pathology, pp 1-81.
- LeLay, Y., Ruano, R. D., y López, H.C. (2007). Estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate.

- Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007. 80 p.
- López, G. A., Rebolledo, D., O. 2007. Selección de aislados de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora cinnamomi* Rands. Memorias del XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC. Mérida, Yucatán, México. Resumen pp. 27-30.
- López, H. C.J., Pérez, J. R. M., Basallote, U. M. J., Zea, B. T., Melero, V. J. M. 1997. Effect of solarization on the control of *Phytophthora* root rot in avocado. *Plant Pathology* 46: 329-340.
- López, H. C. J., Pérez, J., R. M., Llobel, A., Monte, V., E., Zea, B. T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 261-265.
- Macias, V. L. M., Reyes, M. L., Robles, E. F. J. 2006. Guía para cultivar papa en aguacalientes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Folleto técnico No. 3
- Martin, C. and Torres, H. 1989. Control of *Rhizoctonia* and other soil-borne diseases of TPS. Pages 191-205 in: *Fungal Diseases of the Potato. Report of Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato. Held at CIP, Lima, Peru. September 21-25, 1987.*
- Michel, A. A. C., Reyes, De la C, A., Otero, S. M. A., Rebolledo, D. O., y Lezama, G. R. 2005. Potencial antagónico *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Zinder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* en invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:286-293.

- Michel, A. A. C., Reyes, De la C, A., Otero, S. M. A., Rebolledo, D. O., y Lezama, G. R. 2004. Producción y actividad antibiotica del 6 pentil- α - pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (1):14-21.
- Mohammed. E., Perez. S. C., Ahmed. S. A., Requena. M., y Candela. M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora* en plantas de pimiento. Universidad de Murcia España. 170p.
- Mora, A. A., Téliz D., Etchevers J., D. y Huerta A. 1994. Manejo integrado del aguacate (*Persea americana*). Validación de Tecnología en Puebla, México. Revista Mexicana de Fitopatología 12: 51-62.
- Nuez F., Gil Ortega R., y Costa J. 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Capitulo 4. Ediciones Mundi-Prensa. España. 606 p.
- Ochoa, F. Y. M., Hernandez, F.D., Landeros, J., Olalde, V., Cerna, E., Morales, J. L., y Flores, A. 2005. Compatibilidad Sexual de *Phytophthora cinnamomi* Rands en Michoacán. International Journal of Experimental Botany, 79-85.
- Ogoshi, A. and Ui, T. 1985. Anastomosis group of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*. Pages 57-58 in: Ecology and management of soil-borne plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul MN.

- Orozco, S. M., López, P. J., Farías, L. J., y Arenas, V. M. 1998. Sustentabilidad en el manejo de plagas y enfermedades de cultivo agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 16(1):46-54.
- Orrieta, F., y Larrea, V. 2001 Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *International Microbiology* 62:96-100.
- Otrysko, B; Banville, G; and Asselin, A. 1985. Anastomosis group identification and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from tuberborne sclerotia. *Phytoprotection* 66:17-23.
- Parmeter, J.C.; R.T. Sherwood and Platt, W., D. 1969. Anastomosis groups among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59: 1270-1278.
- Parra, G., and Ristaino, J. 1998. Insensitivity to Ridomil Gold (mefenoxam) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. *Plant Disease*. 82:711.
- Pérez, M. L., Durán, O. L. J., Ramírez, M. R., Sánchez, P., J. R., y Olalde, P. V. 2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a funguicidas. Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas .CINVESTAV-Unidad Irapuato, Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Memorias Primera Convención Mundial del Chile. León Guanajuato, México. Resumen, p. 144-150.
- Pérez, M. L., Durán-O. L. J., Ramírez, M., R. y Sánchez, P. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a funguicidas de aislamiento

de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 19-23.

Powelson, M. L.; Johnson, K. B., and Rowe, R. C. 1993. Management of diseases caused by soilborne plant pathogens. In Rowe, RC. Ed. Potato health management. APS. P. 149-158.

Prado, G., Correa, F., Aricapa, M. y Escobar, F. 2001. Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn). Foro Arrocero Latinoamericano. 7(1):8-11.

Ramírez, V. J., y Romero, C., S. 1980. Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo. agente causal de la marchitez del chile Agrociencia. 39 p.

Randall, C.R. 1993. Potato health management. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 193 p.

Rey, M., Delgado J.-J., Rincón A. M^a., Limón M^a. Carmen y Benítez T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Rev. Iberoam Micol. 17: 31-36.

Reyes, R. T., Rodríguez, G. G., Pupo, Z. A. D., Alarcón, P. L., y Limonta, C. Y. 2007. Efectividad *In Vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* Sacc. aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L). Fitosanidad 11:23-33.

Rico, G. L., S. Medina, R., C. I. Muñoz, S., L. Guevara, O. y R. G. Guevara, G. 2004. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en plantas de

chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Rev. Méx. de Fitopatología 22:1-6.

Riveros, B. F., Sotomayor, R., Rivera, V., Secor, G., y Espinoza, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (montagne) de bary a metalaxil en cultivo de papas en el Norte de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 63(2):117-124.

Rodríguez B, A. 2001. Generalidades del Cultivo de la Papa en Colombia. En Vademecum del cultivo de la papa. Federación Colombiana de Productores de Papa–Fedepapa. pp, 1-42.

Rodríguez, M. V. M., J. J. Luna, R., P Valle, G., M. Tiscareño, L, y Ruiz, C. J. A.. 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el centro norte de México mediante un sistema de información geográfica. Rev. Méx. de Fitopatología 22:72-82.

Romero, C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347 p.

Samaniego, G., J. A. y Gámez, E., I.A. (2000). Evaluación de residuos para mantener la sanidad de semillas inoculadas con *Trichoderma* sp. en suelo infectado con *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 18:71-78.

Sánchez, M., I. 2000. Producción y consumo de aguacate en México. Monografía. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 150 p.

SAS OnlineDoc® 9 Copyright © 2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Sempere, F., and Santamarina, M. P. 2007. *In Vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia* 163(3):183-90.
- Sid-Ahmed, A., Pérez-Sánchez C., and Candela M.E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European J. of Plant Pathology* 106: 817 – 824.
- Sneh B. L. Burpee, and Ogoshi, A. 1991. Identifaction of *Rhizoctonia* species. *America Phytopatological Society*. St. Mn. USA. p133.
- Steel, R. G. D., y Torrie, J. H. 1986. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Libros Mcgraw-Hill de México, S. A. DE C.V. 228 p.
- Stefanova M., Leiva A., Larrinaga L., y Coronado M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad Agrónoma Luz*. 16:509-516
- Téliz, D. 2000. *El aguacate y su manejo integrado*. 1ª. Edición. Edición Mundi- Prensa. México. 219 p.
- Tondje, P. R. Roberts, D. P., Bon, M.C., Widmer.T., Samuels, G. J., Ismaiel, A., Begoude, A. D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fonten, D., and Hebbar., K. P. 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* wich potencial for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control* 43:202-212.

- Trabanino, R., Kuniyoshi, C., Michel, M. 2003. Manual de agentes de control biológico. Centro de Control Biológico para Centroamérica. Honduras. P.23-24.
- Tsor, L., Barak, R. and Sneb, B. 2001. Biological control of Black scurf on potato under organic management. *Crop Protection*. 20, p. 145-150.
- Velasco, V., G. (2006). Evaluación de efectividad Biológica de cepas de *Bacillus* spp. en la regulación de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* para el control de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) y su efecto en el desarrollo de plantas bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 60 p.
- Wharton, P., Kirk, W., Berry, D., and Snapp, S. 2007. Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato. Michigan State University; Michigan potato disease, Extension Bulletin E-2994-New-may 2007, 15p.
- Woo, S. L., Ruocco, M., and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96(2):181-185.
- Zavaleta, M. E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra* 17:(3) 201-207.
- Zavaleta, M., E. 1994. Control biológico de fitopatógenos con origen en el suelo y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 12(1):107-111.

Zentmyer, G. A., Menge, J., and Ohr, H. 1994. *Phytophthora* root rot. in:
Compendium of tropical fruit disease. Minnesota, APS Press, pp 77-
79.

APÉNDICE

Cuadro 1A. Crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*, a los dos días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	4.1	4.1	4.0	4.1
T2	3.5	3.5	3.6	3.5
T3	3.6	4.0	4.3	4.3
T4	3.6	4.0	3.7	3.9
T5	3.6	3.7	3.6	3.6
T6	4.0	3.5	3.5	3.6
T7	4.1	3.9	3.8	3.8
T8	3.9	4.3	3.9	3.9
T9	4.1	3.9	3.7	4.0
T10	4.0	4.3	3.6	4.0
T11	4.0	4.1	4.1	4.0
T12	3.9	3.6	4.0	3.1
T13	2.5	2.2	3.1	3.0
T14	4.1	4.0	4.0	4.0
T15	4.0	4.1	4.0	4.0
T16	3.9	3.9	4.0	3.9
T17	4.0	4.0	4.0	4.0
T18	4.0	4.0	4.2	4.2
T19	4.1	4.1	4.0	4.0
T20	4.1	4.0	4.2	4.1
T21	3.8	3.9	3.6	3.5
T22	4.0	4.0	4.1	4.2
T23	4.0	4.0	4.0	4.0
T24	4.0	4.0	4.1	3.8
T25	2.3	3.5	4.2	4.0
T26	3.5	4.0	4.0	4.0
T27	3.9	3.8	3.9	3.9
T28	3.8	3.6	3.9	3.8
T29	3.8	3.5	3.7	3.4
T30	3.8	3.7	3.6	3.8
T31	4.0	4.0	4.0	4.0

Cuadro 2A. Análisis de varianza del crecimiento micelial de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	130.7243548	4.3574785	77.12	<.0001
ERROR	9.3	5.2550000	0.0565054		
TOTAL	123	135.9793548			

C. V.= 6.579434

Cuadro 3A. Porcentaje de inhibición en centímetros de *Phytophthora capsici* por compuestos volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* a los 10 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	31	32	32	18
T2	33	28	47	32
T3	30	24	12	24
T4	18	18	28	8
T5	12	24	47	47
T6	31	24	50	38
T7	30	33	24	18
T8	24	30	32	32
T9	2	3	3	9
T10	12	33	34	18
T11	6	6	2	18
T12	12	35	33	41
T13	46	48	18	47
T14	8	12	12	5
T15	8	8	8	9
T16	12	18	29	12
T17	12	33	24	24
T18	15	6	8	5
T19	49	27	41	47
T20	22	13	25	46
T21	18	12	24	18
T22	53	26	38	35
T23	20	18	27	29
T24	46	53	33	47
T25	53	36	53	53
T26	31	49	35	41
T27	53	35	19	53
T28	18	29	24	35
T29	13	29	35	29
T30	22	24	21	35
T31	24	42	29	29

Cuadro 4A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	15908.37097	530.27903	6.25	<.0001
ERROR	93	7894.75000	84.88978		
TOTAL	123	23803.12097			

C. V.= 34.40175

Cuadro 5A. Porcentaje de inhibición de *Phytophthora capsici* por sustancias tóxicas producidas por 14 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	0	0	0	0
T2	0	10.5	21.17	27.05
T3	0	0	0	0
T4	8.23	8.23	14.11	7.05
T8	16.47	0	17.64	1.17
T10	0	0	0	0
T14	0	0	0	0
T15	0	0	3.52	0
T16	17.64	4.7	8.23	8.23
T17	0	0	0	0
T18	16.47	0	0	8.23
T25	5.8	0	0	32.94
T30	0	0	0	0
T31	11.76	29.41	0	20

Cuadro 6A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de por sustancias tóxicas producidas por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	14	2253.815328	160.986809	2.81	<0.0001
ERROR	45	2577.835610	57.285236		
TOTAL	59	4831.650938			

C. V.= 63.31350

Cuadro 7A. Crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi*, a los tres días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
1	4.4	4.4	4.6	4.5
2	4.2	4.0	4.4	4.0
3	4.4	4.5	4.5	4.2
4	4.0	4.5	3.8	4.5
5	3.8	4.0	3.0	3.7
6	3.8	3.8	4.1	4.0
7	4.6	3.8	4.1	4.0
8	4.2	4.6	4.4	4.6
9	4.2	4.2	4.3	4.5
10	4.6	4.4	4.4	4.3
11	4.6	4.3	4.6	5.3
12	4.3	4.6	6.5	5.8
13	3.8	3.5	3.5	3.7
14	3.9	4.4	4.6	3.9
15	4.6	4.6	4.0	3.8
16	3.9	4.3	4.4	4.6
17	4.3	4.4	4.4	4.2
18	3.8	4.2	4.6	4.2
19	4.0	4.1	4.1	4.2
20	4.4	4.1	4.2	4.1
21	4.6	4.1	4.2	4.1
22	4.5	4.2	4.4	4.5
23	4.8	4.5	4.5	4.5
24	4.5	4.3	4.2	4.2
25	4.3	4.6	4.2	4.5
26	2.9	3.9	4.0	4.3
27	3.9	3.9	3.8	3.9
28	4.0	4.0	3.8	4.0
29	4.0	3.9	4.1	4.6
30	4.2	4.2	4.0	3.8
31	4.4	4.6	4.7	4.5

Cuadro 8A. Análisis de varianza del crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	17.6698387	10.58899462	2.51	0.0004
ERROR	9.3	21.84500000	0.23489247		
TOTAL	123	39.51483871			

C. V. = 11.52176

Cuadro 9A. Porcentaje de inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por sustancias volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* a los 10 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	32	18	24	18
T2	11	29	29	35
T3	6	12	29	24
T4	14	41	32	24
T5	47	49	35	29
T6	49	47	47	62
T7	100	100	100	100
T8	47	53	53	41
T9	59	35	49	47
T10	47	53	38	24
T11	18	47	12	53
T12	29	12	24	41
T13	62	53	76	49
T14	47	52	54	53
T15	18	41	46	29
T16	69	53	46	62
T17	47	51	53	66
T18	53	62	65	53
T19	69	47	65	85
T20	53	66	56	58
T21	41	35	40	45
T22	65	61	53	65
T23	33	59	41	41
T24	18	29	18	37
T25	42	62	34	12
T26	88	47	88	59
T27	12	18	27	53
T28	53	24	65	35
T29	59	47	89	51
T30	18	47	20	37
T31	28	81	65	62

Cuadro 10A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	37264.38710	1242.14624	7.70	<.0001
ERROR	9.3	15003.00000	161.32258		
TOTAL	123	52267.38710			

C. V. = 27.69889

Cuadro 11A. Porcentaje de inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por sustancias toxicas producidos por 14 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	0	0	0	0
T2	50.28	48.23	41.17	65.88
T3	0	0	0	0
T4	15.29	8.23	11.76	7.05
T8	0	0	0	0
T10	0	0	0	0
T14	0	0	0	0
T15	0	0	0	0
T16	0	0	0	0
T17	0	0	0	0
T18	0	0	0	0
T25	0	0	0	0
T30	0	0	0	0
T31	0	0	0	0

Cuadro 12A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de sustancias toxicas producidos por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	13	9546.139280	734.318406	84.22	<.0001
ERROR	42	366.205975	8.719190		
TOTAL	55	9912.345255			

C. V. = 55.78327

Cuadro 13A. Crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solania* (ACH42), a los seis días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	3.2	3.2	3.5	3.5
T2	4	4.1	4	4.4
T3	3.5	3.9	4	3.5
T4	3	3.2	4	3.5
T5	3	3.2	2.8	3.1
T6	2.6	2.5	2.5	2.5
T7	2.6	2.5	2.5	3
T8	4.5	4.4	4.5	4.3
T9	2.4	2.5	2.5	3.7
T10	3.7	3.7	3	3.6
T11	2.5	2.5	3	2.5
T12	2.4	2.4	2.5	2.5
T13	2.2	2.2	2.3	2
T14	3.5	3.6	3	3.5
T15	3	3.2	3.2	3.2
T16	3.6	4	4	4
T17	3.9	3.5	4	3.8
T18	4.7	4	4	4.4
T19	3.5	3.3	3.5	3.5
T20	3	3	3	3
T21	2.5	2.5	2.5	2.5
T22	2.5	2.5	2.5	2.5
T23	2	2	2	2
T24	2	2	2	2
T25	5	5	5	5
T26	1.4	1.5	3	2
T27	1.5	2.4	2.2	2.5
T28	1.5	2.2	2.2	2.5
T29	2.2	2.4	2	2.3
T30	3	3.2	2.5	2.5
T31	4	4.2	4	3.5

Cuadro 14A. Análisis de varianza del crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (ACH42).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	80.28483871	2.67616129	35.64	<.0001
ERROR	93	6.98250000	0.07508065		
TOTAL	123	87.26733871			

C. V. = 9.038854

Cuadro 15A. Crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solania* (ACH42), a los seis días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	4.3	4.3	4.2	4.3
T2	3	3.5	3.7	3.7
T3	4	3.7	3.7	3.8
T4	4	4	4.8	3.5
T5	3.5	3.5	2.3	3
T6	2.5	2	2.5	3
T7	3.5	3.5	3.5	3.5
T8	3.5	3.8	4	3.8
T9	2.7	3.5	2.5	2.5
T10	3.6	4	3	3.4
T11	3	3.3	2.2	2
T12	3	3.2	3	3.6
T13	2.6	2.8	2.8	2.5
T14	3.5	3.4	3.5	3.5
T15	3.5	3.5	3.2	3
T16	3.5	4	4	4.1
T17	4	4	4	4
T18	4	4.2	4	4
T19	4	4.2	4	4
T20	2.7	2.5	2.5	2.7
T21	2	2.1	2.5	2
T22	2	2.4	2.1	2
T23	2.4	2	2	1.5
T24	2.8	1.7	2.7	2.9
T25	4	4	4.3	3
T26	3	3.5	3.5	3.5
T27	2.3	3.8	2.6	4
T28	3.5	4	2.3	3.5
T29	2.5	2	2.7	3.5
T30	3.5	3	3.5	4
T31	3.4	3.8	3.6	3.5

Cuadro 16A. Análisis de varianza del crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (HSO56).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	48.91048387	1.63034946	10.60	<.0001
ERROR	93	14.29750000	0.15373656		
TOTAL	123	63.20798387			

C. V. = 12.04944

Cuadro 17A. Crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solania* (TJ53), a los seis días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	4.7	4.5	4.8	4.8
T2	4.5	4.8	4.5	4.7
T3	4.4	4.3	4.6	4.8
T4	4.7	5	4.8	4.3
T5	2.5	2.4	3	2.5
T6	2.6	2.5	2.6	3
T7	2.6	2.5	3	3
T8	4.7	4.8	4.5	4.7
T9	3	3	3	3
T10	4.3	3.8	3.9	4.5
T11	3	3.5	3.4	3
T12	3	3.5	2.7	2.5
T13	2.4	2.4	2.4	2.4
T14	5	5	5	5
T15	5	5	5	5
T16	5	5	5	5
T17	4.8	4.3	4.5	5
T18	5	5	5	5
T19	4.5	4.6	4.7	4.2
T20	2.8	2.6	2.6	2.6
T21	2.5	2.4	2.3	2.3
T22	2.6	2.4	2.3	2.5
T23	2.6	2.7	2.5	2.5
T24	3	2.7	2.2	2
T25	2	2.5	2.7	2.5
T26	2.4	2.7	2.2	2
T27	3.5	3.3	3.6	3
T28	2	3	3	3
T29	3	3	3.5	3
T30	5	5	5	5
T31	4.5	4.2	4.2	4.5

Cuadro 18A. Análisis de varianza del crecimiento micelial en centímetros de 31 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (TJ53).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	130.7243548	4.3574785	77.12	<.0001
ERROR	93	5.2550000	0.0565054		
TOTAL	123	135.9793548			

C. V. = 6.579434

Cuadro 19A. Porcentaje de inhibición de *Rhizoctonia solani* (HS065) por sustancias volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* a los 10 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
1	0	0	0	0
2	0	50	62.5	43.75
3	0	0	56.25	0
4	0	0	0	0
5	37.5	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	50	25	0
11	0	0	12.5	18.75
12	12.5	37.5	12.5	25
13	50	43.75	43.75	68.75
14	72.2	37.5	0	68.75
15	0	0	0	37.5
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	25	50	50	25
19	12.5	12.5	12.5	50
20	0	37.5	0	50
21	75	50	0	0
22	50	0	0	0
23	50	0	12.5	43.75
24	0	0	50	0
25	50	0	37.5	0
26	68.75	43.75	43.75	50
27	37.5	0	0	0
28	37.5	0	0	81.25
29	0	0	0	0
30	0	68.75	68.75	12.5
31	0	0	0	0

Cuadro 20A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* (HSO56).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	30	21856.95169	728.56506	2.90	<.0001
ERROR	93	23355.80909	251.13773		
TOTAL	123	45212.76078			

C. V. = 75.64532

Cuadro 21A. Porcentaje de inhibición de *Rhizoctonia solani* (HSO56) por sustancias toxicas producidos por 14 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
T1	9.41	9.41	11.76	7.05
T2	0	0	0	0
T3	0	0	0	0
T4	0	0	0	0
T8	3.52	5.88	2.35	1.176
T10	0	0	0	0
T14	11.76	9.41	7.05	9.4
T15	0	0	0	0
T16	8.23	8.23	8.23	9.41
T17	0	0	0	0
T18	2.25	2.25	2.25	2.25
T25	0	0	0	0
T30	0	0	0	0
T31	0	0	0	0

Cuadro 22A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de sustancias toxicas producidos por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* (HSO56).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	14	1546.958075	110.497005	110.37	<.0001
ERROR	45	45.051270	1.001139		
TOTAL	59	1592.009344			

C. V. = 11.11227