SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Tecnológico Nacional de México

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTAGÓNICAS DE *Trichoderma* sp. Ta13-17 CONTRA *Fusarium* spp.

TESIS

Que presenta:

Sandy Esther Celis Perera

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:
Dr. Jairo Cristóbal Alejo

Conkal, Yucatán, México
Junio, 2018

SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México a 15 de Junio de 2018

El comité de tesis del candidato a grado: **Sandy Esther Celis Perera**, constituido por los CC. **Dr. Jairo Cristóbal Alejo**, **Dr. Arturo Reyes Ramírez**, **Dr. José María Tun Suarez** y **Dr. Rene Garruña Hernández**, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **EVALUACION DE LAS PROPIEDADES ANTAGONICAS DE *Trichoderma* sp. Ta13-17 CONTRA *Fusarium* spp.**, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical**, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Jairo Cristóbal Alejo
Director de Tesis

Dr. Arturo Reyes Ramírez
Asesor de Tesis

Dr. José María Tun Suarez
Asesor de Tesis

Dr. Rene Garruña Hernández
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán a 15 de Junio de 2018

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Sandy Esther Celis Perera

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jairo Cristóbal Alejo por el apoyo brindado, por compartirme sus conocimientos, y aclarar mis dudas durante el periodo de posgrado.

- A los doctores Rene Garruña Hernández, Arturo Reyes Ramírez y José María Tun Suarez por el apoyo brindado durante el desarrollo de mis experimentos, evaluaciones y la revisión de la Tesis.

- A la M.C. Felicia Moo Koh por el apoyo y por compartir sus conocimientos conmigo en el desarrollo de los experimentos.

- A mis compañeros de generación por los momentos compartidos y por hacer más llevadero este proceso en el que nos embarcamos juntos.

- Al Instituto Tecnológico de Conkal por prestar los espacios necesarios para el desarrollo de los experimentos realizados en este trabajo, en especial al área de posgrado por permitirme continuar con mi desarrollo profesional.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado en el transcurso del posgrado.

DEDICATORIA

- A mis padres Román Celis Manrique y M. Esther Perera Quintal que amo tanto, por cada uno de sus esfuerzos para darme lo mejor que han podido y por ser partícipes en mi formación como persona, para llegar hasta donde ahora estoy.

- A mi amado esposo Gerardo Namid Cantón Campos por sus consejos y por su apoyo incondicional en cada una de las decisiones que he tomado, por estar conmigo al principio y fin de este proceso.

- A mi Dios por ponerme siempre en los caminos adecuados y por permitirme vivir cada una de las experiencias pasadas en este posgrado.

- A mi perfecta y amada Madre Naturaleza por sostenerme siempre y permitirme apreciar cada día su grandeza, por prestarme cada uno de los elementos utilizados en este estudio para hacer ciencia y regresarle un poquito de lo mucho que me comparte.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL 1
1. INTRODUCCIÓN 1
1.2 ANTECEDENTES 2
1.2.1 Hongos fitopatógenos 2
1.2.3 Importancia de los hongos fitopatógenos en los cultivos 2
1.2.4 Características del género *Fusarium* 3
1.2.5 Marchitez vascular causada por *Fusarium* 3
1.2.6 Importancia del cultivo de chile habanero y su afectación por *Fusarium* 4
1.2.7 Control biológico de hongos fitopatógenos 5
1.2.8 Generalidades de *Trichoderma* 6
1.2.9 *Trichoderma* como agentes de control biológico 7
1.3 HIPÓTESIS 10
1.4 OBJETIVOS 10
1.4.1. General 10
1.4.2. Específicos 10
1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 11
1.6 LITERATURA CITADA 12
EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTAGONICAS DE *Trichoderma* sp. Ta13-17 CONTRA *Fusarium* spp. 1
RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 2
MATERIALES Y METODOS 3
Obtención de material fúngico 3
Antagonismo in vitro de Trichoderma sp. (Ta13-17) contra Fusarium spp. 5
Competencia 5
Micoparasitismo 6
Antibiosis 6
Pruebas de patogenicidad de Fusarium spp. en chile habanero 8
Evaluación de la capacidad biocontroladora de Trichoderma sp. Ta13-17 sobre Fusarium oxysporum en plantas de chile habanero 9
Análisis de datos 10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 10
Identificación molecular 10

Antagonismo in vitro de T. asperellum (Ta13-17) contra Fusarium spp..... 11
Competencia 11
Micoparasitismo 14
Antibiosis..... 16
Biocontrol de Trichoderma asperellum (Ta13-17) contra Fusarium oxysporum en chile habanero..... 19
CONCLUSIONES 23
LITERATURA CITADA..... 24

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Material fúngico empelado en las pruebas. 4

Cuadro 2. Capacidad inhibitoria *in vitro* del crecimiento micelial causado por *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre *Fusarium* spp. 13

Cuadro 3. Micoparasitismo *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre *Fusarium* spp. 15

Cuadro 4. Antibiosis de Trichoderma asperellum (Ta13-17) sobre Fusarium spp. 18

Cuadro 5. Variables de crecimiento en plantas de chile habanero inoculadas con Trichoderma asperellum (Ta13-17) y Fusarium oxysporum. 20

Cuadro 6. Variables fisiológicas de plantas de chile habanero inoculadas con Trichoderma asperellum (Ta13-17) y Fusarium oxysporum. 22

RESUMEN

El 60% de las enfermedades en los cultivos agrícolas son causadas por hongos fitopatógenos entre los que se encuentra *Fusarium*, causantes de marchitez, necrosis, defoliaciones, etc. asociadas con pérdidas de producción. Para su control, el principal método es el químico, aunque suele tener buenos resultados, su uso recurrente genera contaminación y selección de cepas resistentes. Como alternativa pueden emplearse microorganismos antagonistas, por ejemplo, especies de *Trichoderma* que por sus propiedades de biocontrol, tiene resultados sobresalientes para el manejo de patógenos con origen en el suelo. Este trabajo consistió en identificar molecularmente, el aislado de la cepa *Trichoderma* sp. Ta13-17 y estimar su potencial antagónico *in vitro* e *in vivo*, contra 12 cepas, de cinco especies de *Fusarium;* aisladas de hospedantes de importancia económica. La identidad de la cepa Ta13-17 correspondió a *Trichoderma asperellum* e inhibió en cultivos duales, al menos el 50% del crecimiento micelial del fitopatógeno y del 92 a 100% mostró micoparasitismo, el filtrado de *T. asperellum* incorporado al medio de cultivo causó en algunas cepas hasta un 90.40% de inhibición de crecimiento micelial, inhibición en la esporulación y germinación de conidios. *In vivo*, *T. asperellum* inhibió en un 87.5% los síntomas causados por *Fusarium oxysporum* en chile habanero y mostro potencial en la promoción de crecimiento vegetal del mismo. Por lo que se considera a *T. asperellum* como un agente prometedor en el biocontrol de *Fusarium* spp.

Palabras clave: antagonismo, antibiosis, biocontrol, *Fusarium* Marchitez, *Trichoderma.*

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

Entre las principales limitantes de los cultivos hortícolas se encuentran las plagas y enfermedades que causan pérdidas en la producción. Al menos el 60% de las enfermedades presentes en cultivos son causadas por hongos que disminuyen los rendimientos, ya que afectan su desarrollo fisiológico y los hacen más vulnerables al ataque de otros fitopatógenos (Moo-Koh, *et al*., 2014).

Entre las enfermedades que causan los hongos en los cultivos hortícolas se encuentran las pudriciones de tallos y raíces, asociadas en su mayoría por hongos con origen en el suelo, como *Fusarium* spp., donde destacan especies como *F. oxysporum, F. Solani, F. equiseti,* entre otras. *Fusarium* spp. ataca diferentes variedades de plantas, se caracterizan por sobrevivir en rastrojos de cultivos anteriores y permanecen en el suelo por varios años (Arguello *et al*., 2007). Crecen casi en cualquier tipo de suelo, sin embargo, algunos en condiciones de alta humedad reducen su infección debido a la presencia de bacterias anaeróbicas (Ocaña, 2008).

Para su control, el principal método es el químico, aunque suele tener buenos resultados su uso recurrente genera contaminación, pérdida de biodiversidad y selección de cepas resistentes (Corrêa *et al.*, 2007).

Una alternativa para reducir el uso de productos químicos en los cultivos hortícolas, son los microorganismos antagonistas, que ejercen cierto biocontrol sobre fitopatógenos. Tal es el caso del género *Trichoderma* que inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos, debido a los mecanismos de acción que ejerce sobre éstos, entre los que destacan, la competencia por nutrientes y espacio, la producción de metabolitos y el micoparasitismo (Samuels *et al*., 2007).

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Hongos fitopatógenos

Las enfermedades fungosas son factores que participan como responsables de los bajos rendimientos productivos y económicos de los cultivos hortícolas, lo que provoca también niveles deficientes de calidad en los productos cosechados. El género *Fusarium,* es uno de los fitopatógenos más importantes asociados al marchitamiento y reducción del rendimiento de cultivos como el chile habanero, en este género se encuentran las especies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F equiseti*, *F. moniliforme*, entre otras, las que comúnmente afectan a los cultivos, y ocasionan pérdidas por encima del 50% o incluso la pérdida total del cultivo cuando las condiciones son favorables para el progreso de la enfermedad (Mejía *et al*., 2016).

1.2.3 Importancia de los hongos fitopatógenos en los cultivos

Las enfermedades fungosas se encuentran en primer plano como responsables de los bajos rendimientos y en ocasiones de la pérdida total de los cultivos. Estas enfermedades impiden la producción de mayor cantidad y calidad de alimentos (García, 1977). El marchitamiento vascular, es destructivo y es causado por diversos agentes etiológicos que se encuentran ampliamente distribuidas en poblaciones y cultivos de un sin número de especies de plantas (Agrios, 2002). Tal es el caso de los hongos del género *Fusarium,* asociado con el marchitamiento y reducción del rendimiento de cultivos como *Capsicum chinense* Jacq. Este cultivo puede afectarse por diferentes especies del hongo como *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani*, entre otros (Reyes *et al*., 2012).

1.2.4 Características del género *Fusarium*

El hongo se caracteriza por tener un crecimiento micelial generalmente aéreo, abundante, algodonoso, con diferentes coloraciones: blanco, durazno, salmón, pero usualmente con un tinte purpura o violeta más intenso en la superficie del medio del cultivo; además se caracteriza por producir tres clases de esporas: i) microconidios, que se caracterizan por ser unicelulares, septadas y hialinas en forma variable, formadas sobre fiálides laterales o sobre conidióforos poco ramificados (Nelson *et al*., 1981). ii) macroconidias y iii) clamidosporas que son muy importantes para la clasificación de esta especie. Las macro y microconidias se producen en los vasos del xilema, pero las microconidias son predominantes en los tejidos infectados (Nelson *et al*., 1981).

Los síntomas que se presentan en las plantas causados por *Fusarium* spp. generalmente se observan en etapas cercanas a la floración; las plantas son raquíticas, con un amarillamiento blanquecino ascendente, con posterior marchitamiento. En tejidos internos de las raíces y de la base del tallo, se observa una pudrición seca de coloración rojiza, efecto de las toxinas producidas por el hongo, ya que el xilema es obstruido lo cual causa la muerte de la planta (Insuasty *et al*., 2014).

1.2.5 Marchitez vascular causada por *Fusarium*

Las plantas afectadas por marchitamiento causados por *Fusarium* spp. presentan un grupo común de síntomas: en un principio las hojas pierden turgencia, se debilitan y adquieren una tonalidad verde claro, con marchitamiento, en ocasiones pueden enrollarse o permanecer extendidas, hasta tornarse amarillentas, posteriormente se genera necrosamiento y finalmente la muerte de las plantas; (Gonzáles, 2006). En general, el primer síntoma de este grupo de enfermedades que se observa en campo, es el amarillamiento de las hojas basales, posteriormente se marchitan y se secan, pero permanecen adheridas a la planta. Este síndrome progresa hacia la parte superior de la planta a veces solo toma un sector de la misma. Al comienzo las plantas muestran marchitez en horas más calurosas del día recuperándose al

final del mismo, en casos severos el marchitamiento lleva a la muerte de la planta; se presenta en las raíces principales y la base del tallo un necrosamiento vascular de coloración marrón (Backer, 1978; Agrios, 2002).

1.2.6 Importancia del cultivo de chile habanero y su afectación por *Fusarium*

El chile habanero es originario de Sur de América. El 4 junio de 2010 la península de Yucatán recibe la denominación de origen (SAGARPA, 2016). La importancia económica del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) se basa principalmente en la utilización de sus frutos. El chile es a nivel mundial el quinto producto hortícola, por superficie cultivada (FAO, 2016). El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica y consumo humano; también es una fuente excelente de colorantes naturales, minerales y vitaminas A, C y E (Ruiz *et al*., 2011).

El chile habanero, se encuentra distribuido en toda la península de Yucatán, donde se observan diferentes formas, colores y tamaños del fruto. Tienen un lugar muy importante en la dieta de la población yucateca y se ha convertido en un símbolo debido a sus características organolépticas, de mayor vida de anaquel, alto nivel de picor y su importante participación en la gastronomía tradicional del estado. Ocupa el segundo lugar, después del cultivo del tomate, en cuanto a superficie cultivada. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado, y contribuye con más de 90 por ciento del volumen de la producción estatal, la cual se comercializa y se consume en fresco, principalmente (Ruiz *et al*., 2011).

El chile habanero producido en la península de Yucatán se considera de calidad superior a los cultivados en otras partes del mundo, debido a su alto contenido de capsaicinoides; esta propiedad ha sido clave para que más superficie se esté destinando para su producción y se busquen nuevas tecnologías más eficientes para el desarrollo de este cultivo (Medina *et al*., 2008; Pérez *et al*., 2008).

Yucatán se encuentra entre los cuatro estados con mayor producción de chile habanero, en segundo lugar después del estado de Tabasco. Cuenta con una superficie sembrada de 222.89 hectáreas y una producción de 2,166.37 toneladas (SIAP, 2015), presenta una

demanda importante en el mercado nacional y local por el uso que se le da no solo en la alimentación sino también en la industria farmacéutica y cosmética, además de que representa una fuente de trabajo permanente para los productores dedicados a este cultivo.

Sin embargo, el chile habanero es un cultivo que no está exento de ser afectado por *Fusarium*, la marchitez por pudrición de raíz es una de las enfermedades más importantes en este cultivo, se ha reportado que los síntomas por *Fusarium* también se han identificado en tallo, cotiledones y hojas (Reyes *et al*., 2012) lo que ocasiona una disminución en el crecimiento y desarrollo de las plantas hasta llevarlas a la muerte si las condiciones para el desarrollo del hongo son favorables.

1.2.7 Control biológico de hongos fitopatógenos

La problemática de la utilización discriminada de los fungicidas puede resumirse en fungo-resistencia, contaminación ambiental y toxicidad en los productos cosechados. Una respuesta positiva y concreta a la campaña mundial contra el uso de productos químicos es la utilización de microorganismos antagónicos, altamente competitivos para la protección de los cultivos en contra de patógenos fúngicos de la raíz (Stefanova, 2016). Se demostró la eficiencia y el impacto ecológico que representa el uso de estos organismos al practicar una agricultura más sostenible y sustentable, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de productos químicos (Mejía *et al*., 2016).

En la actualidad, especies del genero *Trichoderma* son de los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas causadas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Ezziyyani *et al.*, 2004). Estudios realizados por Martínez-padrón *et al*. (2017) demuestran que *Trichoderma* es un antagonista efectivo contra hongos fitopatógenos. En otro estudio se observó que *Trichoderma harzianum* cepa A34, fue eficaz en el control de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la marchitez de banano, y mostró una significativa inhibición de la frecuencia y severidad de la enfermedad. (Reyes *et al*., 2012).

1.2.8 Generalidades de *Trichoderma*

Trichoderma es un hongo que se encuentra frecuentemente sobre tejidos vegetales en descomposición. Es un organismo dominante en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con otros microorganismos (Insuasty *et al*., 2014). Comprende alrededor de 386 especies sin fase sexual evidente (Samuels, 2007). Presentan micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 µm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de rápido desarrollo en medios sintéticos. Tienen la capacidad de producir clamidosporas unicelulares pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructures son de vital importancia para su sobrevivencia en el suelo bajo condiciones adversas. El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10 µm de ancho. *Trichoderma* es un hongo aeróbico, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas, se han encontrado especies aisladas a temperaturas de 4 °C que han tolerado temperaturas hasta de 35 °C. La luz y su espectro también influyen en el desarrollo de *Trichoderma*, fundamentalmente sobre la esporulación.

La luz influye en la producción de metabolitos secundarios. Las especies de *Trichoderma* no son exigentes con relación al pH del sustrato. Pueden crecer en suelos con pH desde 5,5 a 8,5, aunque los valores óptimos se encuentran entre 5,5-6,5, es decir en un ambiente ligeramente ácido. El desarrollo de *Trichoderma* se activa con la presencia de humedad, con óptimo de 60% de la capacidad de retención de humedad del suelo. Se encuentran en suelos con abundante materia orgánica y por su relación con ésta, es ubicado en el grupo de hongos hipogeos, lignícolas y predadores (Martínez *et al*., 2013).

1.2.9 *Trichoderma* como agentes de control biológico

Las especies de *Trichoderma* se utilizan como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp., entre otros. Están catalogados entre los agentes de control biológico más eficientes debido al amplio espectro antagonista que presentan (Michel-Aceves *et al*., 2012). En un estudio realizado por Guédez *et al.* (2012) reportaron con diferentes aislados de *T. harzianum* altos grados de parasitismo en *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum,* todos los aislados demostraron tener porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los patógenos mayores al 50%.

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos. Las que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, en los organismos con los que interactúa, además de la habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas (Ezziyyani *et al*., 2004).

Trichoderma puede aplicarse desde semilla y protegen a las plántulas en la fase post-emergente de los patógenos fúngicos, así mismo, la aplicación directa al suelo ofrece una protección mayor a los cultivos (Stefanova, 2016).

1.2.9.1 Micoparasitismo

Se puede definir como el uso del patógeno como alimento por su antagonista, en el que generalmente se ven involucradas diferentes enzimas extracelulares que lisan o digieren las paredes de los hongos (Chet *et al*., 1997).

El micoparasitismo es un proceso complejo que ocurre en cuatro etapas: Crecimiento quimiotrófico; donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes, Reconocimiento; se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato, Adhesión y enrollamiento; ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno y Actividad lítica; producción

de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que hidrolizan paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma*. El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación. Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. Las enzimas desempeñan una función esencial en el micoparasitismo, ya que la penetración de la hifa de *Trichoderma* en su hospedante está regida por la maquinaria enzimática de este antagonista, y depende más del aislamiento y del hospedante, que de la propia especie del biorregulador. Entre las enzimas, se considera fundamental la β-1,3 glucanasa, estrechamente relacionada con la hidrolisis de la pared celular de patógenos.

En otras interacciones, las especies de *Trichoderma* lograron producir polisacaridasas, proteasas y lipasas, compuestos que pueden intervenir en la hidrolisis de la pared de las células de *Fusarium oxysporum*. También, el crecimiento de *Trichoderma* sobre el patógeno en cultivo dual, no es garantía de alta capacidad parasítica, ya que las hifas de ambos pueden compartir espacios en el sustrato sin llegar a parasitarlo (Martínez *et al*., 2013).

1.2.9.2 Competencia

Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un requerimiento (espacio o nutrientes), por lo que competencia puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás. La presencia de *Trichoderma* en suelos agrícolas y naturales es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, y de su plasticidad ecológica. La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato y hierro (Martínez *et al*., 2013).

En general, las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentran: la alta velocidad de crecimiento que posee y la secreción de metabolitos de diferente

naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en bloquear el paso del patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista. La competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual), se ejerce principalmente por espacio y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros. Bajo condiciones *in vivo*, la competencia de *Trichoderma* en la rizosfera, se relacionó con la capacidad de colonización de la raíz y el espacio adyacente. En ella influyen de forma importante factores como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Martínez *et al*., 2013).

1.2.9.3 Antibiosis

La antibiosis se puede definir como la producción de sustancias por *Trichoderma* que pueden resultar toxicas para otros organismos patógenos.

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, diversos en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico, estas sustancias inhibitorias son consideradas antibióticos (Infante *et al*., 2009).

Se identificaron compuestos del tipo de las alquilpironas (6-α-pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina) (Martínez *et al*., 2013). La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos lo que ejemplifica la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo (Martínez *et al*., 2013).

1.3 HIPÓTESIS

Las propiedades antagónicas de *Trichoderma* sp. Ta13-17 están asociadas con la competencia por espacio y el micoparasitismo.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1. General

Evaluar las propiedades antagónicas de *Trichoderma* sp. Ta13-17 contra diferentes especies del genero *Fusarium.*

1.4.2. Específicos

1. Identificar la especie de *Trichoderma* sp. Ta13-17 mediante técnicas moleculares.

2. Estimar *in vitro* competencia, micoparasitismo y antibiosis de *Trichoderma* sp. Ta13-17 contra diferentes especies de *Fusarium.*

3. Evaluar *in vivo* la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* sp. Ta13-17 sobre enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* en *Capsicum chinense* Jacq.

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo la reactivación de 12 cepas de *Fusarium* de diferentes especies y una cepa de *Trichoderma* sp. (Ta13-17) para ser utilizadas en pruebas posteriores y determinar el antagonismo de *Trichoderma* sobre *Fusarium*, se evaluó competencia, micoparasitismo y antibiosis en ensayos *in vitro* e *in vivo.* Se realizó la identificación a nivel especie de la cepa de Ta13-17 realizando la extracción de ADN, posteriormente PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y electroforesis en gel de agarosa, las muestras obtenidas se enviaron a secuenciación en un laboratorio especializado y los resultados obtenidos se sometieron a un análisis en el Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information.

Se hicieron pruebas *in vitro* del antagonismo de *Trichoderma* sp. Ta13-17 sobre las cepas de *Fusarium* para determinar la inhibición del crecimiento micelial y el micoparasitismo, así mismo se realizó un segundo ensayo *in vitro* sobre el efecto del filtrado libre de células de *Trichoderma* sp. Ta13-17 combinado con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) donde se dejó crecer a *Fusarium* para evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, el porcentaje de esporulación y el porcentaje de germinación de conidios.

Por último se realizó un ensayo *in vivo* para determinar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* sp. Ta13-17 sobre la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*, evaluando la severidad de los síntomas, además se midieron variables morfológicas y fisiológicas para determinar la influencia de los hongos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En este ensayo se utilizaron plantas de chile habanero de la variedad jaguar como modelo para desarrollar el experimento.

Todos los experimentos se desarrollaran bajo un diseño completamente al azar, fueron evaluados conforme a las variables de medición establecidas en la metodología y se realizaron análisis de varianza para cada variable de manera que al encontrar diferencias significativas se realizaron comparación de medias con el comparador Scott y Knott para las iariables *in vitro* y Tukey para las variables *in vivo*, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ en el programa estadístico InfoStat.

1.6 LITERATURA CITADA

Agrios G., N. 2002. Fitopatología. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. México. 425-431.

Arguello H., Lastres L., Rueda A. 2007. Programa de manejo integrado de plagas en América Central Manual MIP en cucúrbitas. Agrícola Panamericana. p.244.

Backer R., P. 1978. Inoculum potential. In. J. D. Horsfall and E. B. Cowling (Eds). Plant Pathology An Advanced Treatise. pp. 137-157.

Chet I., Inbar J., Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. pp.165-184.

Corrêa S., Mello M., Ávila Z., Braúna M., Pádua R., Gomes D. 2007. Cepas de *trichoderma* spp. para el control biológico de *sclerotium rolfsii* SACC. Fitosanidad. 11:3-9.

Ezziyyani M., Perez C. S., Requena M. E., Rubio L., y Candela M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani -, de la podredumbre del pimiento ("*Capsicum annuum* L.") causada por "*Phytophtora capsici*". An Biol., 26: 69-78.

García, A. M. 1977. Patología vegetal. Ed. Limusa. México, D.F. pp.15-129.

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

http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp.2015

Infante D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección Veg. 24:1 14-21.

Insuasty E., Acosta R., Salazar G., Betancourth G. 2014. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 15: 237-249.

Martínez B., Infante D., Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. 28: 1-11.

Martínez-Padrón, H.Y., E.O. Osorio-Hernández, B. Estrada-Drouaillet, J.A. López-Santillán, S.E. Varela-Fuentes, J.A. Torres-Castillo. 2017. control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. Agroproductividad 10:3:9-14.

Medina-Lara f., I. Echeverria-Machado, R. Pacheco-Arjona, N. Ruiz-Lau, A. Guzman-Antonio and M. Martinez-Estevez. 2008. Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). Hort Science, 43: 1549-1554.

Mejía-Bautista M. Á., A. Reyes-Ramírez, J. Cristóbal-Alejo, J. M. Tun-Suárez, L. Borges-Gómez, J. R. Pacheco-Aguilar. 2016. *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense.* Revista Mexicana de Fitopatología (34) 3: 208-222.

Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero-Sánchez, R. D. Martínez-Rojero, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, y A. Rebolledo-Martínez. 2012. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. AIA. 12: 43-54.

Moo-Koh A., J. Cristóbal A., A. Reyes-Ramírez, J. M. Tun-Suárez, †R. Sandoval-Luna, J. Ramírez-Pool. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. Agrociencia 48: 833-845.

Nelson, P. E., M.E. Mace, A.A. Bell and C.H. Beckman 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. fun wilt diseases of plants. 51-80.

Ocaña A. 2008. Alerta *Fusarium* raza 4 amenaza los cultivos.

Pérez G. A, A. Pineda D., L. Latournerie, M., W. Pam P. y C. Godoy A. 2008. Niveles de evapotranspiración potencial en la producción de chile habanero. Terra Latinoamericana, 26: 59-59.

Reyes A., J. Alejo C., E. Sánchez R., Suárez J. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero *(Capsicum chinensis)* con hongos antagonistas. Fitosanidad. (16) 3:161-165.

Ruiz-Lau N., Medina F. y Martínez M. 2011. El chile habanero: su origen y usos. Boletín informativo CICY.

Samuels G. J., Chaverri P., Farr D. F. y McCray E. B. 2007. *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory. Disponible en http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Stefanova M., Sandoval I., L. Martínez M., Heredia I., D. Ariosa M., Arévalo R. 2004. Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum.* Fitosanidad, (8)2: 35-38.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTAGONICAS DE *Trichoderma* sp. Ta13-17 CONTRA *Fusarium* spp.

Sandy E. Celis-Perera[1]; Jairo Cristóbal-Alejo[1§]; Arturo Reyes-Ramírez[1]; José M. Tun-Suarez[1]; Rene Garruña[1]

[1]Instituto Tecnológico de Conkal. Conkal, Yucatán. Autor responsable: jairoca54@hotmail.com

RESUMEN

El 60% de las enfermedades en los cultivos agrícolas son causadas por hongos fitopatógenos entre los que se encuentra *Fusarium* spp. Para su control, el principal método es el químico, aunque suele tener buenos resultados, su uso recurrente genera contaminación y selección de cepas resistentes. Como alternativa pueden emplearse microorganismos antagonistas, e.g. *Trichoderma* spp. que por sus propiedades de biocontrol, tiene resultados sobresalientes para el manejo de patógenos con origen en el suelo. Este trabajo consistió en identificar molecularmente, el aislado de la cepa *Trichoderma* sp. Ta13-17 y estimar su potencial antagónico *in vitro* e *in vivo*, contra 12 cepas, de 5 especies de *Fusarium;* aisladas de hospedantes de importancia económica. La identidad de la cepa Ta13-17 correspondió a *Trichoderma asperellum* e inhibió en cultivos duales, al menos el 50% del crecimiento micelial del fitopatógeno y del 92 a 100 % mostró micoparasitismo, el filtrado de *T. asperellum* incorporado al medio de cultivo causó en algunas cepas hasta un 90.40 % de inhibición de crecimiento micelial, inhibición en la esporulación y germinación de conidios. *In vivo*, *T. asperellum* inhibió en un 87.5 % los síntomas causados por *Fusarium oxysporum* en chile habanero y mostro potencial en la promoción de crecimiento vegetal del mismo. Por lo que se considera a *T. asperellum* como un agente prometedor en el biocontrol de *Fusarium* spp.

Palabras clave: antagonismo, antibiosis, biocontrol, *Fusarium*, marchitez, *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

Entre las principales limitantes de los cultivos hortícolas se encuentran las plagas y enfermedades que causan pérdidas en la producción. Al menos el 60% de las enfermedades presentes en cultivos agrícolas son causadas por hongos que disminuyen los rendimientos ya que afectan su desarrollo fisiológico y los hacen más vulnerables al ataque de otros fitopatógenos (Moo-Koh *et al*., 2014).

Las pudriciones de tallos y raíces son enfermedades causadas por hongos con origen en el suelo, y con frecuencia *Fusarium* spp., está asociado con estas alteraciones. *Fusarium* spp. ataca diferentes variedades de plantas, se caracterizan por sobrevivir en rastrojos de cultivos anteriores y permanecen en el suelo por varios años (Arguello *et al*., 2007).

Para su control, el principal método es el químico, aunque suele tener buenos resultados, su uso recurrente genera contaminación, pérdida de biodiversidad y selección de cepas resistentes (Corrêa *et al.*, 2007).

Por otra parte el chile habanero es de gran importancia para el estado de Yucatán, se estima que anualmente al menos 222.89 ha para su cultivo (SIAP, 2015). Es una fuente excelente de colorantes naturales, minerales y vitaminas A, C y E (Ruiz *et al*., 2011). Sin embargo, no está exento de ser afectado por *Fusarium*, la marchitez por pudrición de raíz es una de las enfermedades más importantes en este cultivo, (Reyes *et al*., 2012).

Una alternativa para reducir el uso de productos químicos en los cultivos hortícolas, son los microorganismos antagonistas, como *Trichoderma* spp. que ejercen control sobre los fitopatógenos, al competir por nutrientes y espacio, y producir metabolitos que inhiben su crecimiento micelial.

En este trabajo se planteó la hipótesis: Las propiedades antagonistas de *Trichoderma* sp. Ta13-17 están asociadas con la competencia por espacio y el micoparasitismo.

Por lo anterior el objetivo fue evaluar *in vitro*, competencia, micoparasitismo y antibiosis de la cepa Ta13-17 de *Trichoderma* sp. sobre doce cepas de *Fusarium* spp. y estimar su capacidad biocontroladora frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq).

MATERIALES Y METODOS

Obtención de material fúngico

El estudio se realizó en el laboratorio de Fitopatología y en un invernadero del Instituto Tecnológico de Conkal (Avenida Tecnológico s/n. Conkal, Yucatán, México). Se utilizaron doce cepas de *Fusarium*, (11 del cepario del ITConkal y una del Laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo) aisladas de hospedantes diferentes (Cuadro 1). La cepa de *Trichoderma* sp. Ta13-17 se aisló de la raíz y del tallo de chile dulce (*Capsicum annuum* L.).

Cuadro 1. Material fúngico empelado en las pruebas.

Especie	Clave	Numero de acceso genbank	Hospedante	Lugar de aislamiento
Fusarium verticillioides	FBO	MG020430	*Brassica oleracea*	TEYA
F. oxysporum	FSOT	KY100124	*Saccharum officinarum*	TIZIMÍN
F. equiseti	FJCF	MG020431	*Jatropha curcas*	UXMAL
F. solani	FJCE	KY013237	*J. curcas*	HOCTÚN
F. chlamydosporium	FJCA	MG020432	*J. curcas*	UXMAL
F. oxysporum	FCHJ	MG020428	*C. chinense*	OXKUTZCAB
F. oxysporum	FCHA	MG020429	*C. chinense*	CONKAL
F. equiseti	FCHE	MG020433	*C. chinense*	XMATKUIL
F. circinatum	FS5	MF075250	*Pinus greggii,*	TLAXCALA
F. equiseti.	FMT	MH015345	*Rhizophora mangle*	EL CUYO
F. verticillioides	ITC21	KY100125	*S. officinarum*	TIZIMIN
F. equiseti	ITC17	KX987254	*Eustoma grandiflorum*	DZUNUNCAN
Trichoderma sp.	Ta13-17	MH015346	*Capsicum annuum*	CONKAL

Para determinar la identidad de *Trichoderma* sp. Ta13-17, se hizo una identificación molecular basada en un análisis de la región ITS1-5.8s-ITS2 del rADN. Para la extracción de ADN se recolectó micelio de cinco días de crecimiento a 30 °C en agar de papa dextrosa (PDA); la masa micelial se recuperó por

filtración con gasa y el ADN se obtuvo con el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep según instrucciones del protocolo.

La integridad del ADN se verifico por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) (SIGMA®). Las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 28S se amplificaron por PCR con los iniciadores ITS1 (5' CCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTC-CGCTTATTGATATGC 3') sintetizados por INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT). La mezcla de reacción consistió en: amortiguador para PCR (1 X), iniciadores ITS1 e ITS4 (1 mM), $MgCI_2$ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 mL. La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador (TECHNE®-312, Minnesota, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 72 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (Moo-Koh, *et al.* 2014).

Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) (SIGMA®) y fueron enviados a secuenciación en el laboratorio Macrogen USA (www.macrogen.com). Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del Banco de Genes del National Center For Biotechnology Information (http://blast.ncbi.nlm.gov).

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. (Ta13-17) contra *Fusarium* spp.

Competencia

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA; se colocaron cortes de cinco mm de diámetro de micelio de *Trichoderma* sp. Ta13-17 con cinco días de crecimiento a un costado de

la caja y un disco de la misma medida del hongo fitopatógeno con siete días de crecimiento de manera opuesta al antagonista, dejando una distancia entre ellos de seis cm. Cada cepa de *Fusarium* constituyó un tratamiento con tres repeticiones, se utilizaron como testigos cajas solo con el fitopatógeno. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente (30-35±°C) y se tomó el registro de la competencia a partir del segundo día de la siembra para calcular la inhibición del crecimiento micelial (ICR) con la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004), donde PICR = (R1 – R2)/R1 *100: PICR: porcentaje de inhibición del crecimiento radial, R1: radio del patógeno testigo y R2: radio del patógeno enfrentado.

Micoparasitismo

El grado de micoparasitismo ejercido por la cepa de *Trichoderma* sp. Ta13-17 sobre el crecimiento del fitopatógeno se evaluó a partir del décimo día de establecido el ensayo de competencia, esta variable se estimó con una escala de cinco clases propuesta por Bell *et al.* (1982) proporcionándole valores en porcentaje donde: 1=100%, 2=92.05%, 3=50%, 4=7.95% y 5=0% con el programa 2LOG v. 1.0.

Antibiosis

Para estimar la presencia de metabolitos se dejó crecer a *Trichoderma* sp. Ta13-17 en medio liquido de caldo de papa más dextrosa por 21 días, posteriormente se filtró con ayuda de una gasa estéril, lo que evitó el paso de micelio, el filtrado se colocó en tubos Falcón de 50 mL y se centrifugó por 25 minutos a 3,000 rpm, se pasó el líquido a un frasco de plástico de 500 mL y las esporas sedimentadas se recuperaron en tubos Falcón de 50 mL para refrigerarlos y utilizarlas en pruebas posteriores.

El filtrado se dejó libre de esporas mediante un filtro millipore 0.22 μm y se preparó un nuevo medio de cultivo con PDA más el filtrado en proporción de volumen 1:1, después de esterilizar el PDA y antes de que este gelifique, se adicionó el filtrado. Una vez gelificado el medio, se sembró en el centro de la

caja Petri un disco de micelio de cinco mm de cada una de las 12 cepas de *Fusarium* de siete días de crecimiento (Michel-Aceve *et al*., 2004). Cada cepa del hongo fitopatógeno se consideró como tratamiento con tres repeticiones, con sus respectivo testigos, es decir sin filtrado solo con la cepa de *Fusarium* en estudio. Se dejaron en condiciones ambiente (30-35±°C) y se midió el radio de crecimiento del patógeno comenzando las mediciones al día siguiente de establecido el experimento, posteriormente las mediciones se realizaron cada tres días hasta que los testigos sin el filtrado de *Trichoderma* sp. Ta13-17 llenaron la caja. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial se estimó con la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004).

Además se determinó el porcentaje de esporulación y germinación de conidios, realizando un raspado de micelio con un portaobjetos estéril en las cajas ya evaluadas, se agregó 10 mL de agua destilada estéril y se filtró a través de una gasa, la solución de esporas obtenidas se dejó en matraces etiquetados, posteriormente para determinar el porcentaje de inhibición de la esporulación se tomó 2.5 μL de la solución de esporas y se colocó en una cámara de Neubauer para realizar el conteo de conidios, una vez obtenido este dato se aplicó la fórmula;

$$\% \text{ IE} = \frac{\text{Test} - \text{Trat}}{\text{Test}} \times 100$$

DONDE:

IE = Inhibición de esporulación

Test = Conidios sin filtrado

Trat = Conidios con filtrado

Para determinar el porcentaje de germinación de los conidios, se sembraron 100 conidios en cajas Petri de 9 cm de diámetro con PDA y otras en combinación de filtrado y PDA (1:1) teniendo ocho repeticiones

por tratamiento y contabilizando el número de conidios germinados a las 48 h posteriores a la siembra (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Pruebas de patogenicidad de *Fusarium* spp. en chile habanero

Se realizó una prueba preliminar de patogenicidad con las cepas aisladas de chile habanero. Se utilizaron semillas de chile habanero cv. Jaguar desinfectadas al 2 % con hipoclorito de sodio y lavadas tres veces con agua destilada estéril, se utilizaron las cepas FCHJ (*F. oxysporum*), FCHA (*F. oxysporum*) y FCHE *(F. equiseti).* Se sembró en charolas de poliestireno de 200 cavidades, con sustrato comercial Cosmopeat®, la charola se tapó con plástico negro para retener humedad y se destapo al cuarto día de la siembra cuando inicio la emergencia, se regó convencional y una vez que se presentaron las primeras hojas verdaderas se comenzó con la fertilización 19-19-19 (N_P_K). A los 45 días después de la siembra, se realizó el trasplante en vasos de poliestireno expandido (unicel) de 600 g con suelo esterilizado a 120 °C por 15 minutos, la virulencia de las cepas consistió en realizar un corte con bisturí en el tallo de las plantas cerca del inicio de las raíces en el cual se colocó un disco de micelio de cinco mm de siete días de crecimiento de cada una de las cepas de los patógenos y se selló con una lámina de plástico para garantizar que este quede fijado al corte. Se regó y fertilizó normal, se realizaron revisiones diarias para registrar los síntomas de la enfermedad.

La cepa que causó los primeros síntomas de la enfermedad se consideró como la más virulenta y se utilizó en la prueba de biocontrol *in vivo*.

Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* sp. Ta13-17 sobre *Fusarium oxysporum* en plantas de chile habanero

Se utilizó *Fusarium oxysporum* (FCHA) el cual resulto más virulenta en la prueba de patogenicidad, el hongo fitopatógeno se sembró en PDA y se dejó crecer 15 días para su uso posterior.

Las plántulas cv. Jaguar se trasplantaron a vasos de poliestireno de un kg, se utilizó como sustrato suelo estéril, en seguida se aplicó 1 mL por planta de una concentración de esporas de *Trichoderma* sp. Ta13-17 de 1 x 10^6 conidios·mL. Veinte días después del trasplante se realizó la infección con la cepa de *F. oxysporum* (FCHA) siguiendo la misma metodología que en la prueba de patogenicidad. Para el caso de los tratamientos 3 y 4 se siguió la misma metodología, en el tratamiento 3 se utilizó un disco de micelio de *Trichoderma* sp. Ta13-17 y en el tratamiento 4 un disco de PDA.

La fertilización se hizo con la fórmula 125-100-150 de N-P-K (Soria *et al*., 2002). Se estableció el experimento bajo condiciones de invernadero con cuatro tratamientos: 1) Testigo: sin inoculación, 2) Ta13-17 y FCHA: *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum*, 3) FCHA: *Fusarium oxysporum* y 4) Ta13-17: *Trichoderma* sp.

A partir de los primeros síntomas, se estimó la severidad cada tres días con la escala CIAT (1987) de cinco clases, donde: 1=0 %, 3=10 %, 5=25 %, 7=50 % y 9=70 % o más de daño. A los 18 días después de la infección, se calculó la severidad final de la enfermedad con la instrucción de arcoseno; y=arsin (sqrt (y/100)), mediante el parámetro de $Y_{final.}$ (Mejía *et al*., 2016).

Adicionalmente, se midieron variables fisiológicas para determinar la influencia de las cepas fúngicas inoculadas en el crecimiento de las plantas, con un SPAD 502 (Minolta, Tokio, Japón) se estimaron las unidades SPAD y con un analizador de gases en infrarrojo (LICOR 6400XT, Nebraska, Estados Unidos) se midió la fotosíntesis, conductancia estomática, carbono intercelular, transpiración y eficiencia del

agua, estas variables fueron evaluadas a los 30 días después del trasplante, se tomaron cinco plantas al azar de cada tratamiento y se realizaron cinco lecturas por hoja y tres hojas por planta.

Al final del experimento, se realizó un muestreo destructivo tomando diez plantas al azar por tratamiento, con una regla se midió altura, con un vernier diámetro del tallo, se contabilizó el número de hojas, y con un medidor de área foliar (LICOR 1200, Nebraska, Estados Unidos) se estimó el área de la hoja, por el método de desplazamiento se estimó el volumen de raíz y el peso seco total se contabilizo en plantas secadas en un horno de convección durante 72 horas a 70 °C.

Análisis de datos

Tanto *in vitro* e *in vivo* se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y cuando hubo diferencias significativas se realizó una comparación de medias con la prueba Scott & Knott ($P \leq 0.05$) para los experimentos *in vitro* y el método Tukey ($P \leq 0.05$) en los bioensayos *in* vivo. Mediante la función de arcoseno; y=arsin (sqrt (y/100)) se transformaron los datos de las variables que lo requirieron. Los análisis se hicieron con InfoStat Ver. Libre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular

La cepa de *Trichoderma* sp. con registro Ta13-17, comparada en el Banco de Genes del National Center For Biotechnology Information (http://blast.ncbi.nlm.gov) mostró una homología y cobertura del

100% con las secuencias de referencia KC479809.1 y JF501661.1 y correspondió la especie *Trichoderma asperellum.*

Reportes de Insuasty et al. (2014), Reyes et al. (2012) y Otadoh et al. (2011), demostraron la efectividad antagónica del género *Trichoderma* contra *Fusarium* spp. En las regiones tropicales de Sudamérica, la especie prevalente de *Trichoderma* es *T. asperellum*, sin embargo, es la menos estudiada. Así mismo, la mayoría de los bioformulados con *Trichoderma* se preparan a base de *T. viride, T. virens* y en mayor proporción con *T. harzianum* (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015).

Antagonismo *in vitro* de *T. asperellum* (Ta13-17) contra *Fusarium* spp.

Competencia

Trichoderma asperellum (Ta13-17) presentó mayor competencia en comparación con las cepas de *Fusarium* a partir del quinto día, en la inhibición de crecimiento micelial se estimaron porcentajes del 45 al 80%, conservándose mayor inhibición en *F. solani* (FJCE) y *F. equiseti* (ITC17) (Cuadro 2). Los niveles de inhibición estimados son similares a los reportado por Reyes *et al.* (2012), quienes obtuvieron con *Trichoderma* contra *Fusarium* sp., inhibiciones del crecimiento micelial entre 40.9 y 82.2 %. Suárez *et al.* (2008) reportaron con aislados diferentes de *Trichoderma* porcentajes significativos de inhibición del crecimiento micelial contra *F. solani*.

La capacidad competitiva de *Trichoderma* se debe a su tasa de incorporación de nutrientes, metabolismo y crecimiento superior cuando se enfrenta a otros hongos ya que es capaz de incorporar al medio de cultivo enzimas hidrolíticas, como celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas, que están

implicadas en los mecanismos de biocontrol, lo que le permite aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de estos recursos (Michel-Aceves *et al*., 2012).

En este estudio, *F. oxysporum* (FCHA), *F. equiseti* (FCHE) y *F. circinatum* (FS5) presentaron menores porcentajes de inhibición de crecimiento, por lo que la capacidad competitiva de *T. asperellum* (Ta13-17) y de otras especies, dependerá de la especie del hongo fitopatógeno objetivo. Cuando se estimó la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium* spp., enfrentado con *T. asperellum* (Ta13-17) el efecto fue similar que al quinto día. Sin embargo, se observó que en la confrontación con *F. verticillioides* (FBO) y *F. solani* (FJCE) se presentó una disminución en la competencia por parte de *Trichoderma* este efecto puede estar asociado con los metabolitos secretados por *Trichoderma* que con facilidad se volatilizan y permiten a los fitopatógenos recuperarse o que las enzimas y metabolitos secretados por parte de *T. asperellum* (Ta13-17) activaron mecanismos de supervivencia en los fitopatógenos, aun cuando *T. asperellum* mostró un antagonismo evidente en contra de *Fusarium* sp. (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015).

Cuadro 2. Capacidad inhibitoria *in vitro* del crecimiento micelial causado por *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre *Fusarium* spp.

		Inhibición de crecimiento micelial (%)	
Cepa	Especie	5 Días	7 Días
TESTIGO	*Fusarium* spp.	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c
FBO	*F. verticillioides*	63.80±2.05 b	62.80±0.92 b
FSOT	*F. oxysporum*	66.68±4.47 b	68.78±2.55 a
FJCF	*F. equiseti*	60.00±2.04 b	66.68±0.94 a
FJCE	*F. solani*	75.88±1.33 a	69.40±2.90 a
FJCA	*F. chlamydosporium*	63.90±0.99 b	65.48±2.22 a
FCHJ	*F. oxysporum*	60.78±1.39 b	69.70±1.06 a
FCHA	*F. oxysporum*	45.85±3.91 c	51.68±4.71 b
FCHE	*F. equiseti*	52.65±3.72 c	55.00±3.54 b
FS5	*F. circinatum*	50.00±6.43 c	60.93±4.05 b
FMT	*F. equiseti*	66.68±6.24 b	72.00±4.32 a
ITC21	*F. verticilioides*	69.23±2.73 b	72.03±1.53 a
ITC17	*F. equiseti*	76.90±0.00 a	80.00±0.00 a

Los datos son medias ± error estándar, letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Scott & Knott, ≤ 0.05); n = 4.

Micoparasitismo

A los 10 días de evaluación, el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en el micoparasitismo de *T. asperellum* (Ta13-17) contra *Fusarium* spp., en *F. solani* el antagonista mostró el menor micoparasitismo con un 54.67%. Sin embargo, a los 18 días no hubo diferencias entre las cepas de *Fusarium*, ya que *T. asperellum* (Ta13-17), causo al menos el 90% de micoparasitismo (Cuadro 3).

En la mayoría de las cepas se observó que a partir del octavo día de establecido el experimento el micelio de *T. asperellum* (Ta13-17) alcanzó el perímetro de la colonia del patógeno y dos días después se comenzaron a observar los primeros signos de micoparasitismo, estos resultados son similares a lo reportado por Reyes *et al.* (2012) quienes observaron que el crecimiento radial de *Trichoderma* se detiene en el punto de contacto con la cepa de *Fusarium* sp., y de tres a cuatro días después del contacto observaron el sobrecrecimiento indicativo del proceso de micoparasitismo.

Cuadro 3. Micoparasitismo *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre *Fusarium* spp.

		Micoparasitismo (%)	
Cepa	Especie	10 d	18 d
TESTIGO	*Fusarium* spp.	0.00±0.00 c	0.00±0.00 b
FBO	*F. verticillioides*	92.05±0.00 a	92.05±0.00 a
FSOT	*F. oxysporum*	92.05±0.00 a	94.70±2.65 a
FJCF	*F. equiseti*	94.70±2.65 a	94.70±2.65 a
FJCE	*F. solani*	54.67±4.67 b	94.70±2.65 a
FJCA	*F. chlamydosporium*	83.33±5.57 a	83.33±5.57 a
FCHJ	*F. oxysporum*	78.03±4.67 a	83.33±5.57 a
FCHA	*F. oxysporum*	92.05±0.00 a	97.35±2.65 a
FCHE	*F. equiseti*	94.70±2.65 a	97.35±2.65 a
FS5	*F. circinatum*	92.05±0.00 a	94.70±2.65 a
FMT	*F. equiseti*	100.00±0.00 a	100.00±0.00a
ITC21	*F. verticilioides*	94.70±2.65 a	94.70±2.65 a
ITC17	*F. equiseti*	100.00±0.00 a	100.00±0.00a

Los datos son medias ± error estándar, letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Scott & Knott, ≤ 0.05); n = 4.

Durante la primera fecha de medición se observó con *F. solani*, (FJCE), *F. chlamydosporium* (FJCA) y *F. oxysporum* (FCHJ) menor micoparasitismo, sin embargo, a los 18 días de exposición el micoparasitismo de *T. asperellum* (Ta13-17) aumento como con el resto de las cepas fitopatógenas. Las propiedades antimicrobianas que manifiestan las especies de *Trichoderma*, es gracias a la producción de sustancias como: trichodermina, sequisterpeno, trichotoxina y acetaldehído y enzimas extracelulares como β-1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa implicadas en la hidrolisis de paredes celulares lo cual posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Infante *et al*., 2009).

En un reporte de Martínez *et al.* (2013) donde utilizaron *Trichoderma* spp. contra e *Didymella bryoniae*, el micoparasitismo se asoció con la producción de, ß-1,3-glucanasas, ß-1,6-glucanasas, quitinasas y proteasas. El uso de microorganismos productores de quitinasas o glucanasas para el control de hongos fitopatógenos se considera un factor importante ya que la pared celular está constituida principalmente por microfibrillas de quitina y ß-glucanos, sensibles al ataque de estas enzimas.

Antibiosis

El filtrado de *T. asperellum* TA13-17 adicionado en el PDA tuvo mayor efecto en la inhibición del crecimiento micelial en *F. equiseti* (ITC17), *F. equiseti* (FJCF) y *F. chlamydosporium* (FJCA), en estas especies se estimaron promedios de inhibición mayores al 80%, mientras que en *F. solani* (FJCE) y *F. circinatum* (FS5) se observaron los menores efectos de antibiosis con promedios de 17% y 21%. Los porcentajes de inhibición en la esporulación estuvo comprendida entre 12.5 y 100% en las especies de *F. verticillioides* (FS5), *F. oxysporum*, (FSOT), *F. chlamydosporium* (FJCA) y *F. equiseti* (FJCF). En esta última se registró el 100% de inhibición de esporulación y germinación de conidios (cuadro 4). En *F.*

solani (FJCE) no hubo efecto en la inhibición de la esporulación, sin embargo, la inhibición de la germinación de sus conidios fue del 100%. Hernández-Ochandía *et al.* (2015) reportaron que *T. harzianum* y *T. virens* reducen significamente el crecimiento micelial *in vitro* de *Macrophomina phaseoli* y observaron cambios de color en el medio y lo asociaron con excreción de metabolitos secundarios. Arjona-Girona *et al.* (2014) mostraron efecto de metabolitos producidos por cepas de *Trichoderma* contra *Rosellinia necatrix*, indicaron que la presencia del metabolito 6-Pentil-α-Pirona, se produjo en cantidades mayores en aislados de *T. atroviride* y causó inhibición del crecimiento micelial en la mayoría de los aislados de *R. necatrix*.

Es importante mencionar que en varias especies de *Fusarium* no hubo efecto inhibitorio en la esporulación, pero el filtrado de *T. asperellum* (Ta13-17), tuvo un efecto estimulante para esta variable. En este sentido, Michel-Aceve *et al*. (2004), en un ensayo con *T. minutisporum* y *Trichoderma* sp. (T-405) productoras de metabolitos secundarios contra *F. oxysporum*, reportaron este efecto. Indicaron que este comportamiento del fitopatógeno, es una estrategia de sobrevivencia, ya que la viabilidad de dichos conidios se redujo al 50%.

Cuadro 4. Antibiosis de *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre *Fusarium* spp.

Cepa	Especie	Inhibición de crecimiento micelial (%)	Inhibición de esporulación (%)	Inhibición de germinación de conidios (%)
TESTIGO	*Fusarium* spp.	0.00±0.00 f	0±0.00 e	0±0.00 c
FBO	*F. verticillioides*	32.4±2.69 d	12.54±0.04 d	0±0.00 c
FSOT	*F. oxysporum*	36.8±5.86 d	73.91±0.56 c	0±0.00 c
FJCF	*F. equiseti*	90.0±1.02 a	100±0.00 a	100±0.00 a
FJCE	*F. solani*	17.1±6.18 e	0±0.00 e	100±0.00 a
FJCA	*F. chlamydosporium*	90.44.10 a	90±0.47 b	0±0.00 c
FCHJ	*F. oxysporum*	32.4±3.31 d	0±0.00 e	0±0.00 c
FCHA	*F. oxysporum*	52.7±4.60 c	0±0.00 e	0±0.00 c
FCHE	*F. equiseti*	69.5±1.34 b	0±0.00 e	0±0.00 c
FS5	*F. circinatum*	21.6±2.36 e	0±0.00 e	36.6±0.48 b
FMT	*F. equiseti*	66.3±2.65 b	0±0.00 e	0±0.00 c
ITC21	*F. verticilioides*	40.02.03 d	NE	NE
ITC17	*F. equiseti*	85.4±4.43 a	NE	NE

NE: No se observó esporulación. Los datos son medias ± error estándar, letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Scott & Knott, ≤ 0.05); n = 4.

Biocontrol de *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) contra *Fusarium oxysporum* en chile habanero

La mayor severidad final se manifestó en el tratamiento donde solo se inoculó con *F. oxysporum* las plantas mostraron "aproximadamente el 25 % de hojas y ramas con marchitamiento y clorosis" (CIAT 1987), que correspondió a un 12.50 % de severidad total por planta. Las plantas que no fueron inoculadas con el fitopatógeno (Testigo), las inoculadas con *T. asperellum* Ta13-17 y las inoculados con *F. oxysporum* más *T. asperellum* Ta13-17 no manifestaron síntomas de la enfermedad. Como lo indicaron Benítez *et al.* (2004) la resistencia inducida en las plantas por parte de especies de *Trichoderma* incrementa la actividad de enzimas y metabolitos y reducen la infección de hongos fitopatógenos. Vivek *et al.* (2016) reportaron en su estudio que la aplicación de una dosis especifica de esporas en plantas de tomate activa la síntesis de diferentes procesos metabólicos que culminan en una promoción de crecimiento en las plantas y en el aumento de una red de defensa contra diferentes patógenos.

Para las variables altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas y volumen de raíz se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$) obteniendo los valores más altos los tratamientos que fueron tratados con la cepa Ta13-17 y la interacción de Ta13-17/FCHA (Cuadro 6). Hernández-Ochandía *et al.* (2015) observaron efectos similares en plantas de tomate que fueron inoculadas con *T. asperellum,* con parámetros de crecimiento mayores a sus testigos y a las plantas que fueron infectadas con *Meloidogyne incognita.*

El área foliar y peso seco total fue significativamente mayor en el tratamiento con *Trichoderma asperellum* (Ta13-17). Candelero *et al*. (2015) mencionan que el efecto inductor sobre el crecimiento de las plantas es debido a la formación de sideróforos quelatantes de hierro y la presencia de hormonas reguladoras de crecimiento que actúan como estimulantes en tejidos meristematicos primarios en partes jóvenes.

Cuadro 5. Variables de crecimiento en plantas de chile habanero inoculadas con *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) y *Fusarium oxysporum*.

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Numero hojas	Área foliar (cm^2)	Volumen radical (mm^3)	Peso seco total (g)
Testigo	15.05±0.58 c	3.72±0.13 b	15.60±0.67 b	190.61±11.82 c	5.50±0.50 b	8.87±0.56 c
FCHA	12.83±0.66 c	4.16±0.12 b	16.10±0.98 b	164.86±18.30 c	5.10±0.92 b	8.15±0.91 c
Ta13-17 y FCHA	28.91±1.21 b	5.57±0.15 a	26.60±1.28 a	617.80±43.96 b	16.50±1.67 a	33.60±2.72 b
Ta13-17	34.45±1.17 a	6.04±0.15 a	29.00±1.69 a	830.44±44.96 a	18.50±1.67 a	44.18±1.14 a

Los valores son medias ± EE; las medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$); n = 10. Testigo: sin inocular, FCHA: *Fusarium oxysporum*, Ta13-17 y FCHA: *Trichoderma asperellum* y *Fusarium oxysporum* y Ta13-17: *Trichoderma asperellum*.

Las plantas inoculadas con la cepa de *F. oxysporum* (FCHA) tuvieron los valores más bajos de unidades SPAD (31.38) (Tukey P≤0.05); sin embargo, las plantas inoculadas con *F. oxysporum* mas *T. asperellum* (39.84) fueron estadísticamente similares al testigo (40.42) y a las inoculadas con T. asperellum (40.82) (Cuadro 7). Es decir, la cepa Ta13-17 no incrementa los valores de las unidades SPAD, pero evita que estos valores disminuyan por efecto de la cepa de *Fusarium oxysporum*. Los tratamientos Ta13-17/FCHA (10.3 µmol m^{-2} s^{-1}) y Ta13-17 (10.7 µmol m^{-2} s^{-1}) tuvieron una actividad fotosintética mayor que los tratamientos FCHA (2.9 µmol m^{-2} s^{-1}) y testigo (1.95 µmol m^{-2} s^{-1}) (Cuadro 7). En relación a la conductancia estomática y transpiración los mayores valores se obtuvieron en las plantas inoculadas con *T. asperellum* (0.15 µmol m^{-2} s^{-1} y 2.53 mmol m^{-2} s^{-1}), mientras que el tratamiento Ta13-17/FCHA obtuvo el segundo valor mayor (0.12 µmol m^{-2} s^{-1} y 2.00 mmol m^{-2} s^{-1}), ambos tratamientos presentaron datos muy por encima del testigo (0.03 µmol m^{-2} s^{-1} y 0.72 mmol m^{-2} s^{-1}) y el tratamiento FCHA (0.03 µmol m^{-2} s^{-1} 0.73 mmol m^{-2} s^{-1}). En la variable de carbono intercelular las plantas del testigo (303 µmol mol^{-1}) presentaron los valores más altos. En este sentido la inoculación de *T. asperellum* incremento la fotosíntesis debido a un mayor intercambio de gases ocasionado por un aumento en la conductancia estomática, lo cual también proporciono un incremento en la tasa de transpiración y disminuyó la concentración del carbono intercelular, el cual es un indicador de que las moléculas de CO_2 ubicadas en los espacios intercelulares de las hojas están siendo carboxilados con mayor eficiencia. En este contexto, en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Trichoderma* spp. se incrementó la concentración de ácido abscísico, una hormona muy importante en la regulación del balance del agua mediante la promoción de apertura y cierre de estomas, redujo su transpiración a diferencia de las plántulas que no fueron inoculadas. (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015).

Cuadro 6. Variables fisiológicas de plantas de chile habanero inoculadas con *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) y *Fusarium oxysporum*.

Tratamientos	Unidades SPAD		Fotosíntesis µmol m^{-2} s^{-1}		Conductancia Estomática µmol m^{-2} s^{-1}		Carbono intercelular µmol mol^{-1}		Transpiración mmol m^{-2} s^{-1}	
Testigo	40.94±0.88	a	1.95±0.07	c	0.03±0.0006	c	303±2.8	a	0.72±0.01	c
FCHA	31.38±0.77	b	2.9±0.14	b	0.03±0.002	c	255±2.3	b	0.73±0.04	c
Ta13-17 y FCHA	39.84±0.17	a	10.3±0.22	a	0.12±0.005	b	232±3.0	c	2.00±0.07	b
Ta13-17	40.82±0.79	a	10.7±0.2	a	0.15±0.004	a	262±2.0	b	2.53±0.06	a

Los valores son medias ± EE; las medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$); n = 10. Testigo: sin inocular, FCHA: *Fusarium oxysporum*, Ta13-17 y FCHA: *Trichoderma asperellum* y *Fusarium oxysporum* y Ta13-17: *Trichoderma asperellum*.

CONCLUSIONES

La cepa Ta13-17 aislada de *Capsicum annuum* L. fue identificada como *Trichoderma asperellum.*

Ta13-17 en confrontación *in vitro* contra *Fusarium* spp. presento alta capacidad competitiva por espacio desde el quinto día del enfrentamiento y micoparasitismo a partir décimo día de la interacción con las doce cepas evaluadas, y antibiosis contra las especies de *F. equiseti* (ITC17 y FJCF) aisladas de *Jatropha curcas* y *Eustoma grandiflorum*, *F. clamydosporium* (FJCA) y *F. solani* (FJCE), ambas aisladas de *Jatropha curcas*.

Ta13-17 causó en el biocontrol de *F. oxysporum* (FCHA) en chile habanero cv. Jaguar bajo condiciones de invernadero, una reducción del 100 % en la severidad de la enfermedad. Además mostró capacidad en la promoción de crecimiento de las plantas, al incrementar la altura, el diámetro del tallo, numero de hojas, área foliar y el volumen de raíz. Conjuntamente incremento la tasa de asimilación neta (Fotosíntesis), la conductancia estomática y la transpiración.

LITERATURA CITADA

Altomare C., W.A., Norvell, T. Bjorkman, G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Environmental Microbiology. 5:2926-2933.

Arguello H., L. Lastres, A. Rueda. 2007. Programa de manejo integrado de plagas en América Central (Promipac-Zamorano-Cosude). Ed. Manual MIP en cucúrbitas. 244 p.

Arjona-Girona I., F. Vinale, D. Ruano-Rosa, M. Lorito & C. J. López-Herrera. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. J. Plant Pathol 140:385–397.

Bell D., H. Well, C. Markham. 1982. "*In vitro*" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.

Benítez T., A. Rincón, C. Limón, A. Codón. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249-260.

Candelero D.J., A.J. Cristóbal, A. Reyes R., J.M. Tun S., A.M. Gamboa M., E. Ruiz S. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita.* PHYTON 84: 113-119.

CIAT. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Art van Schoohoven y Marcial Pastor-Corrales (comp). Cali, Colombia. 42 p. disponible en línea: https://books.google.com.mx/books/about/Sistema_estándar_para_la_evaluación_de.html?id=mpgIE_jDedMC&redir_esc=y.

Contreras-Cornejo H., L. Macías-Rodríguez, A. Garnica-Vergara, J. López-Bucio. 2015. *Trichoderma* Modulates Stomatal Aperture and Leaf Transpiration Through an Abscisic Acid-Dependent Mechanism in Arabidopsis. J. Plant Growth Regul 34: 425–432.

Corrêa S., M. Mello, R. Ávila. B. Minaré, R. Pádua, D. Gomes. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *sclerotium rolfsii* Sacc. Fitosanidad. 11: 3-9.

Ezziyyani M., C. S. Pérez, M. E. Requena, L. Rubio y M. E. Candela. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani -, de la podredumbre del pimiento ("*Capsicum annum* L.") causada por "*Phytophtora capsici*". An Biol., 26: 69-78.

Hernández-Ochandía D., G. Rodríguez, B. Peteira, B. Martínez. 2015. Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid Y White). Rev. Protección Veg. 30: 139-147.

http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp.2015

Infante D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección Veg. 24:1 14-21.

Insuasty E., Acosta R., Salazar G., Betancourth G. 2014. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 15: 237-249.

Martínez B., I. Danay, Y. Duarte, M. Moreno. 2013. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. Rev. Protección Veg. 28: 192-198.

Mejía-Bautista M. A., A. Reyes-Ramírez, J. Cristóbal-Alejo, J. M. Tun-Suárez. L. Borges-Gómez, J.R. Pacheco-Aguilar. 2016. *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense.* Revista Mexicana de Fitopatología 34:3 208-222

Michel-Aceves A., S. M. Otero-Sánchez, D. O. Rebolledo, G. R. Lezama. 2004. Producción y Actividad Antibiótica del 6 pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp., Sobre Especies de *Fusarium.* Revista Mexicana de Fitopatología. 22:1 14-21.

Michel-Aceves A., M. A. Otero-Sánchez, R. D. Martínez-Rojero, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, y A. Rebolledo-Martínez. 2012. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. AIA. 12: 43-54.

Moo-Koh A., J. Cristóbal A., A. Reyes-Ramírez, J. M. Tun-Suárez, †R. Sandoval-Luna, J. Ramírez-Pool. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. Agrociencia 48: 833-845.

Reyes A., J. Alejo C., E. Sánchez, J. Suárez. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero *(Capsicum chinensis)* con hongos antagonistas. Fitosanidad. 16:3 161-165.

Ruiz-Lau N., F. Medina L. y M. Martínez E. 2011. El CHILE HABANERO: su ORIGEN y USOS. pp. 70-77.

Soria, F. M., Tun S. J., Trejo R. A. y Terán S. R. 2002. Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jaqc.). SEP. DGTA. ITA-2 Conkal, Yucatán, México. 75p.

Suárez M., C., Fernández B., Valero N., R. Gámez C., A. Páez R.. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología, 10: 35-43.

Otadoh Jane A., A. S. Okoth, J. Ochanda and J. P. Kahindi. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli.* Tropical and Subtropical Agroecosystems, 13: 99 – 107.

Vargas-Hoyos, H. y Gilchrist-Ramelli, E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). Revista Mexicana de Micología. 42: 9-16.

Vivek S., U. Ram-Sanmukh, S. Birinchi Kumar, S. Harikesh. 2016. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plantgrowth in vegetable crops. Microbiological Research. 193: 74–76.