



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Centro Interdisciplinario de Posgrados e Investigación
Decanato de Ciencias Biológicas
Maestría en Biotecnología

SE APRUEBA LA TESIS:

Actividad micoparasitica de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici*.

De la alumna: América Fernanda González García

Dr. José Terrones Salgado

Director de Tesis

Dra. Laura Contreras Mioni

Co - directora de Tesis

Puebla, México

08 de agosto 2022



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Norma y Abraham quienes con su amor, apoyo e inspiración me impulsaron a cumplir este sueño, gracias por inculcarme los valores del trabajo, de la dedicación, del respeto y del esfuerzo. Gracias por darme una profesión, por apoyarme en mis decisiones y en todos los momentos buenos y malos, por nunca darse por vencidos y enseñarme que todas nuestras metas se pueden lograr, los quiero mucho y este trabajo es para ustedes.

A mi hermano Diego gracias por las aventuras juntos, las enseñanzas, por estar conmigo y apoyarme en cada una de mis decisiones.

A mis amigas gracias por todo el apoyo, por estar conmigo en los momentos buenos y malos, gracias por su amistad durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Terrones Salgado por permitirme trabajar con él a pesar del poco tiempo que tuvimos, acompañarme durante la investigación, por su comprensión, apoyo y paciencia, muchas gracias.

A la Dra. Laura Contreras Mioni por apoyarme dentro del laboratorio, por sus asesorías, su apoyo a la presente investigación y por ser parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Verónica Rodríguez Soria por sus asesorías, por compartir sus conocimientos y por ser parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz por compartir sus conocimientos, asesorías y apoyo durante toda mi estancia en la maestría, por ser parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Alma Rosa Solano Báez por confiar en mí, compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de trabajar durante unos meses en su equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para realizar este proyecto durante toda mi estancia en la maestría y la obtención del grado.

A la Universidad Popular Autónoma de Puebla (UPAEP) por permitirme utilizar las instalaciones necesarias para el desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	12
1.1	Introducción.....	12
1.2	Problemática.....	14
1.3	Justificación.....	14
1.4	Objetivo general.....	15
1.5	Objetivo específico.....	15
II.	MARCO TEÓRICO	16
2.1	Principios de control en el manejo de problemas fitosanitarios.....	16
2.1.1	Control Cultural.....	16
2.1.2	Control Físico.....	17
2.1.3	Control biológico.....	17
2.1.4	Control químico.....	18
2.2	Plaguicidas en la Agricultura.....	18
2.2.1	Desarrollo de Plaguicidas.....	19
2.2.2	Los Plaguicidas en el medio ambiente.....	20
2.2.3	Efectos de plaguicidas sobre la salud.....	20
2.2.4	Resistencia de Fitopatógenos a Plaguicidas.....	20
2.3	Control biológico para el manejo de problemas fitosanitarios.....	21
2.4	Características de <i>Trichoderma</i> spp.....	25
2.4.1	Características morfológicas.....	25
2.4.2	Mecanismos de acción.....	26
2.4.3	Producción de <i>Trichoderma</i> spp.....	27
2.5	Características de <i>Fusarium graminearum</i>	28
2.6	Características de <i>Phytophthora capsici</i>	29
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1	Origen de los aislados.....	30
3.2	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	30
3.3	Purificación de los aislados.....	31
3.4	Reactivación de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Phytophthora capsici</i>	31
3.5	Ensayo por cultivo dual.....	32
3.6	Caracterización morfológica y morfométrica de aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	33
3.7	Caracterización molecular.....	33

IV.	Resultados.....	34
4.1	Caracterización morfológica y morfométrica de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	36
4.2	Caracterización molecular de <i>Trichoderma gamsii</i>	40
4.3	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma gamsii</i>	40
4.4	Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma gamsii</i>	44
V.	DISCUSIÓN	48
VI.	CONCLUSIÓN	51
VII.	LITERATURA CITADA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. de siete días de edad en medio de cultivo PDA a $25 \pm 1^\circ \text{C}$	26
Figura 2.	Esporulación de muestras de suelo en medios de cultivo T2.....	34
Figura 3.	Crecimiento en medio de cultivo PDA de los seis aislados de <i>Trichoderma gamsii</i> y evaluación del cultivo dual, en condiciones controladas de temperatura $25^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ con 12 horas luz/ 12 horas oscuridad.....	36
Figura 4.	Características morfométricas de los seis aislados de <i>Trichoderma gamsii</i> , (a) conidios, (b) fiálides y (c) conidióforos.....	39
Figura 5.	Crecimiento micelial de seis aislados de <i>Trichoderma gamsii</i> vs <i>Fusarium graminearum</i>	42
Figura 6.	Crecimiento micelial de seis aislados de <i>Trichoderma gamsii</i> vs <i>Phytophthora capsici</i>	43
Figura 7.	Porcentaje de inhibición de seis aislados de <i>Trichoderma gamsii</i> contra <i>Fusarium graminearum</i>	46
Figura 8.	Porcentaje de inhibición de seis aislados de <i>Trichoderma gamsii</i> contra <i>Fusarium graminearum</i>	47

ÍNDICE CUADROS

Cuadro 1.	Comparación de inhibición y medios de cultivo de <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Clonostachys rosea</i>	24
Cuadro 2.	Clasificación de las cinco zonas de recolección de suelo extraídas de un rancho con terreno de cultivo de maíz en el municipio de Zacatlán, Puebla.	30
Cuadro 3.	Esporulación y conteo de las Unidades Formadoras de Colonia de las cinco zonas estudiadas.....	34
Cuadro 4.	Evaluación del porcentaje de inhibición de los veintidós aislados de <i>Trichoderma gamsii</i>	35
Cuadro 5.	Caracterización morfológica y morfométrica de los seis aislados pertenecientes a la especie <i>Trichoderma gamsii</i> extraídas de suelo de la localidad de Zacatlán, Puebla.....	38
Cuadro 6.	<i>Trichoderma gamsii</i> aislado e identificado a partir de suelo de cultivo de maíz.....	40
Cuadro 7.	Análisis de varianza de la variable crecimiento de micelio en respuesta al organismo fungoso y biocontrolador.....	40
Cuadro 8.	Crecimiento micelial (mm) de la interacción organismo fungoso y biocontrolador.....	41
Cuadro 9.	Análisis de varianza de la variable crecimiento de micelio de <i>Fusarium graminearum</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	41
Cuadro 10.	Crecimiento micelial (mm) de <i>Fusarium graminearum</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	42
Cuadro 11.	Análisis de varianza de la variable crecimiento de micelio de <i>Phytophthora capsici</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	42
Cuadro 12.	Crecimiento micelial (mm) de <i>Phytophthora capsici</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	43
Cuadro 13.	Análisis de varianza de la variable porcentaje de inhibición micelial en respuesta al organismo fungoso y biocontrolador.....	44
Cuadro 14.	Porcentaje de inhibición de la interacción organismo fungoso y biocontrolador.....	44

Cuadro 15.	Análisis de varianza de la variable porcentaje de inhibición micelial de <i>Fusarium graminearum</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	45
Cuadro 16.	Porcentaje de inhibición micelial de <i>Fusarium graminearum</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	45
Cuadro 17.	Análisis de varianza de la variable porcentaje de inhibición micelial de <i>Phytophthora capsici</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	46
Cuadro 18.	Porcentaje de inhibición micelial de <i>Phytophthora capsici</i> controlado con diferentes aislados de <i>Trichoderma gamsii in vitro</i>	46

RESUMEN

Las plagas en plantas son una de las principales limitaciones para la producción de cultivos ocasionando una pérdida total o parcial del producto, es por ello por lo que los agricultores recurren al uso de plaguicidas, los cuales son sustancias utilizadas para el manejo y control de plagas presentes en la agricultura, sin embargo, son una de las principales fuentes de contaminación ambiental, por eso se han ido buscando alternativas más ecológicas para su control.

El maíz (*Zae mays*) es el principal cultivo sembrado en México, sin embargo es atacado por factores bióticos y abióticos, dentro de los primeros tenemos a las enfermedades inducidas por fitopatógenos, dentro de los principales, destacan *Fusarium graminearum* causante de tizones foliares y pudrición en la mazorca y el grano de maíz, por otro lado, el chile (*Capsicum annum*) es de las principales hortalizas sembradas en México y es atacado por *Phytophthora capsici* que afecta la raíz ocasionando la muerte, dentro de un manejo integrado de los fitopatógenos mencionados, se ha utilizado el uso de hongos antagónicos como lo es *Trichoderma* spp.

El principal objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad micoparasítica y antagónica de *Trichoderma gamsii* contra *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici* aislados de suelo de cultivo de maíz del municipio de Zacatlán, Puebla.

Los aislados de *T. gamsii* y *F. graminearum* que se usaron son provenientes de cultivo de maíz y los aislados de *P. capsici* fueron provenientes de cultivo de chile por lo que se evaluó su actividad antagónica mediante un ensayo de cultivo dual, posteriormente se hicieron las características morfológicas y moleculares correspondientes a los seis aislados.

El ensayo de cultivo dual mostro que los seis aislados inhibieron el crecimiento micelar con un 77.61 % a 81.49 % para el caso de *F. graminearum* y 79.48 % a 86 % para *P. capsici*, se observó que *T. gamsii* tuvo un mejor control sobre *P. capsici*. Por lo que los aislados de *T. gamsii* provenientes de Zacatlán, Puebla podrían ser una buena opción para el manejo de *P. capsici* en cultivos de chile.

ABSTRACT

Pests in plants are one of the main limitations for crop production causing a total or partial loss of the product, that is why farmers resort to the use of pesticides, which are substances used for the management and control of pests present in agriculture, however, they are one of the main sources of environmental pollution, that is why they have been looking for more ecological alternatives for their control. Corn (*Zae mays*) is the main crop planted in Mexico, however it is attacked by biotic and abiotic factors, within the first we have the diseases induced by phytopathogens, among the main ones, *Fusarium graminearum* that causes leaf blight and rot in the cob and corn grain, on the other hand, the chili (*Capsicum annum*) is one of the main vegetables planted in Mexico and is attacked by *Phytophthora capsici* that affects the root causing death, within an integrated management of the phytopathogens mentioned, the use of antagonistic fungi such as *Trichoderma* spp. has been used. The main objective of this work was to analyze the mycoparasitic and antagonistic capacity of *Trichoderma gamsii* against *Fusarium graminearum* and *Phytophthora capsici* isolated from corn crop soil of the municipality of Zacatlán, Puebla. The isolates of *T. gamsii* and *F. graminearum* that were used are from corn cultivation and the isolates of *P. capsici* were from chili culture, so their antagonistic activity was evaluated by a dual culture assay, later the morphological and molecular characteristics corresponding to the six isolates were made. The dual culture trial showed that the six isolates inhibited micellar growth with 77.61% to 81.49% for *F. graminearum* and 79.48% to 86% for *P. capsici*, it was observed that *T. gamsii* had better control over *P. capsici*. So, the isolates of *T. gamsii* from Zacatlán, Puebla could be a good option for the management of *P. capsici* in chili crops.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Para la producción comercial de cultivos agrícolas es importante el uso de métodos que protejan los cultivos de fitopatógenos que ocasionarían una pérdida total o parcial de la cosecha (Hashem *et al.*, 2019).

En las últimas décadas ha existido un aumento constante en el uso de plaguicidas, alcanzando un consumo de 1.3 kg por persona/año, esto se debe a la falta de cuidado en su uso y mercadeo (Del Puerto *et al.*, 2014). El uso excesivo de estos ha provocado que los casos de resistencia de fitopatógenos incrementen, ocasionando que los agricultores aumenten la dosis o bien el uso de productos más tóxicos, teniendo consecuencias hacia el medio ambiente y la salud humana y animal. Esto ha generado la necesidad de buscar nuevos productos para el control de plagas, pero con productos de origen biológico para disminuir el impacto negativo que hasta ahora los plaguicidas han generado (Del Puerto *et al.*, 2014).

La alternativa para evitar el uso de productos químicos sintéticos es el uso de bioplaguicidas, estos están hechos a base microorganismos beneficiosos y se utilizan con la finalidad de reducir la población de plagas. Estos productos iniciaron con el objetivo de hallar nuevas formas de controlar plagas sin afectar a sus enemigos naturales como lo hacen los plaguicidas convencionales. Dentro de los microorganismos más utilizados se encuentran los hongos estos se usan comercialmente y son producidos para el control biológico, pertenecen al orden Hypocreales los cuales incluyen *Bauveria Bassiana*, *Metarhizium spp.*, *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium spp.*, siendo los microorganismos más importantes para el control de insectos, mientras que los hongos antagonistas son biocontroladores que contribuyen al control de las enfermedades de los cultivos, y el principal y más utilizado es *Trichoderma harzianum* antagonista de diferentes organismos fungos incluyendo *Fusarium spp.* y *Phytophthora spp.* (Hashem *et al.*, 2019).

Las especies de *Trichoderma* tienen un papel importante en la supresión de enfermedades en diferentes cultivos al antagonizar directamente a los fitopatógenos, así como también inducir resistencia sistémica en las plantas, las cuales llegan a presentar cambios físicos y bioquímicos positivos para la defensa de posteriores fitopatógenos (Zhou *et al.*, 2018).

Trichoderma spp. tiene la capacidad de parasitar otros hongos y competir con microorganismos presentes en las plantas, este hongo tiene la característica de producir un gran número de metabolitos secundarios como: policetidos, pironas, terpenos volátiles y no volátiles.

Contreras - Cornejo *et al.* (2016) menciona que *Trichoderma* spp. ha demostrado su capacidad para tolerar metabolitos tóxicos producidos por diferentes microorganismos, así como promover el crecimiento de plantas y provocar resistencia sistémica inducida que protege a las plantas de los ataques de fitopatógenos.

Trichoderma spp. y sus metabolitos secundarios podrían tener un efecto en el crecimiento y la nutrición de las plantas, así como generar una inducción de resistencia sistémica y biocontroladora de fitopatógenos. Este modo de control biológico se utiliza para suprimir enfermedades presentes en plantas y el crecimiento de los fitopatógenos que están presentes en ellas, dentro de los mecanismos de defensa de *Trichoderma* spp. está la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antagonismo y resistencia sistémica inducida (Contreras – Cornejo *et al.*, 2016). Es por ello que los objetivos de este estudio son analizar la capacidad micoparasítica y antagónica de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici* aislados del cultivo de maíz y chile respectivamente caracterizar morfológica y molecularmente aislados de *Trichoderma* spp. provenientes de Zacatlán, realizar pruebas de antagonismo de los aislados de *Trichoderma gamsii* y por último evaluar la actividad micoparasítica y antagónica de *Trichoderma gamsii* contra *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici*.

1.2 Problemática

El manejo incorrecto de plagas y enfermedades presentes en la agricultura ha provocado el uso frecuente y excesivo de plaguicidas para el control de los mismos, mediante la utilización de fungicidas sintéticos de tipo preventivo o sistémico. Sin embargo, esto ha generado que los fitopatógenos presentes en las plantaciones adquieran resistencia a los compuestos encontrados en estos productos (Mena y Couoh, 2015).

Otro de los principales problemas del uso de plaguicidas son la contaminación hacia el ambiente amenazando la estabilidad de los sistemas bióticos y abióticos (Del Puerto *et al.*, 2014), así como también la creación de suelos en los que ya no se puede sembrar algún tipo de plantación debido a la falta de nutrientes.

1.3 Justificación

Los problemas ocasionados por el mal uso de plaguicidas utilizados en la agricultura para proteger los cultivos contra enfermedades han empezado a tener consecuencias en el medio ambiente, salud de las personas y han generado diferentes mecanismos de resistencia en fitopatógenos induciendo al uso excesivo de estos o la implementación de productos más tóxicos (Mena y Couoh, 2015).

Debido a esos problemas está ocurriendo un cambio de paradigma en la producción, buscando que haya un menor impacto ambiental y por ello la migración a una agricultura orgánica debido a que es una forma más respetuosa con el medio ambiente y ofrece alimentos con una menor cantidad de residuos de plaguicidas en comparación con la agricultura convencional (Reganold y Watcher, 2016). Por lo que es importante la implementación del control biológico que consiste en eliminar plagas o enfermedades mediante organismos vivos como parasitoides, predadores o entomopatógenos (Kohl *et al.*, 2019).

Los bioplaguicidas, son productos utilizados para el control de plagas y enfermedades en la agricultura cuyo origen es procedente de algún organismo vivo y generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente (Nava *et al.*, 2012). Estos productos contribuyen a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica del país. En México el uso de bioplaguicidas es escaso debido a la falta de información de estos organismos, tal es el caso de las especies nativas como *T. gamsi*.

1.4 Preguntas de investigación

¿Los aislados de *Trichoderma* spp. provenientes de Zacatlán tienen la capacidad de actuar como micoparásitos y antagonicos en *F. graminearum* y *P. capsici*?

1.5 Objetivo específico

Analizar *in vitro* la capacidad micoparasítica y antagonica de *Trichoderma gamsii* contra *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici* para evaluar su control biológico.

1.6 Objetivos específicos:

- Caracterizar morfológica y molecularmente aislados de *Trichoderma* spp. provenientes de Zacatlán, Puebla.
- Realizar pruebas de antagonismo y micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma gamsii*.
- Evaluar la actividad micoparasitica y antagonica de *Trichoderma* spp. para el control de *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici* de manera *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Principios de control en el manejo de problemas fitosanitarios

El manejo fitosanitario es un conjunto de métodos y técnicas para la prevención, control y eliminación de enfermedades en plantas, procurando la estabilidad y bienestar de un cultivo, evitando que surjan enfermedades que lo puedan dañar. El principio de control fitosanitario se rige bajo los siguientes puntos (TRICHODEX, 2016).

El principio de exclusión es la primera opción del manejo fitosanitario a partir de que un patógeno simbolice un riesgo de ingreso y establecimiento en un área determinada. Bajo este principio se pretende evitar el proceso de contagio en la región de interés, se aplica el control legal y está basado en la Ley Federal de Sanidad Vegetal y las Normas Oficiales Mexicanas, debido a que es la primera barrera para los patógenos que están cuarentenados y que aún no están dentro del país (Maloy, 2005) (DOF, 2016).

El segundo principio es erradicación que consiste en la destrucción o eliminación de una plaga en su área. Este proceso consiste principalmente en la vigilancia (distribución de la plaga), contención (prevención de la diseminación de la plaga) y medidas de control (erradicación de la plaga). Radica principalmente en patógenos que ya se encuentran dentro del país por lo que se busca evitar que se establezcan y se dispersen, para este principio también se aplica el control legal y está basado en la Ley Federal de Sanidad Vegetal y las Normas Oficiales Emergentes (Maloy, 2005).

El tercer principio es protección, consiste en la implementación de estrategias de control con la intención de impedir la infección de la planta mediante un patógeno que ya se encuentra establecido, basándose en los siguientes manejos fitosanitarios (Maloy, 2005):

2.1.1 Control Cultural

Es un método preventivo que consiste en prácticas agrícolas que contribuyen a prevenir y disminuir plagas o enfermedades directamente sobre el cultivo. Las estrategias que se incluyen en este tipo de control son:

Rotación de cultivos: Los fitopatógenos fúngicos son capaces de sobrevivir en ausencia de las plantas hospedantes incluso después de que los desechos de cosechas ya estén secos. La rotación de cultivos es utilizada para el control de enfermedades en plantas ya que permite la disminución del inóculo debido a que cultivos repetitivos de una misma especie pueden generar una

acumulación de los fitopatógenos ocasionando que la planta sea rápidamente susceptible a las enfermedades que ya se han presentado en el cultivo anterior (Cotes y Elad, 2018).

Uso de variedades tolerantes o resistentes a plagas y enfermedades: Consiste en el uso de plantas que sean capaces de evitar el proceso de infección de enfermedades específicas en comparación con aquellas variedades que son susceptibles (Miñano y Dapaena, 2015).

Nutrición: Un manejo adecuado de la nutrición puede reducir la incidencia de enfermedades en la planta, dentro de las medidas que ayudan a la reducción de estos problemas es utilizar fertilizantes con mayor cantidad de nitratos que de nitrógeno amoniacal o bien mantener la planta con un alto contenido de calcio (Cotes y Elad, 2018), se debe tomar en cuenta que esta medida no siempre será efectiva, todo va a depender del patógeno a controlar.

Riego por goteo: permite reducir el agua libre en el follaje y evita que se tenga humedad relativa alta, estos dos factores son capaces de propiciar el crecimiento de fitopatógenos causando severos daños (Cotes y Elad, 2018).

Tapetes sanitarios: son una solución desinfectante que se utilizan como una medida de prevención con la finalidad de evitar que residuos de fitopatógenos que se encuentren en objetos que vienen del exterior sean capaces de entrar a las zonas donde se encuentran las plantas.

2.1.2 Control Físico

Consiste en el uso de agentes físicos como temperatura, humedad, luz solar, aire seco y longitudes de onda de luz desfavorables que resulten mortales para controlar plagas y/o enfermedades sin perjudicar al cultivo (Cañedo *et al.*, 2011). Se utilizan barreras como mayas antiáfidos, cubiertas plásticas y cubiertas de vidrio con el fin de limitar la entrada de factores que nos ocasionen daño, también se implementan tratamientos con calor para eliminar inóculos presentes en suelo o sustrato (Cañedo *et al.*, 2011).

2.1.3 Control biológico

El control biológico consiste en la supresión de enfermedades mediante la aplicación de agentes de biocontrol (hongos, bacterias o virus), estos actúan para prevenir una infección por parte del patógeno a la planta. Estos organismos son altamente específicos por lo que se consideran inofensivos para las especies no objetivo (O'Brien, 2017).

Dentro de los microorganismos benéficos que se van a poder seleccionar van a hacer los aislados que sean efectivos contra los fitopatógenos de tal modo que estos sean capaces de producirse en medios artificiales (Kohl *et al.*, 2019). En el control biológico entran el manejo de:

Suelos supresivos: consiste en suelos con presencia de uno o varios microorganismos antagonistas a fitopatógenos, debido a la producción de antibióticos, producción de enzimas líticas y parasitismo directa del patógeno, dentro de los organismos que presentan estas características se encuentran *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea*, *Trichoderma viride*, y *Trichoderma gamsii*.

Cultivos trampa: consiste en sembrar con el cultivo principal otra especie de planta que sea de interés para la plaga que se desea controlar, esto con el fin de que la plaga ataque al cultivo trampa, como ejemplo esta es la siembra de plantas alrededor del campo con el objetivo de que entre la menor cantidad posible de pulgones que porten un virus a la siembra.

2.1.4 Control químico

Consiste en el uso de plaguicidas los cuales son sustancias químicas y muy tóxicos utilizados para controlar o matar a las plagas presentes en cultivos. Estas sustancias pueden ser: insecticidas, acaricidas, rodenticidas, nematicidas, herbicidas, fungicidas, etc. (Cañedo *et al.*, 2011). La IRAC (2021) clasifica a los insecticidas y acaricidas como: carbamatos, organofosforados, piretroides, piretrinas, neonicotinoides, sulfoximinas, butenolides, spinosines, avermectinas, milbemicinas, fenoxicarb, piriproxifén, floururos, clofentezín, etoxazol, benzoilureas, buprofezín, bifenazato y fosfuros. La FRAC (2019) menciona que un fungicida inhibe el crecimiento de un hongo mediante la interferencia de los procesos celulares críticos, este modo de acción se refiere al proceso celular específico que inhibe el fungicida, estos se clasifican en acilalaninas, hidroxipirimidas, isoxazoles, benzimidazoles, tiofanatos, toluamidas, fenilureas benzofeninas, benzoilpiridinas, oxatin – carboxamidas, imidazolionas, ariloxiquinolinas y morfolinas.

2.2 Plaguicidas en la Agricultura

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, que interfiere en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, etc. También se incluyen sustancias destinadas a utilizarse como reguladores de crecimiento de las plantas, defoliantes,

desecantes y sustancias aplicadas a los cultivos en pre o postcosecha para proteger el producto contra la deterioración de enfermedades que se presenten (FAO, 2017).

Los plaguicidas (fungicidas, insecticidas, alguicidas, desecantes, reguladores de crecimiento, acaricidas, ovicidas, repelentes y herbicidas) son sustancias que se utilizan para el control de plagas que afectan la producción y comercialización de alimentos.

Actualmente en México hay 70,000 plaguicidas en el mercado debido a que el uso de estos ha ido en aumento drásticamente ya que la producción de las principales fuentes de nutrición humana se ha duplicado, ocasionando que la producción de los alimentos no sea menor y que los costos no se eleven (Gamboa *et al.*, 2018). Los plaguicidas se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos:

Los plaguicidas orgánicos se clasifican en compuestos volátiles los cuales se derivan de hidrocarburos y pueden llegar hacer altamente volátiles, también están los compuestos persistentes estos compuestos se llegan a considerar una amenaza ya que es difícil que se degraden debido a la estabilidad que presentan además de que tienen la capacidad de moverse con facilidad en el ambiente (Gamboa *et al.*, 2018).

Los plaguicidas inorgánicos están compuestos por metales pesados como el zinc, plomo, cadmio o manganeso induciendo algún tipo de daño en el ser humano (Dahiri Khattabi, 2018).

2.2.1 Desarrollo de Plaguicidas

Durante el surgimiento y desarrollo del hombre se han combatido plagas que afectan los cultivos y productos, a partir del uso de sustancias capaces de eliminarlos, la evolución de los plaguicidas se puede dividir en tres fases o etapas. La primera etapa inicio a partir de la Revolución Industrial derivado del incremento de la producción, almacenamiento y protección de los alimentos por lo que hubo un incremento sustancial en la producción de sustancias químicas de toxicidad inespecífica, pero de bajo costo. La segunda etapa llamada “era de los fumigantes” se descubrió la acción plaguicida de elementos naturales como azufre, cobre, arsénico, piretrinas y fosforo, así como el disulfuro de carbono y bromuro de metilo. La tercera etapa llamada “era de los productos sintéticos” se empezaron a sintetizar y a utilizar los dinitroderivados, a partir de esta etapa se sintetizaron plaguicidas como: organoclorados y organofosforados que son los más tóxicos y menos estables en el ambiente (Del Puerto *et al.*, 2014).

2.2.2 Los Plaguicidas en el medio ambiente

La contaminación ambiental por plaguicidas se da a partir de aplicaciones directas a los cultivos agrícolas, derrames accidentales o residuos en el suelo. Los restos de estos plaguicidas se dispersan en el ambiente convirtiéndose en contaminantes para los sistemas bióticos y abióticos amenazando su estabilidad y representando un peligro para la salud. La distribución de un plaguicida va a depender de su capacidad de absorción y de la naturaleza del suelo, por lo que un suelo con gran capacidad de absorción puede conducir a la inactividad total del plaguicida ya que nunca penetrara en la planta. La contaminación por plaguicidas se puede dar por aire, suelo y agua (Devindroppa *et al.*, 2018).

2.2.3 Efectos de plaguicidas sobre la salud

Los plaguicidas están en contacto con el ser humano mediante vías de exposición como: la respiratoria, digestiva y dérmica, ya que se pueden encontrar en el aire inhalado, agua y alimentos. Estas sustancias tendrán efectos sobre la salud cuando la exposición sea mayor a los niveles seguros, las exposiciones se pueden dar de forma directa o indirecta, la primera consiste en los agricultores que aplican el producto sin utilizar equipo de protección y la segunda se refiere al residuo que puede quedar en el fruto si se cosecha al instante de que se le aplico el producto por ende puede llegar a los consumidores. La toxicidad de los plaguicidas se da de cuatro formas: toxicidad oral aguda, toxicidad dérmica, toxicidad por inhalación y toxicidad crónica (Del Puerto *et al.*, 2014).

2.2.4 Resistencia de Fitopatógenos a Plaguicidas

El uso excesivo de plaguicidas ha generado que los fitopatógenos empiecen a tener resistencia a los compuestos aplicados. La resistencia a fungicidas se define como una reducción adquirida y heredable de la sensibilidad de un hongo a un principio activo antifúngico específico, entre los mecanismos de resistencia se encuentran las modificaciones a la vía metabólica, alteraciones en el sitio blanco causando la reducción de la sensibilidad del organismo, entre otros (Mena y Couoh, 2015). Esta resistencia que se genera es una condición heredable y estable en organismos fúngicos por lo que tienen una habilidad de adaptación a diferentes condiciones adversas que les permite sobrevivir. A partir de la resistencia que se genera algunos hongos pueden sobrevivir, multiplicarse y propagarse a pesar de ser expuestos a los fungicidas que normalmente

ejercían un control sobre el hongo, este proceso involucra una modificación genética y bioquímica que llega a conferir resistencia al hongo fitopatógeno (Carmona y Sautua, 2017).

2.3 Control biológico para el manejo de problemas fitosanitarios

Las plantas son organismos capaces de defenderse mediante una amplia variedad de mecanismos físicos y químicos contra fitopatógenos, por lo que mejorar su resistencia es una de las principales estrategias para prevenir pérdidas bióticas en los cultivos.

El control biológico consiste en la supresión de poblaciones fitopatógenas presentes en plantas mediante organismos vivos, dentro de este control es importante resaltar a los agentes de control microbiano ya que estos son capaces de proteger cultivos dañados mediante diferentes modos de acción: directa o indirectamente (Kohl *et al.*, 2019).

Las acciones indirectas se basan principalmente en la resistencia sistémica inducida contra infecciones por un patógeno sin interacciones antagonistas directas, con esto nos referimos a una secuencia compleja de eventos donde los agentes de control biológico se establecen inicialmente en el hospedante seguido de la liberación de inductores específicos que son reconocidos por receptores definidos por la planta para después desencadenar rutas dentro del hospedante, dando como resultado el inicio de reacciones de defensa para preparar a la misma para ataques posteriores de fitopatógenos. Otro modo de acción indirectamente es la competencia por los nutrientes y el espacio, en el cual la germinación y crecimiento de fitopatógenos va a depender de la absorción de nutrientes, por lo que los mismos van a explotar las fuentes de nutrientes de una manera mucho menos específica al degradar la materia vegetal orgánica muerta, tal es el caso de las bacterias, hongos y oomicetos que son fitopatógenos necrotróficos los cuales matan y posteriormente invaden los tejidos de las plantas, utilizando los nutrientes disponibles como colonizadores primarios de tejidos muertos (Kohl *et al.*, 2019).

En la competencia por espacio y nutrientes *Trichoderma* spp. produce varios sideróforos que quelan el hierro y es el causante de detener el crecimiento de organismos fitopatógenos por lo que *Trichoderma* spp. puede competir por el espacio. Sin embargo, debido a que las plantas son capaces de exudar carbohidratos *Trichoderma* spp. compete por estos metabolitos como su principal fuente de carbono (Contreras - Cornejo *et al.*, 2016).

Los modos de acción directamente se basan en el hiperparasitismo o metabolitos secundarios afectando directamente a los fitopatógenos objetivos mediante cascadas de eventos fisiológicos. Se

entiende como parasitismo a la interacción competitiva que hay entre dos organismos en el que uno de los dos obtiene nutrientes del otro (Kohl *et al.*, 2019).

El hiperparasitismo va a depender del hongo huésped (fitopatógeno) vivo y obtiene nutrientes de las células huésped mediante haustorios sin matarla, las interacciones entre el huésped y el hongo micoparásito son de forma estable y equilibrada, estas interacciones pueden ser componentes importantes en la supresión de enfermedades. Los antagonistas con hiperparasitismo tienen un rango de hospedantes estrechos y su actividad va a depender de las condiciones ambientales en cambio su actividad antagonista depende del crecimiento activo (Kohl *et al.*, 2019).

Los micoparásitos dentro de los que destaca *Trichoderma* spp, son aquellos hongos que funcionan contra un hongo huésped y obtienen nutrientes de ellos para mantener su crecimiento. Estos micoparásitos llevan a cabo su proceso mediante los siguientes pasos: primero los micoparásitos crecen en la dirección del hongo huésped, se da un reconocimiento específico en los sacáridos del micoparásito que se unen a la lectina de la superficie del hongo huésped, después se da el contacto y la penetración donde el micoparásito se entrelaza con el micelio del hongo huésped y penetra a través de estructuras de infección especializadas por lo que se pueden secretar enzimas que degraden la pared celular del hongo huésped y por último los micoparásitos adquieren nutrición del hongo huésped y liberan una toxina o antibiótico para debilitar la actividad del hongo que se desea (Sun *et al.*, 2020).

En cambio, la antibiosis ocurre mediante metabolitos secundarios pertenecientes a grupos heterogéneos de compuestos orgánicos producidos por microorganismos que son perjudiciales para el crecimiento o las actividades metabólicas de otros microorganismos, estos compuestos son producidos y liberados en pequeñas cantidades al ambiente. Los actinomicetos, bacterias y hongos son los encargados de producir una gran cantidad de antibióticos conocidos. Los metabolitos secundarios son considerados como uno de los modos de acción más eficiente de los microorganismos contra los competidores permitiendo a los microorganismos productores tener ventajas competitivas (Kohl *et al.*, 2019).

La acción directa puede inducir o mejorar la resistencia primaria contra infecciones provocadas por un fitopatógeno en tejidos vegetales mediante una interacción antagónica con el fitopatógeno, otra acción es la producción de metabolitos secundarios que tienen un efecto inhibitorio en contra de los fitopatógenos. Los antagonistas con metabolitos secundarios como un modo de acción se pueden seleccionar mediante bioensayos adecuados si se prevé la producción *in situ* por

antagonistas vivos o *in vitro* si existe la aplicación de metabolitos formulados. El riesgo de desarrollar resistencia a metabolitos secundarios por fitopatógenos se considera bajo los metabolitos que se lleguen a producir (Kohl *et al.*, 2019).

En el control biológico, los hongos más estudiados pertenecen a la especie de *Trichoderma harzianum* y *Clonostachys rosea*, ambos hongos son micoparásitos ya que los aislados antagonistas de estos géneros varían en el rango de hospedantes y los aislados individuales tienen una variedad de hospedadores fitopatógenos de plantas (Kohl *et al.*, 2019).

La asociación de microorganismos a estos organismos implica simbiosis, antagonismo o antibiosis, algunos otros microorganismos benéficos son *Bacillus* spp., *Gliocladium* spp. y *Pseudomonas* spp. (Devindroppa *et al.*, 2018).

Bacillus subtilis: es una bacteria grampositiva que forma biopelículas en superficies inertes, esta bacteria es capaz de secretar antibióticos y sintetizar enzimas hidrolíticas como: proteasas, celulasas y glucanasas, con la intención de modificar el entorno de manera auto beneficiosa y producir endosporas. *Bacillus subtilis* es capaz de sintetizar lipopéptidos que se encargan de brindarle una protección a la planta y de suprimir los hongos fitopatógenos al momento de inducir una resistencia sistémica en la planta hospedante (Hashem *et al.*, 2019). Del 4 al 5 % del genoma de *B. Subtilis* se dedica a la síntesis de antibióticos, así como diversos compuestos antimicrobianos (Chaves y Wang, 2004). Dentro de los mecanismos de acción indirectos asociados a esta bacteria se encuentran la promoción de crecimiento de la planta, competencia por nutrientes, capacidad de inducir lisis celular y resistencia sistémica inducida (Hashem *et al.*, 2019)

Pseudomonas florencens: son bacterias presentes en suelos agrícolas que son capaces de procesar condiciones cambiantes del medio ambiente, así como de inducir resistencia en las plantas ocasionando que estas bacterias toleren el ataque de fitopatógenos. *Pseudomonas* spp. puede producir reguladores de crecimiento vegetal y metabolitos con efecto antagónico (Aviléz, 2021).

Esta bacteria posee la capacidad de crecer rápidamente *in vitro*, competir agresivamente con otros microorganismos, adaptarse a condiciones ambientales y producir una amplia gama de antibióticos que son supresores de enfermedades como la pudrición de la raíz negra del tabaco producida por *Thielaviopsis* o la marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* en *Solanum lycopersicum* (Waller, 2007).

Clonostachys rosea: se encuentra en zonas tropicales, templadas o desérticas, es un hifomiceto capaz de producir conidios unicelulares penicilados o verticiliados, pero también es endófito ya



Figura 1. Crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. de siete días de incubación en medio de cultivo PDA a $25 \pm 1^\circ \text{C}$

La temperatura óptima para el desarrollo de *Trichoderma* spp. es de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, sin embargo, maneja un rango de temperatura que va de los 15°C a 35°C , en cuanto al porcentaje de humedad relativa ideal es del 70 % pero este hongo es capaz de crecer en un ambiente que va de los 20 – 80 % de humedad relativa (Torrez Ortiz, 2018).

2.4.2 Mecanismos de acción

Trichoderma spp. es conocido por ser un agente de biocontrol que se utiliza contra enfermedades presentes en cultivos mediante diferentes mecanismos de acción como se describe a continuación:

Micoparasitismo: *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de atacar y destruir organismos fitopatógenos ya que penetra la pared de la célula huésped (célula del fitopatógeno) donde *Trichoderma* spp. crece a lo largo de las hifas para después secretar enzimas que se van a encargar de degradar la pared celular del fitopatógeno.

Competencia por nutrientes: la competencia por nutrientes es una de las principales causas por la que los microorganismos del suelo mueren. Es importante destacar que debido a los carbohidratos que exudan las plantas *Trichoderma* spp. es capaz competir por estos metabolitos para que sean su principal fuente de carbono, evitando el desarrollo de un fitopatógeno (Abbas *et al.*, 2017).

Antibiosis: la antibiosis consiste en la producción de compuestos de tamaño pequeño y que se conocen como antibióticos, estos van a hacer capaces de inhibir el crecimiento de otros

microorganismos (Bhandari *et al.*, 2021). El proceso antagónico de *Trichoderma* spp. se basa en la producción de antibióticos o enzimas hidrolíticas. Dentro de los principales compuestos se destacan los acetaldehídos, gliotoxinas y viridinas, estos compuestos son capaces de generar una fuerte actividad inhibitoria sobre muchos hongos (Hyder *et al.*, 2017).

Resistencia inducida: Cuando los suelos son tratados con aislados de *Trichoderma* spp. generan una resistencia sistémica en las plantas por lo que se llega a observar una disminución en las enfermedades foliares y de raíz en las plantas (Hyder *et al.*, 2017).

2.4.3 Producción de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. es uno de los agentes de control biológico más exitoso dentro del campo de la agricultura, se encuentra presente como bioplaguicida, biofertilizante, promotor de crecimiento vegetal y como solubilizador de nutrientes. Este microorganismo es producido mediante formulaciones sólidas y líquidas (Agamez *et al.*, 2018).

Para la producción masiva de inoculantes biológicos se necesitan fuentes de carbono y nitrógeno para promover el crecimiento y desarrollo, porque los sustratos comúnmente utilizados son arroz, avena, papa, soya, trigo, cebada, etc., siendo utilizados para la fermentación sólida. Las diferentes formulaciones para los hongos antagonistas van a depender del modo de acción del hongo por lo que para uso comercial se prefiere que sea material seco (Arévalo *et al.*, 2017). La producción en masa de *Trichoderma* spp. en fermentación en estado sólido de granos de cereales es un proceso muy utilizado pero que consume tiempo y espacio.

Trichoderma spp. es capaz de suprimir la esporulación de varios fitopatógenos presentes en las plantas al competir por el crecimiento saprofítico limitando la colonización de los tejidos por el hongo fitopatógeno. Este bioagente se encarga de suprimir la esporulación e infección de fitopatógenos al competir por nutrientes y colonizar heridas.

Es un hongo que tiene potencial como biofungicida para el control biológico de enfermedades, la producción en masa de este hongo se logra mediante la fermentación en estado sólidos, se utilizan sustratos de arroz y residuos agroindustriales como: cascarilla de arroz, paja de arroz, trigo y medios que sean subproductos de la industria azucarera (Agamez *et al.*, 2018).

2.5. Características de *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum es un hongo fitopatógeno que ataca a una gran variedad de cultivos mediante el desarrollo de micotoxinas como el deoxinivalenol, que ocasionan pudrición de raíz en la planta. Este patógeno llega a invadir el tallo cerca de la superficie del suelo o bien entra a la planta mediante sus raíces (Leyva *et al.*, 2017), se puede desarrollar en cualquier etapa fenológica y sus principales síntomas son: pudrición de semilla, ahogamiento de planta, pudrición de raíz, tizones, cánceres, marchitez y enfermedades foliares.

Este fitopatógeno fue extraído de un cultivo de maíz el cual presentó pudriciones en mazorca, tallo y grano. Las características morfológicas que presentó *F. graminearum* fueron un micelio que va de un color coral a un morado oscuro algodonoso, forma esporodoquios de color naranja pálido en donde se desarrollaron macro conidios delgados con forma de canoa que miden $2.5 \times 35 \mu\text{m}$, contienen entre cinco y seis septos, forma clamidosporas las cuales son en forma globosa midiendo de 10 a $12 \mu\text{m}$ de diámetro. Este hongo se caracteriza por tener una célula apical en forma de cono y una célula basal en forma de pie (Pesquero, 2017).

Taxonomía

Reino: *Fungi*

Clase: *Sordariomycetes*

Orden: *Ascomycota*

Familia: *Hypocreales*

Género: *Fusarium*

Especie: *Graminearum* (MYCOBANK, 2022).

F. graminearum es el causante de la contaminación de granos mohosos en maíz, este hongo se caracteriza por ser haploide, homotalico y con fase sexual la cual ocurre cuando el hongo crece saprofiticamente y se desarrollan peritecios, la infección de este patógeno puede ocurrir a través de pequeñas aberturas naturales como las estomas o por penetración directa dentro de las primeras 36 a 48 hrs después de la inoculación (Cerón, 2014).

2.6 Características de *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici es un oomiceto capaz de producir la pudrición de la raíz, la corona, las hojas y del fruto. Esta enfermedad es capaz de desarrollarse en campos con una alta acumulación de agua y se llega a propagar en condiciones cálidas y húmedas (Lamour *et al.*, 2012).

Taxonomía

Reino: *Chromista*

Clase: *Oomycota*

Orden: *Peronosporales*

Familia: *Perenosporaceae*

Género: *Phytophthora*

Especie: *Capsici* (MYCOBANK, 2022)

Los síntomas de este oomiceto van a variar según el hospedante, sin embargo, en áreas de infección cómo lo son el jitomate, chile y/o pimiento vamos a encontrar a este oomiceto en las raíces de la planta. Dentro de la sintomatología que una planta infectada puede mostrar esta una lesión de color negro/marrón en el tallo a nivel de suelo, marchitez, crecimiento atrofiado y la muerte de la planta. El fitopatógeno estudiado fue aislado de un área de cultivo de chile, donde comenzó a presentarse un crecimiento lento de la planta, necrosis en el tallo y marchitez en las hojas.

La temperatura optima de crecimiento varia de 25 a 30° C con una humedad relativa alta (entre un 70 – 80 %), en cuanto a su tiempo de esporulación este se produce de 2 a 3 días (Lamour *et al.*, 2012).

P. capsici se caracteriza morfológicamente por mostrar un micelio liso concéntrico y de color blanco algodonoso (Diaz *et al.*, 2015), un crecimiento de tipo filamentosos, estolonífero, toruloso o pentaloide (Pons *et al.*, 2020). Muestra esporangios de 20 – 50 × 15 – 42.5 µm, clamidosporas esféricas u ovaladas que pueden llegar a medir 35 µm de diámetro, hialinas o marrón oscuro, sus hifas pueden ser lisas, hinchadas o tuberculosas (Doñas, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de los aislados.

Se colectaron muestras de suelo obtenidas de un rancho localizado en el municipio de Zacatlán, Puebla con coordenadas 19° 56' 00" N 97° 57' 38" O, donde el principal cultivo cosechado es maíz, la recolección de las muestras se hizo de cinco diferentes zonas del rancho las cuales se clasificaron como lo muestra el cuadro 2, posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Fitosanidad de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.

Cuadro 2. Clasificación de las cinco zonas de recolección de suelo extraídas de un rancho con terreno de cultivo de maíz en el municipio de Zacatlán, Puebla.

Zona	Lugar de recolección
Zona 1	Monte
Zona 2	Rancho lado A
Zona 3	Rancho lado B
Zona 4	Casa 1
Zona 5	Casa 2

La zona uno pertenece al lugar de recolección "Monte" ya que esta muestra se recolecto de un pequeño monte que está en la propiedad, la zona dos y tres pertenecen a "Rancho lado A" y "Rancho lado B" estas muestras fueron extraídas de dos puntos diferentes del terreno principal y por ultimo las zonas cuatro y cinco pertenecen a "Casa uno" y "Casa dos" estas fueron tomadas de una parte del terreno cerca a la casa que se encuentra dentro del rancho. En las cinco zonas muestreadas se siembra maíz solo que el terreno se encuentra dividido en estas tres secciones.

3.2 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Se peso 1 g de muestra de suelo posteriormente se colocó en tubos con 10 mL de agua destilada estéril y se agito en un vortex durante cinco min, cada muestra se fue clasificando de acuerdo a la zona de la que se obtuvo, posteriormente se hicieron disoluciones seriadas 1:10 de las cuales con ayuda de una micropipeta se fueron tomando 1000 µL de la tercera disolución que se hizo y se plaqueo en cajas Petri con los siguientes medios de cultivo: Papa Dextrosa Agar (PDA), T2, TSMC y V8. Las cajas sembradas se colocaron en una incubadora a 26 ± 1 °C durante cinco

días (Samaniego *et al.*, 2018). Posteriormente se realizó un recuento de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) con el micelio que se obtuvo en las cajas Petri, para el cálculo de las UFC/g se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = (\text{N}^\circ \text{ de colonias significativas en la última placa considerada} * \text{FDD}) / \text{Volumen inicial sembrado}$$

Donde

- FDD= Factor Decimal de Dilución

Con las colonias de micelio que se obtuvieron se fueron cortando discos de 5 mm de diámetro, posteriormente se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo PDA, se colocaron en una incubadora a $26^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ durante siete días.

3.3 Purificación de los aislados

Con la técnica de punta de hifa y con la ayuda de una jeringa de insulina estéril se obtuvieron fragmentos de micelio del hongo previamente sembrado y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durante siete días. Posteriormente se tomaron pequeños cuadros del medio PDA y se sembraron en medio de cultivo Agua - Agar y se incubaron a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 h, posterior a este tiempo las cajas Petri se colocaron en un microscopio y con una jeringa de insulina estéril se tomaron puntas de hifa presentes en el medio, se extrajeron y se colocaron en medio de cultivo T2 y se incubaron a 25° durante seis días (Moya *et al.*, 2014).

3.4 Reactivación de *F. graminearum* y *P. capsici*

Los aislados de *F. graminearum* y *P. capsici* fueron obtenidos en un estudio realizado previamente. Bajo condiciones de esterilidad y con una jeringa de insulina se tomó un fragmento de micelio de *F. graminearum* extraído de una solución de papa dextrosa, se colocó en papel estéril para retirar el exceso de agua y posteriormente se colocó en una caja Petri que contenía medio de cultivo PDA, la cual fue sellada y colocada en una incubadora a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ durante siete días, posteriormente se tomaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro que se utilizaron para la confrontación en el ensayo de cultivo dual. Este mismo procedimiento se realizó para *P. capsici* (Luna, 2017).

3.5 Ensayo por cultivo dual

Mediante el ensayo por cultivo dual se evaluó el antagonismo de los seis aislados de *Trichoderma* spp. contra *F. graminearum* aislado de maíz y *P. capsici* aislado de Chile. En una caja Petri que contenía medio de cultivo PDA se colocó un disco de micelio de *Trichoderma* spp. de aproximadamente 5 mm de diámetro en uno de los extremos, posteriormente en la misma caja Petri se colocó un disco de micelio de *F. graminearum*, las cajas se sellaron y se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que alguno de los dos hongos tocara el extremo del otro, lo mismo se realizó para el oomiceto *P. capsici*, el experimento se condujo bajo un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones, cada 24 hrs se marcó por debajo de la caja Petri el crecimiento micelial del antagonista y con base a este calcular el porcentaje de inhibición micelial (PICM) con la siguiente ecuación (Luna, 2017):

$$PICM = \frac{(C - T) * 100}{C}$$

Donde:

- C= Crecimiento en cm del fitopatógeno solo, sin confrontación
- T= Crecimiento en cm del fitopatógeno con confrontación

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA y comparación de medias (Tukey) utilizando el programa SAS V.9.1 para Windows.

Este mismo experimento se realizó con los primeros cuarenta y cuatro aislados obtenidos de las cinco muestras de suelo, para descartar aquellas que no mostraban características morfológicas a *Trichoderma* spp. que no presentaran un porcentaje de inhibición mayor o igual la 80 % o que no tuvieron ningún control antagónico contra los fitopatógenos, con el propósito de ir disminuyendo el total de muestras que se iban a ser sometidas a una característica molecular.

Se determinó la competencia por sustrato mediante la escala de bell (Ñakato y Valencia, 2016) la cual se divide en 5 clases; la primera es cuando el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo, la segunda es cuando cubre dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo, la tercera es cuando el antagonista y el patógeno se encuentran en medio del cultivo y ninguno domina, la cuarta es cuando el patógeno sobrepasa coloniza tres cuartas partes del medio

de cultivo y por último la quinta clase es cuando el patógeno llega a colonizar todo el cultivo. Se utilizó esta escala para evaluar el nivel de antagonismo que presentaron los aislados evaluados.

3.6 Caracterización morfológica y morfométrica de aislados de *Trichoderma* spp.

A partir de que se obtuvieron los aislados puros de *Trichoderma* spp. se realizó la caracterización morfológica evaluando el color de la colonia y la textura del micelio. Para la caracterización morfométrica en un portaobjetos se colocó una gota de ácido láctico, posteriormente un disco de micelio de PDA, la muestra se cubrió con un cubreobjetos, se hicieron las observaciones en un microscopio óptico y las imágenes se captaron bajo un objetivo de 100x para posteriormente realizar las siguientes descripciones: forma y tamaño de conidios, fiálides y tamaño de conidióforos (García *et al.*, 2017).

3.7 Caracterización molecular de aislados de *Trichoderma* spp.

Se realizó la extracción de ADN mediante el método Fosfatasa Alcalina (AP) (Ruiz *et al.*, 2014, Sambrook y Russel, 2001). Se amplificaron las regiones del espacio transcrito interno (Internal Transcribed Spacer) utilizando los iniciadores ITS1 / ITS4 (Gardes y Bruns 1993; Staats *et al.*, 2005; White *et al.*, 1990) combinado con el programa de termociclado propuestos por White *et al.* (1990). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones con el método de Sanger en la empresa Macrogen ([http:// dna.macrogen](http://dna.macrogen.com), Corea). Las secuencias resultantes se analizaron por DNASTAR (2001) y Sequencher (2014), y la alineación se realizó con Clustal W en MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias se compararon usando el algoritmo BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se depositaron en el GenBank.

IV. RESULTADOS

A partir de las cinco muestras de suelo que se extrajeron de la zona de Zacatlán, Puebla y que se clasificaron de acuerdo con la zona de la que fueron tomadas (rancho lado A, rancho lado B, casa 1, casa 2 y monte) se observó que el mejor medio de cultivo de crecimiento micelial fue T2 ya que en este medio fue donde se obtuvieron la mayoría de las colonias utilizadas, seguida de TSMC, y por último el medio de cultivo V8 no presento ningún tipo de crecimiento (Figura 2).

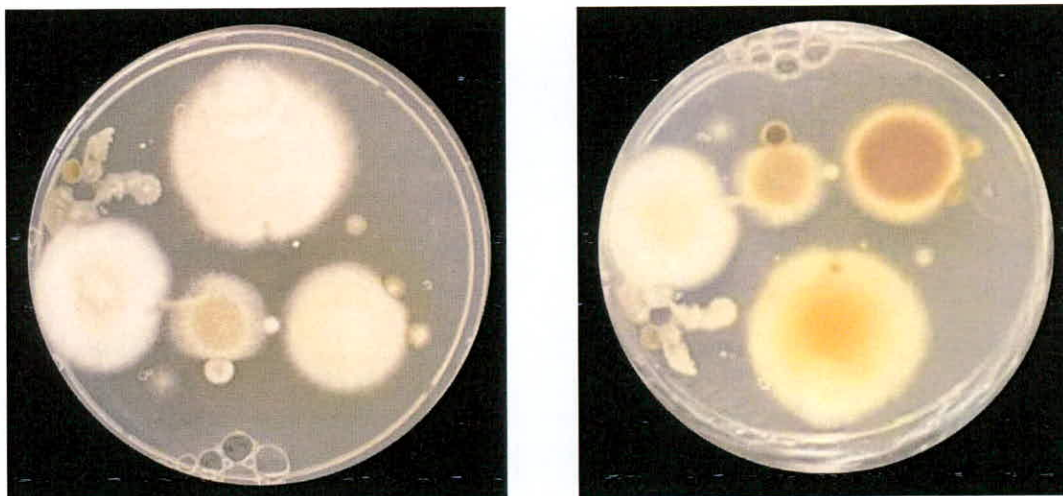


Figura 2. Crecimiento de *Trichoderma* spp. de siete días de incubación aislada de suelo en medios de cultivo T2

Las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se utilizan para realizar un conteo sobre la cantidad de microorganismos vivos presentes en el suelo, se tomó como UFC/g al micelio que creció en las cajas Petri (Cuadro 3).

Cuadro 3. Esporulación y conteo de las Unidades Formadoras de Colonia de las cinco zonas estudiadas

ZONA	MEDIO DE CULTIVO	UFC/g de suelo
ZONA 1	T2	2000
ZONA 2	T2	21000
ZONA 3	T2	500
ZONA 4	T2 y TSMC	18000
ZONA 5	T2	1000

Solo la zona cuatro fue la única que tuvo esporulación en dos medios de cultivo (T2 y TSMC), al final se obtuvieron un total de 44 aislados las cuales se sometieron a una primera prueba de

antagonismo contra *Phytophthora capsici* y *Fusarium graminearum*, como resultado se obtuvieron 14 aislados con parasitismo, nueve con antibiosis y 21 que no mostraron ningún mecanismo de defensa.

Con los 23 aislados que se obtuvieron como resultado de las primeras pruebas tempranas de antagonismo, se hizo una primera evaluación de cultivo dual donde se midió el porcentaje de inhibición (Cuadro 4), se descartaron aquellos aislados que tuvieron una inhibición menor al 80 %, quedando un total de seis aislados los cuales se sometieron a un segundo ensayo de cultivo dual.

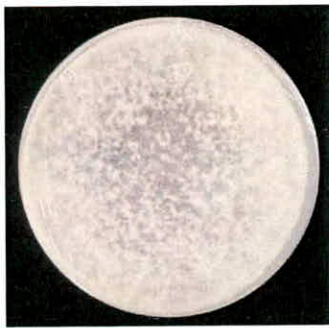
Cuadro 4. Evaluación del porcentaje de inhibición de los 23 aislados de *Trichoderma gamsii* obtenido de suelo

Aislados	% de inhibición con <i>P. capsici</i>	% de inhibición con <i>F. graminearum</i>
H1	82.54	71.59
H2	82.76	81.49
H6	88.27	78.36
H7	79.42	77.60
H13	81.09	75.08
H15	84.48	80.02
H16	83.74	80.71
H17	75.07	61.91
H18	82.62	73.40
H20	81.14	77.75
H21	79.30	78.22
H22	77.95	79.45
H24	86.00	80.21
H25	81.28	78.88
H27	87.06	76.05
H28	81.16	79.11
H32	82.34	80.73
H33	81.42	76.83
H34	82.19	79.22
H35	80.20	80.60
H38	85.40	75.44
H43	81.74	78.72
H44	80.50	75.42

Los resultados mostraron que los 23 aislados de *Trichoderma gamsii* inhibieron el crecimiento de *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici*.

4.1 Caracterización morfológica y morfométrica de los aislados de *Trichoderma* spp.

Los seis aislados de *Trichoderma* spp. cubriendo por completo la caja Petri en un total de 4 días, pero empezaron a tomar un color amarillo – verde a los seis a ocho días (Figura 4), los aislados se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales ($25 \pm 1^\circ \text{C}$ con 12 horas luz/ 12 horas obscuridad), el tipo de micelio que mostraron fue aéreo. El único aislado que mostró un color diferente en el micelio desde un principio fue la H35 (*Trichoderma gamsii*). En el cuadro 5 se observan las características morfológicas y morfométricas de los seis aislados.



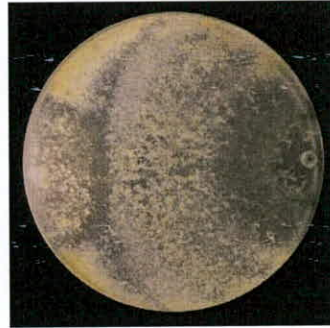
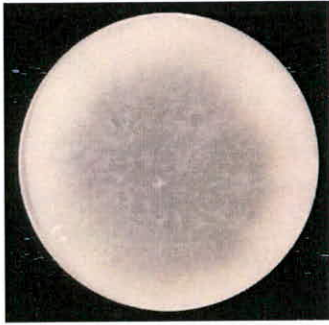
H2: *Trichoderma gamsii*



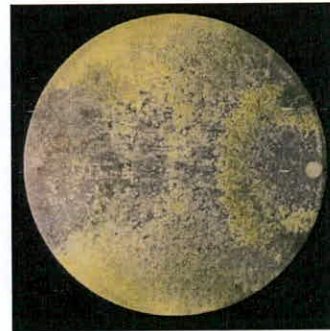
H15: *Trichoderma gamsii*



H16: *Trichoderma gamsii*



H24: *Trichoderma gamsii*



H32: *Trichoderma gamsii*



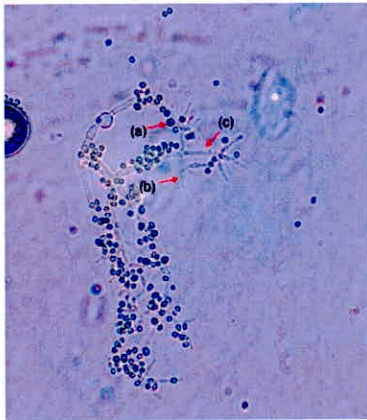
H35: *Trichoderma gamsii*

Figura 3. Crecimiento en medio de cultivo PDA de los seis aislados de *Trichoderma gamsii* y evaluación del cultivo dual, en condiciones controladas de temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con 12 horas luz/ 12 horas oscuridad

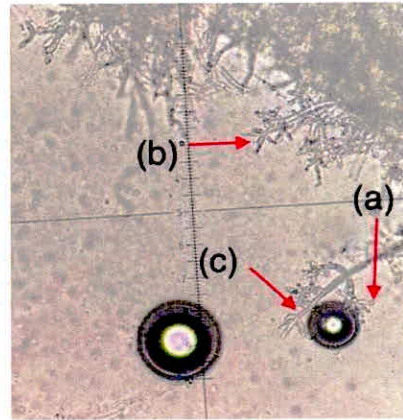
Cuadro 5. Caracterización morfológica y morfométrica de los seis aislados pertenecientes a la especie *Trichoderma gamsii* extraídas de suelo de la localidad de Zacatlán, Puebla.

N° de aislado	Especie	Color de colonia	Esporulación	Forma de conidios	Forma de fiálides	Tamaño de conidios (μm)	Tamaño de Fiálides (μm)	Tamaño de conidioforos (μm)
H2	<i>Trichoderma gamsii</i>	Blanca/ Verde	Abundante - algodonosa	Globosas	Globosa	1.85 μm de largo x 1.05 μm de ancho	2.80 μm de largo x 1.60 μm de ancho	164 μm de largo
H15	<i>Trichoderma gamsii</i>	Blanca/ Amarilla - Verde	Abundante	Globosas	Globosa	1.85 μm de largo x 1.30 μm de ancho	2.45 μm de largo x 1.30 μm de ancho	160 μm de largo
H16	<i>Trichoderma gamsii</i>	Blanca/ Verde	Poca esporulación	Subglobosas	Elipsoide	2.10 μm de largo x 1.60 μm de ancho	2.25 μm de largo x 1.25 μm de ancho	170 μm de largo
H24	<i>Trichoderma gamsii</i>	Blanca/ Amarilla	Abundante - algodonosa	Subglobosas	Globosa	1.6 μm de largo x 1.47 μm de ancho	2.2 μm de largo x 1.5 μm de ancho	157.5 μm de largo
H32	<i>Trichoderma gamsii</i>	Blanca/ Amarilla - Verde	Poca esporulación	Subglobosas	Globosa	1.88 μm de largo x 1.40 μm de ancho	2.27 μm de largo x 1.45 μm de ancho	162 μm de largo
H35	<i>Trichoderma gamsii</i>	Verder	Poca esporulación	Globosas	Subglobosa	1.95 μm de largo x 1.60 μm de ancho	2.10 μm de largo x 1.45 μm de ancho	165 μm de largo

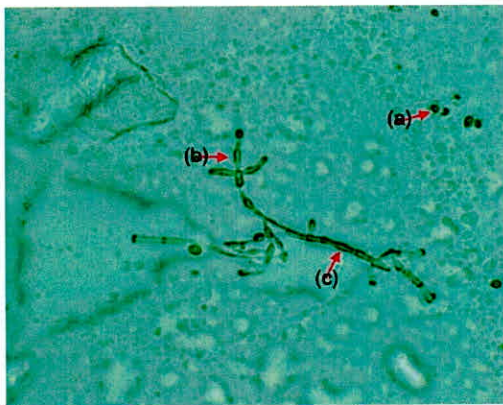
Los aislados evaluados mostraron hifas hialinas, los aislados H2, H15, H24 y H35 pertenecientes a la especie *Trichoderma gamsii* presentaron conidios globosos en grupos de dos a tres, clamidosporas delgadas y abundantes, fiálides en triada siendo en medio la parte más ancha y ramificaciones. El aislado H16 mostro conidios en forma de ovalo en grupos de tres, fiálides delgadas y en triada, conidióforos largos y delgados. El aislado H32 (*Trichoderma gamsii*) presento conidióforos largos y con ramificaciones, conidios ovoides, y fiálides en par y triada a lo largo del conidióforo, en el cuadro 5 se describen las características morfométricas obtenidas de los seis aislados de *Trichoderma gamsii* (Cuadro 5) (Figura 5),



H2 (*Trichoderma gamsii*)



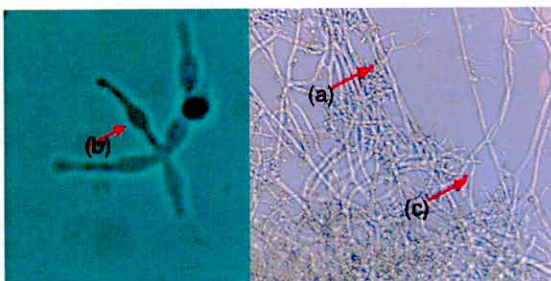
H15 (*Trichoderma gamsii*)



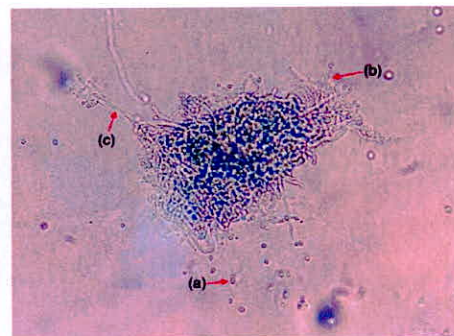
H16 (*Trichoderma gamsii*)



H24 (*Trichoderma gamsii*)



H32 (*Trichoderma gamsii*)



H35 (*Trichoderma gamsii*)

Figura 4. Características morfométricas de los seis aislados de *Trichoderma gamsii*, (a) conidios, (b) fiálides y (c) conidioforos.

4.2 Caracterización molecular de *Trichoderma gamsii*

Los números de acceso de las secuencias ITS obtenidas se mencionan en el cuadro 6, los accesos de los seis aislados (H2, H15, H16, H24, H32 Y 35) presentaron una similitud del 100 % con el número de acceso MK361138 de *Trichoderma gamsii*, lo cual refuerza la caracterización morfométrica, morfológica y cultural.

Cuadro 6. *Trichoderma gamsii* aislado e identificado a partir de suelo de cultivo de maíz

Especie de <i>Trichoderma</i>	Clave del aislado	Numero de acceso del GenBank ITS1 e ITS4 ^z	Porcentaje de similitud	Numero de acceso del GenBank ITS1 e ITS4
<i>Trichoderma gamsii</i>	H2	ON406132	100 %	MK361138
<i>Trichoderma gamsii</i>	H15	ON406133	100 %	MK361138
<i>Trichoderma gamsii</i>	H16	ON406134	100 %	MK361138
<i>Trichoderma gamsii</i>	H24	ON406135	100 %	MK361138
<i>Trichoderma gamsii</i>	H32	ON406136	100 %	MK361138
<i>Trichoderma gamsii</i>	H35	ON406137	100 %	MK361138

^z Número de accesión de los aislados obtenidos en la presente investigación

4.3 Pruebas de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma gamsii*

Se identificó interacción entre los factores ($F = 24.37, p = \leq 0.0001$), además se encontraron diferencias significativas para el factor hongo ($F = 102.67, p = \leq 0.0001$) y para el factor biocontrolador ($F = 25.78, p = \leq 0.0001$) (cuadro 7) al realizar el análisis de comparación de medias se identificó que el aislado H24 (*Trichoderma gamsii*) fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos ya que presentó menor crecimiento de micelio siendo este de 13.59 cm en comparación con el aislado H15 (*Trichoderma gamsii*) que mostró mayor crecimiento de micelio con un valor de 16.75 cm.

Cuadro 7. Análisis de varianza de la variable crecimiento de micelio en respuesta al organismo fungoso y biocontrolador.

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc.	Pr>Fc	
Rep		5	11.73	2.35	3.94	0.0043
Hongo		1	61.14	61.14	102.67	<.0001
Hongo*Rep		5	4.55	0.91	1.53	0.1985
Biocontrolador		5	76.77	15.35	25.78	<.0001
Hongo*Biocontrol		5	72.58	14.52	24.37	<.0001

Cuadro 10. Crecimiento micelial (mm) de *Fusarium graminearum*. controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii in vitro*.

Biocontrolador	Aislado	Crecimiento micelial
<i>Trichoderma gamsii</i>	H15	17.3 a ^z
<i>Trichoderma gamsii</i>	H16	16.87 ab
<i>Trichoderma gamsii</i>	H24	16.13 bc
<i>Trichoderma gamsii</i>	H35	14.98 cd
<i>Trichoderma gamsii</i>	H32	14.88 d
<i>Trichoderma gamsii</i>	H2	14.28 d

^zLos valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (*= p≤0.05) según la prueba de comparación de medias Tukey.

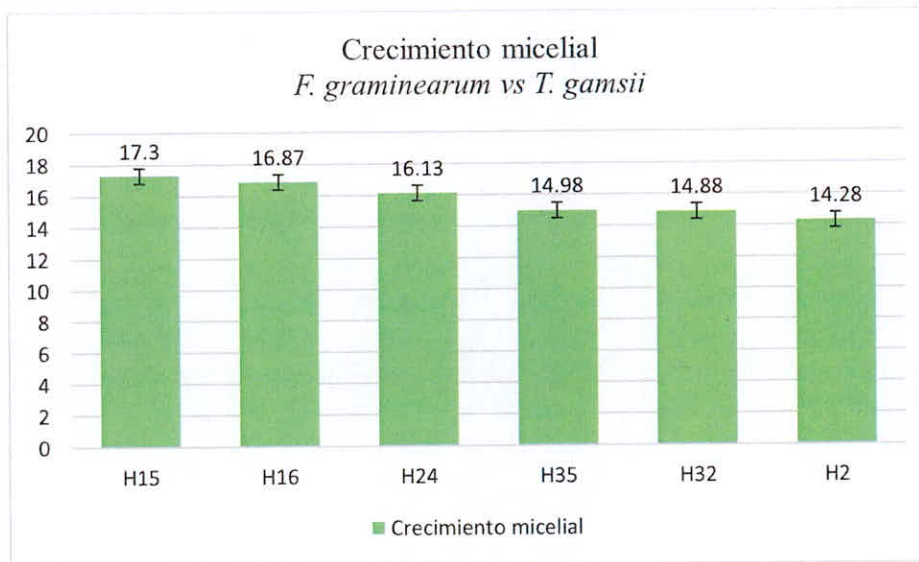


Figura 5. Crecimiento micelial (mm) de seis aislados de *Trichoderma gamsii* vs *Fusarium graminearum*

Cuadro 11. Análisis de varianza de la variable crecimiento de micelio de *Phytophthora capsici*. controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii in vitro*.

F.V	G.L	S.C.	C.M	Fc.	Pr>Fc
Modelo	21	215.53	10.21	15.89	<.0001
Error	50	23.52	0.43		
Total correcto	71	248.18			

Coefficiente de variación 5.9 % Media general <.0001 = Altamente significativo
12.13

Cuadro 12. Crecimiento micelial (mm) de *Phytophthora capsici*. controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii* *in vitro*.

Biocontrolador	Aislado	Crecimiento micelial
<i>Trichoderma gamsii</i>	H15	16.21 a
<i>Trichoderma gamsii</i>	H35	15.66 b
<i>Trichoderma gamsii</i>	H32	13.97 c
<i>Trichoderma gamsii</i>	H2	13.7 c
<i>Trichoderma gamsii</i>	H16	12.86 d
<i>Trichoderma gamsii</i>	H24	11.1 e

^ZLos valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (*= $p \leq 0.05$) según la prueba de comparación de medias Tukey.

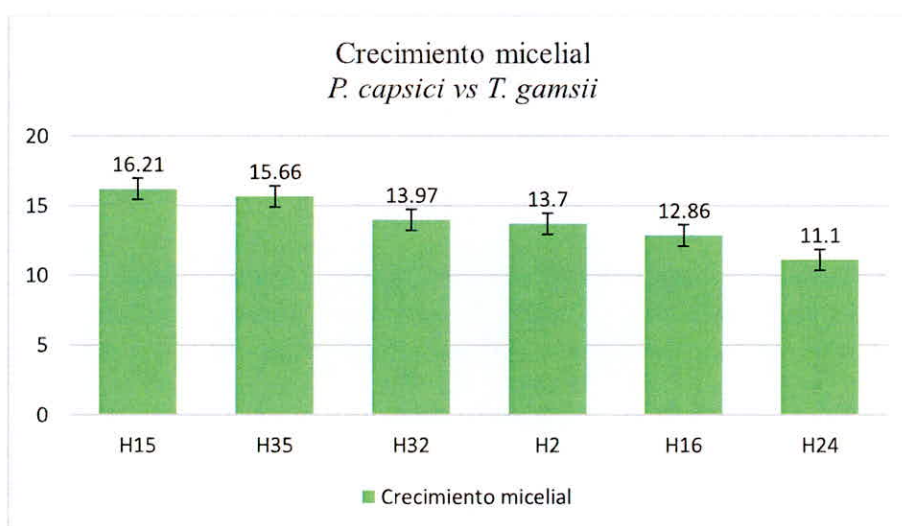


Figura 6. Crecimiento micelial en (mm) de seis aislados de *Trichoderma gamsii* vs *Phytophthora capsici*

4.4 Porcentaje de inhibición

En esta variable se observó interacción entre los factores ($F = 24.41$, $p = \leq 0.0001$), además de identificar diferencias significativas para el factor hongo ($F = 145.84$, $p = \leq 0.0001$) también en el factor biocontrolador ($F = 25.66$, $p = \leq 0.0001$) Cuadro 13, también se realizó el análisis de comparación de medias y se observó que el aislado H24 (*Trichoderma gamsii*) fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos presentando mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con un valor de 82.56, en comparación con el aislado H15 (*Trichoderma gamsii*) la cual presentó menor porcentaje de inhibición del micelio (78.54) (Cuadro 14), estos resultados coinciden con lo encontrado en la variable de crecimiento de micelio, se identificó que a mayor crecimiento de micelio menor porcentaje de inhibición y viceversa.

Cuadro 13. Análisis de varianza de la variable porcentaje de inhibición micelial en respuesta al organismo fungoso y biocontrolador.

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc.	Pr>Fc
Rep	5	37.46	7.49	7.71	<.0001
Hongo	1	141.74	141.74	145.84	<.0001
Hongo*Rep	5	35.59	7.12	7.33	<.0001
Biocontrolador	5	124.71	24.94	25.66	<.0001
Hongo*Biocontrol	5	118.59	23.72	24.41	<.0001

<.0001 = Altamente significativo

Cuadro 14. Porcentaje de inhibición de la interacción organismo fungoso y biocontrolador.

Biocontrolador	Aislado	Porcentaje de inhibición
<i>Trichoderma gamsii</i>	H24	82.56 a
<i>Trichoderma gamsii</i>	H2	82.13 a
<i>Trichoderma gamsii</i>	H32	81.54 ab
<i>Trichoderma gamsii</i>	H16	80.93 b
<i>Trichoderma gamsii</i>	H35	80.4 b
<i>Trichoderma gamsii</i>	H15	78.54 c

^ZLos valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales ($* = p \leq 0.05$) según la prueba de comparación de medias Tukey.

Al realizarle el ANOVA por separado, es decir por efecto de organismo fungoso, para *Fusarium graminearum* se observaron diferencias significativas ($F = 22.45$, $p = \leq 0.0001$), las pruebas de separación de medias mostraron que el aislado H2 (*Trichoderma gamsii*) controló mejor al hongo

mencionado presentando el porcentaje de inhibición mayor al resto de los tratamientos con un valor de 81.49 %, en comparación con el aislado H15 (*Trichoderma gamsii*) la cual presentó el menor porcentaje de inhibición (77.61) siendo el tratamiento menos eficiente (Cuadro 16). Respecto a *Phytophthora capsici* se observaron diferencias significativas ($F = 25.34, p = \leq 0.0001$), el aislado H24 (*Trichoderma gamsii*) mostró un porcentaje de inhibición mayor al resto de los tratamientos con un valor de 86 % mientras que el aislado H15 (*Trichoderma gamsii*) mostró el menor porcentaje de inhibición de todos los tratamientos evaluados con un valor de 79.48 % cuadro 18, al igual que en el control de *Fusarium graminearum* los resultados de inhibición de crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* se confirmaron ya que el misma aislado que mostró menor crecimiento de micelio presentó mayor porcentaje de inhibición los cual se correlaciona.

Cuadro 15. Análisis de varianza de la variable porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium graminearum* controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii* *in vitro*.

F.V	G.L	S.C.	C.M	Fc.	Pr>Fc
Modelo	21	458.09	21.81	22.45	<.0001
Error	50	48.59	0.97		
Total correcto	71	506.69			
Coeficiente de variación 1.2 %			Media general 81.02	<.0001 = Altamente significativo	

Cuadro 16. Porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium graminearum* controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii* *in vitro*.

Biocontrolador	Aislado	% de inhibición
<i>Trichoderma gamsii</i>	H2	81.49 a ^z
<i>Trichoderma gamsii</i>	H32	80.74 ab
<i>Trichoderma gamsii</i>	H35	80.60 ab
<i>Trichoderma gamsii</i>	H24	79.11 bc
<i>Trichoderma gamsii</i>	H16	78.13 c
<i>Trichoderma gamsii</i>	H15	77.61 c

^zLos valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (*= $p \leq 0.05$) según la prueba de comparación de medias Tukey.

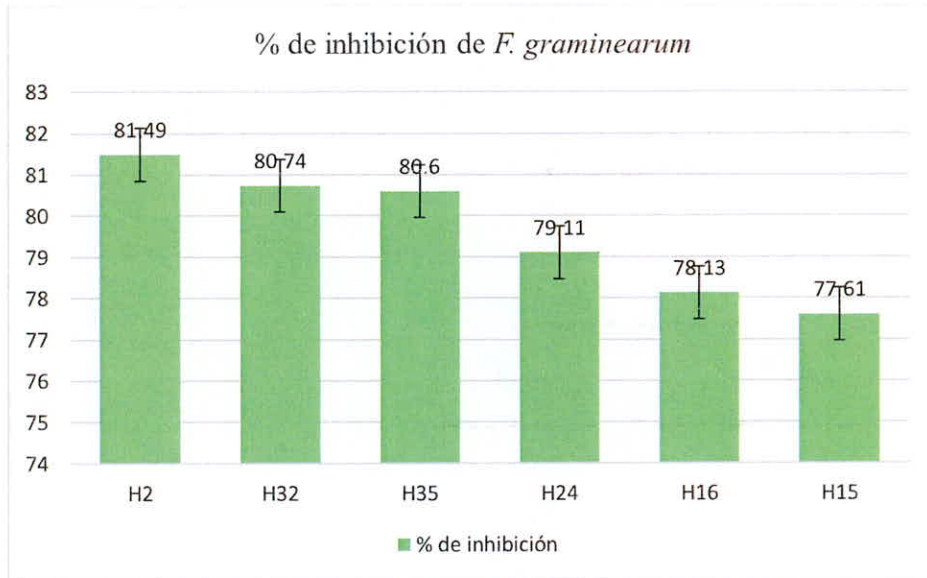


Figura 7. Porcentaje de inhibición de seis aislados de *Trichoderma gamsii* contra *Fusarium graminearum*

Cuadro 17. Análisis de varianza de la variable porcentaje de inhibición micelial de *Phytophthora capsici* controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii* *in vitro*.

F.V	G.L	S.C.	C.M	Fc.	Pr>Fc
Modelo	21	467.4	22.31	25.34	<.0001
Error	50	52.43	0.99		
Total					
correcto	71	514.43			

Coefficiente de variación 1.2 % Media general 81.02 <.0001 = Altamente significativo

Cuadro 18. Porcentaje de inhibición micelial de *Phytophthora capsici* controlado con diferentes aislados de *Trichoderma gamsii* *in vitro*.

Biocontrolador	Aislado	% de inhibición
<i>Trichoderma gamsii</i>	H24	86 a ^z
<i>Trichoderma gamsii</i>	H16	83.74 b
<i>Trichoderma gamsii</i>	H2	82.77 bc
<i>Trichoderma gamsii</i>	H32	82.34 c
<i>Trichoderma gamsii</i>	H35	80.2 cd
<i>Trichoderma gamsii</i>	H15	79.48 d

^zLos valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (*= p≤0.05) según la prueba de comparación de medias Tukey.

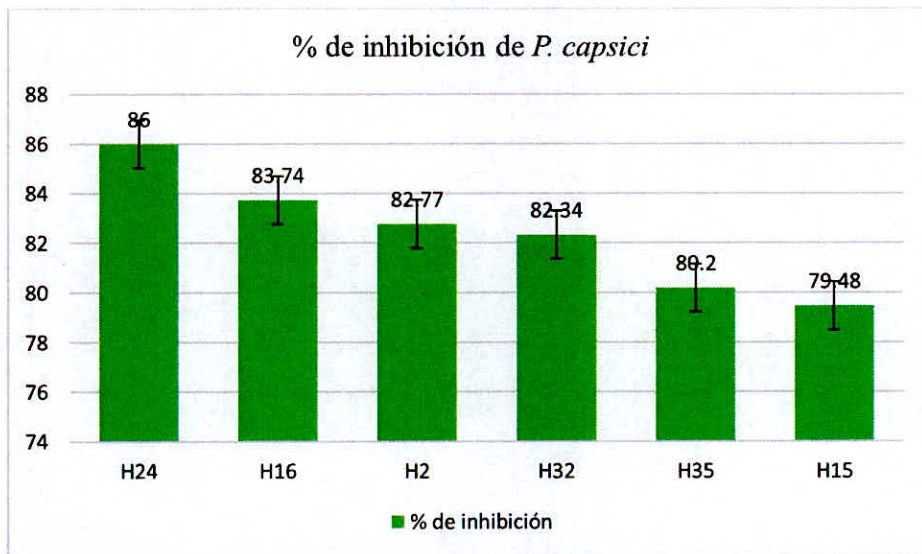


Figura 8. Porcentaje de inhibición de seis aislados de *Trichoderma gamsii* contra *Fusarium graminearum*.

V. DISCUSIÓN

Después de realizar la caracterización molecular de los seis aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvo como resultado que estas pertenecen a *Trichoderma gamsii*, esta especie ha sido estudiada contra fitopatógenos como *Fusarium graminearum* donde ha demostrado inducir respuesta sistémica, así como reducir el crecimiento micelial (Galletti *et al.*, 2020), para el caso de *Phytophthora capsici* demostró iniciar sistémicamente el mecanismo de resistencia inducida (Siriam *et al.*, 2009). Un estudio mencionó que *T. gamsii* y *F. graminearum* están relacionado por los genes de trichodieno sintasa, hay que destacar que estos genes están involucrados en la biosíntesis de tricotecenos los cuales tienen actividad antimicrobiana y llegan a promover interacciones benéficas entre *T. gamsii* y las raíces del hospedante. *T. gamsii* es capaz de suprimir el tizón causado por *Fusarium graminearum* en cereales, mediante la reducción de esporas de esta especie, así como también suprime el crecimiento y la producción de micotoxinas (Stummer *et al.*, 2022).

En los aislados obtenidos de las cinco muestras de suelo se observó que los medios TSMC y V8 no tuvieron crecimiento micelial a comparación del medio T2 esto se puede deber a que en ambos medios fueron más selectivos ya que se utilizaron fungicidas dentro de su preparación ocasionando que no permitan el crecimiento de hongos, sin embargo, otro de los factores que también pudo afectar fue la concentración de conidios que había en las disoluciones ya que se utilizó la tercera disolución hecha.

Se hizo un primer enfrentamiento con los 44 aislados donde se descartaron 21 ya que no mostraron ningún control contra *F. graminearum* y *P. capsici*, posteriormente se hizo la primera evaluación de cultivo dual (cuadro 4) donde se obtuvo un porcentaje de inhibición mayor al 60 % para ambos fitopatógenos. Resultados obtenidos por Sameniego *et al.* (2018) mostraron una inhibición de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp. mayor al 50 % y Cabrera *et al.* (2020) obtuvo un porcentaje de inhibición entre el 43 - 78 % para *Trichoderma* spp. vs *Fusarium graminearum*. Arriaga. (2021) obtuvo un porcentaje de inhibición del 58.60% para *P. capsici* por lo que los porcentajes obtenidos están dentro de los parámetros que otros autores presentaron. Sin embargo, solo se seleccionaron aquellos aislados con un porcentaje de inhibición mayor o igual al 80 % para tener un mejor control teniendo un total de seis aislados: H2 que pertenece a la zona 5, H15, H16, H24, H32 y H35 que pertenecen a la zona 2, estos aislados pertenecen a la especie *Trichoderma gamsii*.

El tiempo de contacto entre *T. gamsii* y las hifas del patógeno vario de uno a cuatro días para el caso de *F. graminearum* y para *P. capsici* respectivamente, estas diferencias se pueden deber a que los aislados tienen características biológicas diferentes, cabe destacar que cuando *Trichoderma* spp. coloniza el medio de cultivo y localiza el patógeno hay una eficiencia de control.

En el segundo enfrentamiento de cultivo dual los seis aislados crecieron en el mismo tiempo, sin embargo, el que tuvo el mayor porcentaje de inhibición para *F. graminearum* fue el aislado H2 con 81.49 % y para *P. capsici* fue H24 con 82.56 %. Existen diferentes características de crecimiento entre los fitopatógenos *F. graminearum* y *P.capsici*, sin embargo los seis aislados de *T. gamsii* lograron inhibir el crecimiento micelial de ambos fitopatógenos, pero se observó que estos aislados tienen un mejor control contra *P. capsici* ya que solo uno de los seis aislados que se evaluaron mostró un porcentaje menor del 80 %.

Andrade *et al.* (2019) reporto que *Trichoderma* spp. inhibe un 87.8% el crecimiento de *P. capsici* y Perniola *et al.* (2014) menciono que *Trichoderma* spp. tuvo un porcentaje de inhibición de 60.6 % para *F. graminearum*. Los valores obtenidos van de un 77.61 % a un 86 % por lo que los resultados mencionados fueron mayores por dichos autores, esto se puede deber a las condiciones ambientales a las que fueron sometidas los seis aislados estudiadas, así como también la especie a la que pertenecen.

Las interacciones entre un antagonista y un patógeno se dividen en tres fases donde la primera consiste en un pre-contacto entre ambos microorganismos, la segunda en la formación de una zona de inhibición del crecimiento del patógeno y la tercera es cuando ocurre una sobre esporulación del antagonista sobre el micelio del patógeno (Luna, 2017). El ensayo de cultivo dual entre *T. gamsii* y *F. graminearum* mostraron diferentes interacciones en cada uno de los aislados, en el caso de H2, H24 y H35 que pertenecen a *T. gamsii* solo mostraron las dos primeras fases que se describieron anteriormente en cambio H15, H16 y H34 que igual perteneces a *T. gamsii* desarrollaron la tercera fase de sobre esporulación evitando así el crecimiento y desarrollo del fitopatógeno. Se pudo observar que en el antagonismo de *T. gamsii* sobre *P. capsici* se identificó un comportamiento similar a excepción del aislado H24 donde esta si presento la tercera fase de sobre esporulación, evitando así un mayor desarrollo del patógeno con el que se estudio

El porcentaje de Inhibición nos permite caracterizar la aptitud biológica del antagonista versus el fitopatógeno, estas interacciones tienen características donde se involucran los mecanismos de

acción de los antagonistas y la resistencia del patógeno. De los seis aislados de *T. gamsii* utilizados contra *F. graminearum* y *P. capsici* mostraron tener micoparasitismo y competencia por espacio, comparando los resultados con la autora Guédez *et al.* (2012) obtuvo que los dos modos de acción principales de los aislados de *Trichoderma* spp. son micoparasitismo y competencia por nutrientes y espacio ya que estos aislados son capaces de desarrollarse rápidamente superando el crecimiento de fitopatógenos como *Fusarium* spp. impidiendo su desarrollo normal inhibiendo más del 50% de su crecimiento.

Se determinó la competencia por espacio donde los aislados de *T. gamsii* H2, H24 y H35 presentaron un tipo de antagonismo de clase dos ya que solo cubrieron dos terceras partes de la superficie con los aislados de *F. graminearum* y *P. capsici*, para los aislados de *T. gamsii* H15, H16 y H34 el tipo de antagonismo fue de clase uno ya que las tres muestras tuvieron una sobre esporulación en el micelio de ambos fitopatógenos evaluados. Los seis aislados evaluados pertenecen a una clase 1 o 2 por lo que se pueden considerar aislados altamente eficientes para el biocontrol de organismos fúngicos ya que *in vitro* se observó un control total de los fitopatógenos analizados. Autores como Arellano y Daniel (2015) mencionan que una sobre esporulación es una estrategia de biocontrol en la disputa por colonizar el área ya que *Trichoderma* spp. empieza a competir por nutrientes y espacio ocasionando que se reduzca o detenga el desarrollo del fitopatógeno.

En general, *T. gamsii* mostró un buen control de crecimiento micelial de *F. graminearum* y *P. capsici* *in vitro* aunque estudios han demostrado su buena efectividad para *F. graminearum* pudimos observar que el antagonista tuvo mejor desarrollo y control en *P. capsici*. Los aislados que mostraron un mayor antagonismo son la H2 (*T. gamsii*) contra *F. graminearum* y la H24 (*T. gamsii*) contra *P. capsici*, en cambio la H15 (*T. gamsii*) fue la que menor porcentaje de antagonismo presentó en ambos fitopatógenos, a pesar de que todos los aislados son de la misma especie puede influir la zona de la que fueron obtenidas por lo que sería de suma importancia hacer otra recolección de muestras para volver a evaluar su porcentaje de inhibición. Por lo que *T. gamsii* puede ser una muy buena alternativa para ser utilizado como un agente de biocontrol ya que mostró ser eficiente en el control de organismos fúngicos presentes en el suelo, sin embargo, es necesario hacer más pruebas y evaluar este aislado contra otros organismos fúngicos que causen severos daños en las plantas.

VI. CONCLUSIÓN

En cuanto al cultivo dual los seis aislados de *Trichoderma gamsii* analizadas mostraron una eficiencia en su actividad antagónica al enfrentarse a *F. graminearum* y *P. capsici*.

Los aislados evaluadas mostraron resultados diferentes en ambos fitopatógenos, para *F. graminearum* el aislado con mayor porcentaje de inhibición fue la H2 (*T. gamsii*) y para *P. capsici* fue la H24 (*T. gamsii*), sin embargo, en ambos experimentos el aislado que tuvo un menor porcentaje de inhibición fue la H15 (*T. gamsii*).

Los aislados pertenecientes a *T. gamsii* H24, H32, H16 y H2 mostraron una acción micoparasitica, en cambio los aislados H35 y H32 solo mostraron una competencia por espacio y nutrientes, es por lo que los aislados H2 y H24 son las que mayor eficiencia presentaron para controlar a los organismos fungosos.

En cuanto a los resultados moleculares mostraron que los aislados utilizados pertenecen a *Trichoderma gamsii*, un aislado poco estudiado, pero en el presente estudio se observó su capacidad antagónica, ya que demostró tener un buen control contra *Fusarium graminearum* y *Phytophthora capsici* por lo que este aislado se podría utilizar perfectamente *in vivo*

Existen muchas alternativas para tener un mejor manejo fitosanitario y así evitar el uso de agroquímicos, ya que estos productos ocasionan una gran desventaja hacia el medio ambiente, pero también empiezan a generar resistencia en los fitopatógenos ocasionando que estos se vuelvan más resistentes, es por ello que dentro de las ventajas que tiene el uso de microorganismos es promover el crecimiento de las plantas y generar resistencia para evitar algún daño por los hongos fitopatógenos es por ello que *T. gamsii* es una muy buena alternativa para ser usada como un manejo preventivo o bien como una solución para controlar diferentes organismos fungosos.

VII. LITERATURA CITADA

- Abbas, A., Jiang, D., & Fu, Y. (2017). *Trichoderma* spp. as antagonist of *Rhizoctonia solani*. J Plant Pathol Microbiol, 8(3), 1-9.
- Agamez, E.Y., Zapata, R. I., Oviedo, L. E., & Barrera, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* spp. Revista colombiana de biotecnología, 10(2), 23 – 24.
- Andrade, A., Castro, L., Bertoldo, L., Bettio, W., Vegette, Z., & Boechat, M. (2018). Optimizing the mass producing of *Clonostachys rosea* by liquid – state fermentation. Biological Control, 118(2018), 16 – 25.
- Andrade, P., Luna, A., Osorio, E., Molina, E., Landero, N., & Barrales, H. J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 10(6), 1259-1272.
- Arellano, V., & Daniel, A. (2015). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum, annum* L) causada por *Phytophthora capsici* mediante cepas nativas de *Trichoderma* spp. de suelos productores. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigos, E., Costa, D. B., & Leon, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. Revista de Investigación Altoandis, 19(2), 135 – 144.
- Arriaga, K. L. (2021). Antagonismo de aislados de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici* *in vitro*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Aviléz, A. A. (2021). Bacteria benéfica *Pseudomonas fluorescens* como agente de control biológico para mejorar la producción del cultivos de maíz (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2021).
- Bhandari, S., Pandey, K. R., Joshi, Y. R., & Lamichhane, S. K. (2021). An overview of multifaceted role of *Trichoderma* spp. for sustainable agriculture. Archives of Agriculture and Environmental Science, 6(1), 72-79.
- Cabrera, M., Garmendia, G., Rufo, C., Pereyra, S., & Vero, S. (2020). *Trichoderma atroviride* como controlador biológico de fusariosis de espiga de trigo mediante la reducción del inóculo primario en rastrojo. Terra Latinoamericana, 38(3), 629-651.

- Cañedo, V., Alfaro., & Kroschel, J. (2011). Manejo integrado de plagas de insectos en hortalizas. Principios y referencias técnicas para la Sierra Central de Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, (2011), 48.
- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía & Ambiente*, 37(1).
- Cerón, M., Ward, T. J., Kelly, A., Vaughan, M. M., McCormick, S. P., Cowger, C., & Nava, C. (2018). Regional differences in the composition of *Fusarium* head blight pathogens and micotoxins associated with wheat in Mexico. *International journal of food microbiology*, 273, 11 – 19.
- Chavez, N., & Wang, A. (2004). Combate del Moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Glicoladium Roenum*. *Agronomia costarricense*, 28(2), 78 – 85.
- Contreras, H. A., Macías, L., Del-Val, E. K., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4).
- Cotes, A. M., & Elad, G. (2018). Control biológico en un contexto de manejo integrado de enfermedades. *AM Cotes, Control biológico de Fitopatógenos, insectos y ácaros*, 2, 794 - 822.
- Dahiri, B. (2018). Consecuencias sobre la salud de mujeres en edad fértil tras exposición laboral a plaguicidas. Universidad de Sevilla.
- Del Puerto, A., Suarez, S., & Palacio D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y lamSalud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372 – 387.
- Devindroppa, M., Singh, B., Mishra, M., Mishra R., & Kumar, K. (2018). Antagonistic potential of Indigenous *Trichoderma* spp. Against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Food Legumes*, 31(4), 230 – 233.
- DOF de 2016. Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Vegetal. 15 de julio de 2016.
- Doñas, F. (2015). Búsqueda de resistencia a *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica* en cultivares comerciales de pimiento. Universidad de Almería.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *In Anales de biología*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia., 26, pp. 35-45.

- España, I. R. A. C. Clasificación de Modo de Acción de Insecticidas y Acaricidas. Febrero 2021. Páginas: 18.
- Fungicide Resistance Action Committee. (2019). Clasificación de fungicidas y bactericidas Según el modo de acción. *Basilea, Suiza: FRAC*.
- FAO. (2017). Directrices para los programas de erradicación de plagas.
- Galletti, S., Paris, R., & Cianchetta, S. (2020). Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. *Microbiological Research*, 233, 126406.
- Gamboa, G. G., Servín, M. S., Cota, F. P., Pereyra, J. G., Martínez, G. A., & Villalobos, S. (2018). Plaguicidas en la agricultura mexicana y potenciales alternativas sustentables para su sustitución. *Revista biológico agropecuaria Tuxpan*, 6(1), 61-75.
- García, H. G., Martínez, Á. R., Hermosa, M. R., Monte, E., Aguilar, C. J., & González, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(1), 58-79.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M. E., Romero, G., Silvera, E., González, P., & Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*, 16(1), 97-107.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2012). Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44 – 49.
- Hasan, R., Lv, B., Uddin, M. J., Chen, Y., Fan, L., Sun, Z., ... & Li, S. (2022). Monitoring Mycoparasitism of *Clonostachys rosea* against *Botrytis cinerea* Using GFP. *Journal of Fungi*, 8(6), 567.
- Hashem, A., Tabassum, B. y Abd_Allah, EF (2019). *Bacillus subtilis*: una rizobacteria que promueve el crecimiento de las plantas y que también afecta el estrés biótico. *Revista saudí de ciencias biológicas*, 26 (6), 1291-1297.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases the history and evolution of current concepts. *Plant diseases*, 87(1), 4 – 10.

- Hyder, S., Inam-ul-Haq, M., Bibi, S., Humayun, A., Ghuffar, S., & Iqbal, S. (2017). Novel potential of *Trichoderma spp.* as biocontrol agent. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 214-222.
- Infante, D., Martínez, B., Gonzalez, N., & Reyes, Y. (2019). Mecanismos de Acción de *Trichoderma* frente A hongos Fitopatogenos. *Revista Protección Vegetal*, 24(1), 14 – 21.
- Kohl, J., Kolnaur, R., & Revensberg, W. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *frontiers in Plant Science*, 10(845), 1 – 18.
- Lancherre, M. R. R., y Ruiz, J. R. C. (2014). Efecto antagonico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinifera*. *Revista Rebiol* 33: 42 – 44.
- Lamour, KH, Stam, R., Jupe, J. y Huitema, E. (2012). El oomiceto patógeno de amplio rango de huéspedes *Phytophthora capsici*. *Patología vegetal molecular* , 13 (4), 329-337.
- Leyva, S. G., Vega, H. E., Villaseñor, H. E., Tlapa, B., Vargas, M., Camacho, M., & Tovar, J. M. (2017). Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de Pudrición de raíz del trigo en el Bajío, México. *Chilean journal of agricultural & animal Sciences*, 33(2), 142-151
- Lezcano, R. N., Cubilla, A. A., & Flores, M. (2018). Producción de metabolitos por aislados nativos de *Trichoderma spp* y su actividad antifúngica frente a *Rhizoctonia solanu* y *Sclerotinia sclerotiorum*, patógrnod del pimiento (*Capsicum annuum* var. Natalie).
- Luna, A. (2017). Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* de cebolla. Instituto Politécnico Nacional
- Maloy, O. C. (2005). Plant disease management. *The plant health instructor*, 10.
- Mena, X., & Couoh, Y. (2015). Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka Negra en plantaciones bananeras en México, así como sus efectos en el ambiente y la Salud Pública. *Tecnociencia Chihuahua*, 9(2), 115 – 112.
- Méndez, C., & Vallejo, M. Á. (2019). Mecanismos de respuesta al estrés biótico: hacia una perspectiva de las especies forestales. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56), 33-64.
- Miñano, M., & Dapena, E. (2015). La resistencia vegetal como herramienta para el Control de plagas: el caso del pulgón ceniciento del manzano. *Boletín SEEA*, 18(1).

- Singh, P., & Sharma, M. (2020). Cultural and Morphological Characterization of Antagonistic *Trichoderma* Isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *9*(3), 1041 – 1048.
- Siriam, S., Manasa, S.B., & Savitha, M. J. (2009) Potential use of elicitors from *Trichoderma* in Induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsica* in red pepper. *J Biol Control*, *23*(4), 449 – 456.
- Stummer, B. E., Zhang, X., Yang, H., & Harvey, P. R. (2022). Co-inoculation of *Trichoderma gamsii* A5MH and *Trichoderma harzianum* Tr906 in wheat suppresses in plant abundance of the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* and impacts the rhizosphere soil fungal microbiome. *Biological Control*, *165*, 104809.
- Sun, Z., Li, S., Ren, Q., Xu, J., Lu, X., & Sun, M. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology*, 1 – 10.
- Torrez, Y. Y. (2018). Aislamiento y caracterización del hongo *Trichoderma spp.* en suelos agrícolas de caña de azúcar (*saccharum officinarum L.*) en el departamento de Chinandega 2016 (Doctoral dissertation). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León.
- Torres, E. J. P., Cabrera, A. B., Virreyes, P. M., Leiva, M., Mora, E. L., Reyes, Y. S., & Cupull, R. (2013). Influencia del tiempo de incubación de *Trichoderma harzianum* Rifai en la actividad antifúngica del filtrado de cultivo contra *Bipolaris oryzae*. *Centro Agrícola*, *40*(2), 25-30
- TRICHODEX. (2016) . Métodos y técnicas de control fitosanitario para los cultivos | TRICHODEX [Internet]. [cited 29 April 2020]. Available from: <https://www.trichodex.com/metodos-y-tecnicas-de-control-fitosanitario-para-los-cultivos/>.
- Velázquez, C., Macías, L. I., López-Bucio, J., Flores, I., Pizano, G. S., & Valencia, E. (2010). Actividad inhibitoria del compuesto volátil bacteriano dimetilhexadecilamina sobre fitopatógenos. *Biológicas*, *12*, 96-101.
- Weller, D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking over back over 30 years. *Phytopathology*, *97*(2), 250 – 256.
- Zhou, D., Huang, XF, Guo, J., dos-Santos, ML y Vivanco, JM (2018). *Trichoderma gamsii* afectó el comportamiento de alimentación de los herbívoros en *Arabidopsis thaliana* al modificar el metaboloma de la hoja y las fitohormonas. *Biotecnological*.