UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma asperellum* TAV-6 Y *T. harzianum* SOBRE *Rhizoctonia solani* PB1 EN CULTIVO DUAL Y EN JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN INVERNADERO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO (A) EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

ING. GEORGINA SÁNCHEZ RIVERA

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR:
DR. DANIEL RUÍZ JUÁREZ
CODIRECTOR (A):
M. EN C. HILDA ELIZABET FLORES MOCTEZUMA
ASESOR:
DR. FEDERICO CASTREJÓN AYALA

No. De acta: 283

CDMX, ABRIL 16 DE 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMALMAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

T E S I S

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma TAV-6* y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* PB1 EN CULTIVO DUAL Y EN JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN INVERNADERO

Presenta

ING. GEORGINA SÁNCHEZ RIVERA

Comité tutorial

Director Dr. DANIEL RUÍZ JUÁREZ
Profesor investigador Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco

Codirectora
M. en C. HILDA ELIZABET FLORES MOCTEZUMA
Profesora investigadora del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional

Asesor
Dr. FEDERICO CASTREJÓN AYALA
Profesor investigador del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional

CDMX, ABRIL 16 de 2025

RESUMEN

Se evaluó la actividad antagónica de dos aislados de *Trichoderma*, uno nativo *T. asperellum* TAV-6 y otro comercial *T. harzianum* RSCO-FUNG-0301B-307-002-001 sobre *Rhizoctonia solani* PB1. La investigación se realizó tanto en pruebas de en cultivo dual *in-vitro*, como en plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero.

Evaluación *in vitro*: La tipificación morfológica y molecular confirmó que los aislados nativos corresponden a *Trichoderma asperellum* y *Rhizoctonia solani*. En cultivo dual, ambos *Trichoderma* superaron el crecimiento de *R. solani* entre 9 y 10 días, cubriendo toda la placa Petri. A los 14 días se observó una inhibición total del crecimiento micelial de *R. solani* PB1 debido al micoparasitismo de *Trichoderma*. El Porcentaje de Inhibición Micelial Radial (PICMR) de *R. solani* PB1 fue del 100% con *T. harzianum* y 95% con *T. asperellum* TAV-6. El Crecimiento Micelial Radial (CMR) de los testigos fue mayor en *R. solani* PB1 (192 h), seguido por *T. harzianum* (240 h) y *T. asperellum* TAV-6 (264 h).

Evaluación en invernadero: Se evaluó la actividad antagónica de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre plántulas de jitomate “Río Grande” de 37 días de edad, de forma curativa. Se inocularon plántulas con ($5.4x10^5$) propágulos/mL de *R. solani* PB1 y dos días después con dos diferentes concentraciones de esporas de *Trichoderma*. La incidencia de *R. solani* PB1 fue del 15% y 40% con *T. harzianum* a ($2.2x10^7$ y $6.6x10^9$) esporas/mL respectivamente y del 30% con *T. asperellum* TAV-6 en ambas concentraciones de ($8.9x10^7$ y $1.3x10^9$) esporas/mL respectivamente. La severidad en las plántulas de jitomate fue del 61% con *R. solani* PB1, 37% y 45% con *T. harzianum* y 47% y 29% con *T. asperellum* TAV-6.

Se observaron diferencias significativas ($p<0.001$) en variables como la altura y diámetro del tallo de las plántulas, así como en el peso fresco y seco de la biomasa, especialmente con *T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y *T. asperellum* TV-6 ($8.9x10^7$) y ($1.3 x10^9$) esporas/mL.

Se concluye que, *in vitro*, ambos *Trichoderma* (TAV-6 y comercial) presentan actividad antagónica sobre *R. solani* PB1 a través de competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis. En condiciones de invernadero, la promoción del crecimiento de las plántulas dependió de la interacción compleja entre las cepas de *Trichoderma*, la cantidad y tipo de inóculo, el sustrato y la concentración de esporas, influyendo en la interacción antagónica con el patógeno y la plántula.

Palabras Clave: Micoparasitismo; Antibiosis; *Trichoderma*

Director de Tesis
Dr. Daniel Ruiz Juárez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

JURADO EXAMINADOR DEL EXAMEN

Presidente

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa

Profesor investigador, Titular C, Nivel II del SIN
investigador de la UAM-Xochimilco
No. Económico 05616

Secretario o vocal

Dr. Rodolfo Figueroa Brito

Profesor investigador, Titular C, Nivel I del SNI
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos
Instituto Politécnico Nacional

Vocal

Dr. Federico Castrejón Ayala
Profesor Investigador, Titular C, Nivel I del SNI
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos
Instituto Politécnico Nacional

Agradecimiento al SECIHTI

Georgina Sánchez Rivera agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada para la realización del programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS** Núm. 000357 de la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD XOCHIMILCO** durante el periodo 2022-2024, con número de solicitud de beca (Nacional Tradicional) 2022-000018-02NACF-04774 y número de apoyo de beca **838345**

Este trabajo de investigación titulado “Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizotonia solani* PB1 en cultivo dual y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero” se realizó en el laboratorio de docencia perteneciente al Departamento de Interacciones Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Daniel Ruíz Juárez, Profesor investigador de la Universidad Autónoma Metropolitana, la codirección de la M. en C. Hilda Elizabet Flores Moctezuma, Profesora investigadora del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional y la Asesoría del Dr. Federico Castrejón Ayala, Profesor investigador del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional.

Agradecimientos

A Dios por darme las fuerzas necesarias para emprender este proyecto y permitir que se lograra.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por abrirme sus puertas y brindar la oportunidad de realizar esta Maestría en Ciencias Agropecuarias

A los integrantes de mi Comité Tutoral por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo de investigación, Dr. Daniel Ruíz Juárez, a la M en C. Hilda Elizabet Flores Moctezuma y al Dr. Federico Castrejón Ayala.

A la Dra. Maricela Vergara Onofre por sus atenciones en todo momento

Al Dr. Fernando Lara por su apoyo en la identificación molecular de los aislados de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizoctonia* PB1.

Al M. en A. Marco A. Hurtado S. por su confianza, consejos y apoyo en todo momento.

A todos los profesores de la maestría por compartir sus conocimientos y enseñanzas dentro del aula de clases. Al Dr. Alejandro Ávalos R. por sus clases inspiradoras.

A mi amigo de muchos años Dr. Rodolfo Figueroa Brito por su confianza, apoyo en los momentos más difíciles de este trabajo y su larga amistad. Me demostró que un amigo es como un hermano en tiempos difíciles

A la M. en C. Mónica Gutiérrez por los ratos agradables que pasamos en el laboratorio y por el apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Ernesto Pérez por su apoyo en el análisis estadístico

A la M en C. Patricia Villa por sus consejos y ánimos para seguir adelante.

Al Biol. Sebastián Huacuja Barraza por consejos y apoyo en el uso del NCBI y edición de las secuencias del ADN

A la Dra. Daniela Meléndez por su apoyo y sugerencias en la elaboración de los cladogramas de los aislados nativos de *T. asperellum* TAV-6 *y R. solani* PB1

A mi amiga M. en C. Laura Medellín por su invaluable apoyo en los momentos más difíciles de este trabajo.

"La perseverancia no es una carrera larga; son muchas carreras cortas una tras otra." (Walter Elliot)

Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización y término del proyecto.

A mi mamá Georgina Rivera Martínez, por sus consejos y el tiempo que no le he dedicado por estar enfrentando mis propios retos.

A mis hijos Pablo y Andrea por su amor, apoyo y comprensión del tiempo que no les dediqué.

A mi esposo Federico, por ser parte de los retos de mi vida.

A mi familia, mis hermanas, hermano, sobrinas, sobrinos. A mi hermanita Elvia, tu irreparable pérdida me ha dejado un gran dolor, te extraño…

A mis compañeros de generación 30 de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la UAM Xochimilco, especialmente a Izaú Federico, Pablo, Yei, Mel, Dalia, Eduardo, por su confianza, apoyo y el tiempo que compartimos dentro y fuera del salón de clases.

Para aquellos que nos atrevemos a soñar y sobre todo a realizar nuestros propios sueños (Georgina S.R.)

Índice de contenido

Índice de Tablas
Índice de Figuras
Resumen
Abstract
I.INTRODUCCIÓN 1
II. MARCO DE REFERENCIA 2
2.1. Importancia del cultivo del Jitomate (*Solanum lycopersicum* L) 2
2.2. Producción mundial, nacional, estatal 2
2.3. Exportación e importación 3
2.4. Riesgos fitosanitarios 3
2.5. Importancia de *Rhizoctonia solani* Kühn 1858 en la agricultura 4
2.6. Importancia de *Trichoderma* en la agricultura 6
III. MARCO TEÓRICO 8
3.1. Cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) 8
3.2. El género *Rhizoctonia solani* Kühn 1958 14
3.3. Mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de fitopatógenos 19
3.4. Interacción patógeno-planta 21
3.5 El género *Trichoderma* sp. 22
IV. JUSTIFICACIÓN 32
V. HIPOTESIS 33
VI. OBJETIVOS 34
VII. METODOLOGÍA 35
7.1. Tipo de estudio 35
7.2. Población de estudio 35
7.3. Ubicación del área de estudio 35
7.4. Obtención del material biológico y su propagación 36
7.5. Pruebas de patogenicidad de *Rhizoctonia* PB1 37
7.6 Tipificación molecular de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizoctonia* PB1 39
7.7. Valoración de la actividad antagónica de *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia* sp. en cultivo dual *in-vitro* 44
7.8. Diseño del experimento en invernadero 47
7.9. Estimación de la incidencia y la severidad de *Rhizoctonia* sp. en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 52
7.10. Evaluación del crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum*) por efecto *T. asperellum TAV-6 y T. harzianum* en invernadero 55
7.11 Diseño Experimental y Análisis Estadístico 56
VIII. RESULTADOS 58
8.1. Recuperación y activación del material biológico en estudio 58
8.2. Identificación cultural y morfológica de las cepas de estudio 58
8.3. Pruebas de patogenicidad de *Rhizoctonia* PB1 60
8.4. Tipificación molecular de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizoctonia* PB1 61

8.5. Evaluación de la actividad antagónica de *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia* PB1 en cultivo dual *in-vitro* 67
8.6. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 74
8.7. Estimación de la incidencia y severidad en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) por efecto de *R. solani* PB1 en invernadero 76
8.8. Evaluación del efecto de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en el crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en invernadero 78
8.9. Actividad endofítica de *T. asperellum TAV-6 y T. harzianum* en tejidos de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 83
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 85
9.1. Actividad antagónica de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual *in-vitro* 85
9.2. Incidencia y severidad de *R. solani* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 91
9.3. Efecto en el crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) por *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en invernadero 92
9.4. Actividad endofítica de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en tejidos de raíz de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 99
X. CONCLUSIONES 101
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103

Índice de cuadros

PAG

Cuadro 1. Valores obtenidos del análisis del ADN de las cepas en estudio con Nanodrop 43

Cuadro 2. Tratamientos *in-vitro* de la valoración dual entre *T. asperellum* TAV-6, *T. harzianum* y *Rhizoctonia* PB1. 45

Cuadro 3. Escala de antagonismo de (Bell, 1982). 47

Cuadro 4. Tratamientos de *Rhizoctonia* PB1, *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* para evaluar en plántulas de jitomate *S. lycopersicum* L. en invernadero 51

Cuadro 5. Escala de severidad por el daño de *Rhizoctonia* PB1. sobre plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) modificada de Montealegre, (2003). 53

Cuadro 6. Escala visual nominal ordinaria para evaluar la severidad de la Pudrición Café en plantas de jitomate *S. lycopersicum* L. con *Rhizoctonia* PB1 e inóculo de *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* en forma curativa. (Elaboración propia) 54

Cuadro 7. Crecimiento micelial radial entre testigos de los aislados de *R. solani* PB1, *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* 74

Cuadro 8. Porcentaje de incidencia de la Pudrición Café causada por *R. solani* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en invernadero 77

Cuadro 9. Diámetro del tallo de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 15 días antes de la inoculación y 30 días después de la inoculación con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*. 79

Cuadro 10. Altura de plántulas 5,10,15 y 22 días después de inoculada con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* 80

Cuadro 11. Evaluación del peso fresco de plántulas de jitomate *(S. lycopersicum* L.) inoculada con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* 81

Cuadro 12. Evaluación del peso seco de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculada con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* 82

Cuadro 13. Evaluación del peso seco plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculadas con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* 83

Índice de figuras

	Pag
Figura 1. Etapas fenológicas del ciclo vegetativo del jitomate (*S. lycopersicum* L.)	12
Figura 2. Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn	17
Figura 3. Prueba de patogenicidad de *R. solani* PB1 en tubérculos de papa	39
Figura 4. Cultivo de los aislados de *Trichoderma* TAV-6 *y Rhizotonia* PB1 en medio líquido de PD (Agar-Dextrosa).	40
Figura 5. Kit comercial para extracción de ADN;	40
Figura 6. Equipo utilizado para analizar ADN	42
Figura 7. Disposición del cultivo dual *in-vitro* antagonista y fitopatógeno	46
Figura 8. Programa ImageJ (1.48).	46
Figura 9. Preparación de semilla para la siembra	48
Figura 10. Preparación del sustrato	49
Figura 11. Suspensión de esporas de los aislados de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*	50
Figura 12. Conteo de esporas de los aislados de *T. asperellum TAV-6, T. harzianum* y propágulos de *Rhizoctonia solani* PB1 cámara de Neubahuer	50
Figura 13 Disposición de tratamientos e inoculación de los aislados de *T. asperellum* TAV-6*, T. harzianum* y *Rhizoctonia* PB1.	51
Figura 14. Afectación basal del tallo con pudrición café ocasionada por *Rhizoctonia solani* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.).	53
Figura 15. Evaluación del efecto de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en el crecimiento de plántulas de jitomate.	56
Figura 16. Identificación cultural de los aislados de *T. asperellum* TAV-6; *T. harzianum* y *R. solani* PB1	58
Figura 17. Identificación morfológica de los aislados de *T. asperellum* TAV-6; *T. harzianum* y *R. solani* PB1	59-60
Figura 18. Respuesta de patogenicidad en tubérculos de papa infectados por *R. solani* PB1.	61
Figura 19. Porcentaje de identidad para *T. asperellum* TAV-6 en el Blast Gen-Bank del NCBI mediante el Factor de Elongación 1-Alfa (EF1- α)	63
Figura 20. Porcentaje de identidad para *T. asperellum* TAV-6 en el Blast Gen-Bank del NCBI mediante la región ITS 5.8S ribosomal RNA.	64
Figura 21. Porcentaje de identidad de *R. solani* PB1 en el Blast Gen-Bank del NCBI.	65
Figura 22. Cladograma de *T. asperellum* TAV-6 identificado por Factor de Elongación 1 alpha (F-1α).	66
Figura 23. Cladograma del aislado de *T. asperellum* TAV-6 identificado por ITS 5.8S ribosomal RNA	67
Figura 24. Cladograma del aislado de *R. solani* PB1.	68
Figura 25. Antagonismo de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1.	69
Figura 26. Actividad antagónica en cultivo dual *in vitro* de *T. asperellum* TAV-6 con *R. solani* PB1	70

Figura 27. Actividad antagónica en cultivo dual *in vitro* de *T. harzianum* con *R. solani* PB1 70
Figura 28. Micoparasitismo de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual *in vitro*. 71
Figura 29. Proceso de micoparasitismo de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual *in- vitro* 72
Figura 30. Actividad de antibiosis de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual *in vitro*. 73
Figura 31. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial radial de *T. harzianum* y *T. asperellum* TAV-6 sobre *R. solani* PB1 en confrontación dual a 120 h. 75
Figura 32. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial radial de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 a 96 h. 76
Figura 33. Estimación de severidad de *R. solani* PB1, causante de Pudrición Café en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en interacción con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en invernadero. 78
Figura 34. Capacidad endófita de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en tejidos de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 84

RESUMEN

Se evaluó la actividad antagónica de dos aislados de *Trichoderma*, uno nativo *T. asperellum* TAV-6 y otro comercial *T. harzianum* RSCO-FUNG-0301B-307-002-001 sobre *Rhizoctonia solani* PB1. La investigación se realizó tanto en pruebas de en cultivo dual *in-vitro*, como en plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero.

Evaluación *in vitro*: La tipificación morfológica y molecular confirmó que los aislados nativos corresponden a *Trichoderma asperellum* y *Rhizoctonia solani*. En cultivo dual, ambos *Trichoderma* superaron el crecimiento de *R. solani* entre 9 y 10 días, cubriendo toda la placa Petri. A los 14 días se observó una inhibición total del crecimiento micelial de *R. solani* PB1 debido al micoparasitismo de *Trichoderma*. El Porcentaje de Inhibición Micelial Radial (PICMR) de *R. solani* PB1 fue del 100% con *T. harzianum* y 95% con *T. asperellum* TAV-6. El Crecimiento Micelial Radial (CMR) de los testigos fue mayor en *R. solani* PB1 (192 h), seguido por *T. harzianum* (240 h) y *T. asperellum* TAV-6 (264 h).

Evaluación en invernadero: Se evaluó la actividad antagónica de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre plántulas de jitomate “Río Grande” de 37 días de edad, de forma curativa. Se inocularon plántulas con ($5.4x10^5$) propágulos/mL de *R. solani* PB1 y dos días después con dos diferentes concentraciones de esporas de *Trichoderma*. La incidencia de *R. solani* PB1 fue del 15% y 40% con *T. harzianum* a ($2.2x10^7$ y $6.6x10^9$) esporas/mL respectivamente y del 30% con *T. asperellum* TAV-6 en ambas concentraciones de ($8.9x10^7$ y $1.3x10^9$) esporas/mL respectivamente. La severidad en las plántulas de jitomate fue del 61% con *R. solani* PB1, 37% y 45% con *T. harzianum* y 47% y 29% con *T. asperellum* TAV-6.

Se observaron diferencias significativas ($p<0.001$) en variables como la altura y diámetro del tallo de las plántulas, así como en el peso fresco y seco de la biomasa, especialmente con *T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y *T. asperellum* TV-6 ($8.9x10^7$) y ($1.3 x10^9$) esporas/mL.

Se concluye que, *in vitro*, ambos *Trichoderma* (TAV-6 y comercial) presentan actividad antagónica sobre *R. solani* PB1 a través de competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis. En condiciones de invernadero, la promoción del crecimiento de las plántulas dependió de la interacción compleja entre las cepas de *Trichoderma*, la cantidad y tipo de inóculo, el sustrato y la concentración de esporas, influyendo en la interacción antagónica con el patógeno y la plántula.

ABSTRACT

The antagonistic activity of two Trichoderma isolates, a native *T. asperellum* TAV-6 and a commercial *T. harzianum* RSCO-FUNG-0301B-307-002-001 on *Rhizoctonia solani* PB1 was evaluated. The research was carried out both in *in-vitro* dual culture tests and in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings in greenhouses.

In vitro evaluation: Morphological and molecular typing confirmed that the native isolates correspond to *Trichoderma asperellum* and *Rhizoctonia solani*. In dual culture, both *Trichoderma* overcame the growth of R. solani between 9 and 10 days, covering the entire Petri dish. At 14 days, total inhibition of mycelial growth of R. solani PB1 due to *Trichoderma* mycoparasitism was observed. The Percentage of Radial Mycelial Inhibition (PICMR) of *R. solani* PB1 was 100% with *T. harzianum* and 95% with *T. asperellum* TAV-6. Radial Mycelial Growth (RMGC) of the controls was highest on *R. solani* PB1 (192 h), followed by *T. harzianum* (240 h) and *T. asperellum* TAV-6 (264 h).

Greenhouse evaluation: The antagonistic activity of *T. asperellum* TAV-6 and *T. harzianum* on 37-day-old 'Rio Grande' tomato seedlings was evaluated in a curative way. Seedlings were inoculated with (5.4x105) propagules/mL of *R. solani* PB1 and two days later with two different concentrations of *Trichoderma* spores. The incidence of *R. solani* PB1 was 15% and 40% with *T. harzianum* at (2.2x107 and 6.6x109) spores/mL respectively and 30% with *T. aspetellum* TAV-6 at both concentrations of (8.9x107 and 1.3x109) spores/mL respectively. Severity on tomato seedlings was 61% with *R. solani* PB1, 37% and 45% with *T. harzianum* and 47% and 29% with *T. asperellum* TAV-6.

Significant differences ($p<0.001$) were observed in variables such as height and stem diameter of seedlings, as well as in fresh and dry weight of biomass, especially with *T. harzianum* (6.6x109) spores/mL and *T. asperellum* TV-6 (8.9x107) and (1.3 x109) spores/mL.

It is concluded that, in vitro, both *Trichoderma* (TAV-6 and commercial) show antagonistic activity on *R. solani* PB1 through competition for space and nutrients, mycoparasitism and antibiosis. Under greenhouse conditions, seedling growth promotion depended on the complex interaction between *Trichoderma* strains, amount and type of inoculum, substrate and spore concentration, influencing the antagonistic interaction with the pathogen and the seedling.

I. INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor producción. A nivel mundial ocupa el cuarto lugar entre las diez hortalizas más cultivadas (Vincent et al., 2013. De acuerdo con Koike et al (2009) la producción de plántulas es un serio problema para la producción de esta hortaliza por las afectaciones de hongos que tienen su origen en el suelo, tales como *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. y *Rhizoctonia* sp. En este último, *Rhizoctonia solani* Kühn 1958 es la especie más importante dentro del género, quien afecta a más de 32 familias y 188 géneros de plantas cultivadas y malezas (Agrios, 2005; Srinivasachary et al., 2010). En jitomate (S. *lycopersicum* L.) *R. solani* causa pérdidas en almácigos entre 80 y 100% y en plántulas de trasplante y postrasplante afecta 30% la producción final del cultivo (Kangura et al., 1999; Flores et al., 2012). Los síntomas de plántulas consisten en marchitamiento general, ahogamiento del tallo y muerte posterior. La pudrición blanda ocasionada por *R. solani* se localiza en la parte basal del tallo, esto causa la muerte del 70% de plántulas (Arcos y Zúñiga, 2015; Medeiros et al., 2015). *R. solani* es un habitante del suelo y para su control se utilizan plaguicidas que resultan efectivos, pero afectan a la biodiversidad benéfica presente en el suelo (Martínez et al., 2016). Además, se crea resistencia de los patógenos hacia los plaguicidas y se presentan efectos tóxicos con daños en la salud humana, animal y en los ecosistemas (Jaramillo et al., 2007). Es por esto que se buscan alternativas amigables con el ambiente, entre ellas el uso de antagonistas como el hongo *Trichoderma* sp. que presenta capacidad antagónica por competencia de espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis y en las plantas efectos benéficos cuando establece relación simbiótica donde promueve crecimiento vegetativo e induce resistencia hacia fitopatógenos (Hermosa et al., 2012). Estos aspectos se investigaron en este trabajo con *T. asperelium* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1.

II. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Importancia del cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El cultivo del jitomate (*S. lycopersicum* L.) se encuentra en el cuarto lugar de los diez principales cultivos en el mundo (Vincent et al., 2013). Es un cultivo altamente redituable y generador de divisas (Jasso et al., 2012). Las variedades de jitomate cultivadas en México son Saladette, bola y Cherry (SIAP, 2020). En cuanto a su valor nutrimental es un fruto constituido por un 94% de agua, contiene glucosa y fructosa como carbohidratos, aporta fibra y vitaminas B1, B2, B6, y C, niacina, folatos, potasio, hierro y antioxidantes (Bernacer, 2016).

En México exporta, el jitomate es una de las hortalizas más importantes para la exportación y representa importante derrama económica para los agricultores y comercializadores. Se producen alrededor de 3 millones 800 mil toneladas en una superficie cultivada de 49 mil 400 hectáreas. México es el principal proveedor a nivel mundial de los mercados internacionales de jitomate en un 25.11% (SAGARPA, 2017).

2.2. Producción Mundial, Nacional y Estatal

A nivel mundial, el jitomate se encuentra en el cuarto lugar de los diez principales cultivos por su demanda comercial, con un valor de 55 millones de dólares (Vincent et al., 2013). Los principales países productores son China, India, Turquía, Estados Unidos de América, México ocupa la novena posición (FAOSTAT, 2019-2020).

A nivel mundial México ocupa el 10 lugar en la producción de tomate rojo=jitomate con 87, 918 ha cosechadas y una producción de 4, 271, 914 t (FAOSTAT, 2021). De acuerdo con el SIAP (2020) el jitomate es la principal hortaliza que se exporta en México. Representa una importancia social y económica debido a la cantidad de mano de obra que requiere para su producción y es considerado altamente

redituable y generador de divisas (Jasso et al., 2012).

Durante 2023, La superficie sembrada en el sistema de riego y temporal fue de 16,674,098.68 y se cosecharon 10,817,645.08 ha. Los estados con mayor superficie sembrada fueron: Veracruz 1, 447, 979. 77, Chiapas 1, 208, 740. 46, Zacatecas 1, 135, 865. 50, Tamaulipas 1, 073, 519. 61, Jalisco 1, 062, 604. 62 y Michoacán 1, 031, 259. 19 ha. (SIAP, 2024)

2.3. Exportación e Importación

En México se producen alrededor de 3 millones 800 mil t en una superficie cultivada de 49 mil 400 ha. (SAGARPA, 2017).

En 2016 México cubrió el 90.67 de las importaciones de Estados Unidos y el 65.31% de Canadá. Los principales importadores de jitomate durante 2017 fueron Estados Unidos de América (21%), Alemania (11%), Federación Rusa (9%), Francia (8%) y Reino Unido de Gran Bretaña (6%) (FAOSTAT, 2020). En 2020 se exportó un millón 662 mil toneladas (SIAP, 2021) mientras que en 2021 los principales países importadores de jitomate en fueron Estados Unidos y Canadá, Japón y Emiratos Árabes Unidos. (SAGARPA, 2017).

2.4. Riesgos fitosanitarios del jitomate (*S. lycopersicum* L.)

Se estima que existen alrededor de 270 000 especies de hongos, de los cuales 23 000 causan enfermedades en las plantas (Persley, 2010).

En el cultivo del jitomate (*S. lycopersicum* L.) como en otras hortalizas, las enfermedades causadas por hongos son de las más comunes y pueden ocasionar serios daños económicos (Koike et al., 2009).

Los riesgos fitosanitarios para la producción del jitomate constituyen una limitante para los agricultores. Las enfermedades causadas por diversos patógenos en todas las etapas fenológicas del cultivo (plántula, follaje, tallos y frutos) pueden causar

serios daños si no se toman medidas de control. Además de los hongos, las afectaciones al cultivo de jitomate (*S. lycopersicum* L.) pueden deberse a la presencia de bacterias, virus y nematodos. Debido a esto, es necesario establecer programas de control integrado con medidas de exclusión, erradicación y protección (Quiroga et al., 2007; Koike et al., 2009; Hohman et al., 2011; Jasso, 2012).

R. solani, es un hongo que provoca pérdidas de importancia económica en etapas de semillero o plántula, preemergencia y post-emergencia, se estima que al término del cultivo puede ocasionar una importante reducción del rendimiento (Gondal, et al., 2019)

2.5. Importancia *Rhizoctonia solani* Kühn (1858) en la agricultura

R. solani Kühn (1858) es la especie más importante dentro de su género con un amplio intervalo de hospederos. Afecta a plantas cultivadas y malezas de más de 32 familias y 188 géneros (Srinivasachary et al., 2010). Se propaga de manera saprófita en materia orgánica o en forma patógena en los tejidos de su planta hospedera. Causa necrosis en la etapa inicial de infección y en etapas tardías forma estructuras de resistencia conocidos como esclerocios que pueden estar viables en el suelo hasta por 10 años, la formación de estas estructuras de resistencia los protege de la acción de fungicidas sintéticos (Adams, 1990; Nicole, 1993; Abbas et al., 2017). En forma general afecta principalmente la raíz de plántulas, pero también semillas, tallos, hojas y frutos. Es un hongo saprofito que se encuentra en el suelo de todo el mundo, causa enfermedades en gran variedad de plantas, entre anuales, perennes, hortalizas, ornamentales, árboles, arbustos, pastos y arvenses (Agrios, 2005; Abbas et al., 2017). Entre los cultivos de importancia económica que afecta se encuentran los de las familias *Poaceae* (maíz, arroz, trigo, cebada, avena); *Fabaceae* (maní, frijol, alfalfa, garbanzos, lentejas, guisantes); *Solanaceae* (tabaco, tomate, papa*); Amaranthaceae* (caña de

azúcar); *Brassicaeae* (canola); Rubiaceae (café); *Malvaceae* (algodón); *Asteraceae* (lechuga); *Araceae* (potus); *Moraceae* (ficus) y *Linaceae* (linaza) (Ajayi y Bradley, 2018).

Las afectaciones por *R. solani* en plantas cultivadas pueden ocurrir desde el estado de plántula en los semilleros o almácigos, con síntomas de ahogamiento Damping-off o secadera, con daños que van de 80-100% y una afectación del 30% en el rendimiento al final del cultivo (Katarina y Verma 1992; Khangura et al., 1999). mientras que, en cultivos, cuando se tienen plantas adultas y en desarrollo puede ocasionar pudrición de raíz o formar un cancro en la base del tallo; también en el follaje puede ocasionar manchas o tizones y además puede causar necrosis o pudriciones en órganos de plantas que se cultivan en el suelo y posteriormente son almacenados. Los daños pueden ser serios incluso de pérdida total del cultivo (Agrios, 2005; Quiroga et al., 2007; Koike et al., 2009; Hohman et al., 2011; Jasso, 2012; Abbas et al., 2017; Ajayi y Bradley, 2018).

En remolacha azucarera, *R. solani* puede disminuir el rendimiento de la cosecha hasta en un 60% y una pérdida económica de hasta 2% anual (Schulze, et al., 2016). En el cultivo de chile en Pakistán *Fusarium solani* y *R. solani* causaron pérdidas entre 36 y 56%. Mientras que en almácigos las pérdidas de plántulas pueden afectarse en un 30% (Parveen et al., 2020). Se reporta también que en el cultivo del chile las afectaciones fueron entre 10 y 60%, por el complejo *R. solani*, *Phytopthora* spp., *Fusarium* spp. y *Pythium* spp. ocasionando la muerte prematura de plantas con pérdidas hasta del 100% (Pérez et al., 2003). En plantas de tomate (*S. lycopersicum* L.) *R. solani* ocasiona pudriciones en la raíz y el cuello de las plantas ocasionando pérdidas en la calidad y cantidad de la producción (Mendoza, 1996).

La importancia fitosanitaria de *R. solani e*n México se encuentra registrada en la

Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias NIMF no.8 “Determinación de la situación de una plaga en un área; en la que se señala, como presente en toda el área sembrada con cultivos hospederos (DGSV-CNRF, 2020).

El primer estudio de *R. solani* a nivel molecular por grupo de anastomosis se realizó en Japón durante 2004 y 2007 y se determinó que el grupo AG- 3 era el causante de pudrición de raíz en tomate (Misawa y Kuninaga, 2010).

2.6. Importancia de *Trichoderma* sp. en la agricultura

Trichoderma spp.es un hongo antagonista de fitopatógenos que se comporta como simbionte oportunista en la rizosfera de las plantas; en donde desarrolla mecanismos por competencia en el sustrato y por nutrientes, micoparasítismo y antibiosis. De manera indirecta activa mecanismos de resistencia inducida y promueve el crecimiento en plantas (Infante, 2009).

Es capaz de introducirse a los tejidos de la planta como endófito acelerando el desarrollo del sistema radicular lo que a su vez le permite tolerar situaciones de estrés; también mejora la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos esenciales tales como los iones metálicos del fe3+ gracias a la liberación del ácido harziánico y el fósforo, mineral que propicia a la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Diodoro, 2003; Hohman et al., 2011; Marques et al., 2017). (Vinale, et al., 2008).

Durante el mecanismo de antibiosis, *Trichoderma* es capaz de sintetizar compuestos volátiles y no volátiles con actividad antimicrobiana, tales como: Diterpenos Tetracíclicos (Harziandione); Sesquiterpenos, (Tricotecenos, Tricodermin y Harzianum A) y el Triterpeno (Viridin) estos metabolitos inhiben la elongación y terminación de la síntesis de las proteínas de los fitopatógenos (Contreras et al., 2016; Zeilinger et al., 2016).

Mientras que en el micoparasitismo, la acción de *Trichoderma*,se encuentra

regulada por un reconocimiento mediado por lectinas y posteriormente se liberan enzimas con actividad lítica como la quitinasa, glucanasa, celulasa y proteasa que degradan la pared celular del hongo fitopatógeno y el resultado de esto es lo que *Trichoderma* utiliza como alimento (Golman et al., 1994; Carsolio et al., 1999).

El efecto de biocontrol de *Trichoderma* sobre fitopatógenos se ha evaluado en cultivos económicamente importantes tales como, el jitomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oriza sativa*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum* sp.) (Martínez et al., 2013; Dianéz et al., 2016). *Trichoderma* ha sido utilizado en cultivos como algodón, berenjena, lechuga, girasol y ocra para control de *R. solani*, (Mathiavanan et al., 2000).

En pruebas de invernadero para el control del Damping-off causado por *R. solani* sobre plantas de tomate, *Trichoderma harzianum* aplicado a la semilla en dosis de 5 g y 10 g/kg redujo la infección a 3.33% y 16.67% respectivamente, mientras que, las plantas sin tratar presentaron una infección entre 30 y 40% (Ali y Taha, 2016 citado por Abbas et al., 2017). En otro estudio *Trichoderma longibrachiatum* inhibió 81.97% a *R. solani* (Zhang et al., 2018).

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Cultivo del Jitomate (S*olanum lycopersicum* L.)

En algunas regiones de México el jitomate *S. lycopersicu=Lycopersicum esculentum*) es conocido como tomate rojo. De acuerdo con estudios arqueológicos su centro del origen es Sudamérica, específicamente se localiza en el Perú, Ecuador, el norte de Chile y en las islas Galápagos. Se reporta que su principal domesticación se originó en México y de ahí se distribuyó a Norteamérica y Europa (Peralta y Spooner, 2007).

En cuanto a los usos, el jitomate se consume en la mayor parte del mundo como un fruto en fresco, en ensaladas, jugos, purés, conservas, o como acompañante de variedad de salsas, y platillos, en la industria el jitomate se procesa en purés, conservas, como componente de diversas salsas picantes o dulces, mermeladas, saborizantes y otros productos (SAGARPA, 2017; IICA-FAO s/a).

Clasificación taxonómica del jitomate (S*olanum lycopersicum* L.)
De acuerdo con la ITIS, (2012). La clasificación taxonómica del jitomate *S. lycopersicum* es la siguiente:

Reino: Plantae
Subreino:Viridiplantae
División: Tracheophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Solanales
Familia: Solanaceae
Género: *Solanum* sp.
Especie: *Solanum lycopersicum* L.

Características botánicas del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Es una hortaliza de la familia de las Solanáceas, se propaga por semillas. con un tallo principal largo ramificado. El tallo al inicio de su crecimiento es erguido, pero conforme crece se va torciendo por su peso. Puede alcanzar 2 m de alto, con un grosor de 2 a 4 cm de diámetro en la base. Está cubierto por pelos glandulares en su epidermis que al tacto despiden un aroma característico de la planta y está cubierto por las hojas Las hojas son alternas con 15 a 45 cm de longitud; tallos y hojas son de color verde, al tocarlas producen un olor característico; flores de color amarillo agrupadas en racimos de tres a siete, insertadas en el tallo principal. se forman en la planta después de los 50-60 días de la siembra Debido a que presenta un tallo poco rígido, se tiene que acomodar como enredadera sobre un tutor. Raíz. Constituida por tres partes, raíz principal de tipo pivotante, que alcanza 60 cm de profundidad, raíces secundarias y adventicias, que se desarrollan en la base del tallo y pueden formar una masa densa. La profundidad máxima es de 150 cm, pero la mayoría se localiza a los 45 cm El fruto, es una baya carnosa dentro de ella se encuentran las semillas, de forma esférica en su mayoría, de color rojo, aunque existen variedades con diferentes formas, tamaños, puede ser ligeramente redondo, con forma de pera, o achatados con variación en color que va de un blanco, amarillo, naranja, violáceo, negro o coloraciones intermedias entre cada color, maduran después de 55 a 70 días después de aparecer la flor. Pueden pesar entre 5 a 500 g dependiendo de la variedad y condiciones de desarrollo. semillas, son de color grisáceo, de forma oval aplastada, miden entre 2,4, y 5 mm se constituye por embrión, endospermo y la testa. En un gramo puede haber de 300 a 350 semillas. La temperatura mínima y máxima para su germinación es de 20 a 30°C. Al germinar, la radícula se alarga e introduce en el suelo. La germinación termina cuando la planta puede llevar a cabo sus funciones propias En un cultivo se puede alcanzar una densidad de 15000 a 20000 plantas por hectárea. La cosecha se inicia entre 90 y 120 días después de la siembra. Se

cultiva en lugares calientes y frescos entre 20ºC y 23ºC y necesita una intensidad luminosa alta. Prefiere para un desarrollo óptimo suelos profundos con buen drenaje y ligeramente ácidos. (FAO-PRODAR, 2014; Cortés, et al., 2017; IICA-FAO, s/a); López, 2016).

De acuerdo con la variedad que se cultive presenta tres tipos principales de crecimiento. Crecimiento determinado: La planta detiene su crecimiento en su tallo principal y lateral después de haber generado varios racimos de flores y con la formación del último racimo apical, se cosecha de una a tres veces con este tipo de variedades. Crecimiento indeterminado en el que los tallos principal y lateral de la planta crecen en un patrón continuo, en este tipo la yema terminal del tallo desarrolla al siguiente tallo, forma hojas y flores ilimitadas, las flores se disponen en racimos de forma escalonada, es decir, las primeras flores del racimo pueden estar abiertas y las que les siguen pueden estar cerradas. Las variedades de este tipo de crecimiento se utilizan para cultivos en invernaderos o casas sombra con tutoreo. Crecimiento semideterminado: La planta interrumpe el crecimiento de sus tallos después de generar un determinado número de inflorescencias, por lo regular en una etapa avanzada del ciclo del cultivo (López, 2017; Vázquez. Y Ramírez, 2020;

Producción de plántula

La producción de plántulas en semillero es un proceso importante en el cultivo del jitomate (*S. lycopersicum* L.), disminuye costos por un mejor aprovechamiento de la semilla y las condiciones en las que se establecen favorecen la germinación y el crecimiento de plántulas generalmente esta actividad se realiza en invernadero para asegurar la calidad de las plántulas y si las charolas de germinación ya fueron utilizadas para la germinación de semillas en otros ciclos se realiza un saneamiento utilizando fungicidas inorgánicos como Furadán 350 L, Captán o Tecto 60. Una forma más práctica es utilizar hipoclorito de sodio al 2% o realizar

tratamiento de vaporización entre 90 y 100°C. (Jasso et al., 2012). También se puede utilizar peróxido comercial al 1% (2 L en 200 L de agua ajustando el pH con ácido nítrico a razón de 6.5, las charolas se sumergen en esta solución por 2 a 3 minutos (Vásquez y Ramírez, 2020).

El sustrato debe contener las propiedades físicas y químicas requeridas que contengan una mezcla de peat moss, agrolita y vermiculita (Vázquez y Ramírez, 2020)

Etapas fenológicas del jitomate (*S. lycopersicum* L.)

las etapas fenológicas del jitomate pueden variar dependiendo de la variedad y del lugar donde se cultiva, se considera que son cinco: 1) Plántula. Después de la germinación de la semilla, la plántula es la primera etapa fenológica del cultivo del jitomate. Comienza con el establecimiento del semillero. En este periodo inicial se desarrollan las primeras hojas de la planta. 2) Crecimiento vegetativo. Comprende de 40 a 45 días después de la siembra de la semilla, a esta etapa le continúan cuatro semanas de crecimiento rápido. 3) Floración e inicio del cuaje de la fruta. Después del trasplante, se inicia la floración que dura entre 20 y 40 días hasta finalizar el crecimiento de la planta, el cuaje es cuando la flor es fecundada y comienza la transformación del fruto. 4) Desarrollo del fruto. Después de la fecundación el fruto comienza su crecimiento y desarrollo, las flores se caen y el fruto adquiere dos o tres grados de maduración. 5) Maduración del fruto. Generalmente la maduración del fruto ocurre después de 80 días del trasplante, dependiendo de la variedad, la nutrición y las condiciones climáticas. La cosecha tiene lugar después de 180 a 210 días después del trasplante. (López, 2016; Quirós, 2022) (Figura 1).

Figura 1. Etapas fenológicas del ciclo vegetativo del jitomate (*S. lycopersicum* L.) Tomado de https://es.pinterest.com/pin/725290715003968390/

Requerimientos ambientales del jitomate (*S. lycopersicum* L.)

De acuerdo con Jasso (2012); Cortés et al. (2017); IICA-FAO, s/a, los requerimientos ambientales del cultivo del jitomate (*S. lycopersicum* L.) son los siguientes:

Temperatura.

La temperatura óptima para el desarrollo de las plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) oscila entre 20 y 30°C durante el día y de 14 a 17°C por la noche. Cuando las temperaturas son mayores a 30-35°C pueden dañar el desarrollo de los óvulos y afectar la fructificación, afectando también el desarrollo de raíces. Mientras que temperaturas por arriba de 25°C y menores a 12°C pueden ocasionar problemas en la fecundación.

Humedad relativa.

La humedad relativa óptima para el desarrollo de las plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L.), se encuentra entre 60 y 80%, mayores a estos rangos favorecen el desarrollo de hongos en el follaje, agrietamiento del fruto y dificultad en la fecundación debido a la compactación del polen y aborto de flores, mientras que humedad relativa baja afecta la fecundación porque el polen se reseca evitando que se fije al estigma de la flor.

Luminosidad

La poca luminosidad afecta los procesos de floración y fecundación y en general el desarrollo vegetativo de la planta.

Radiación

Las plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) requieren de un fotoperiodo entre 8 y 16 horas, necesitan de una buena iluminación para evitar una reducción en la fotosíntesis y por consiguiente un deterioro en el desarrollo y la producción al final del cultivo. Por tanto, para la etapa de floración y cuajado de botones es recomendable una iluminación mayor en menor tiempo que una baja en mayor tiempo.

Ventilación

La ventilación adecuada es importante porque favorece el movimiento del aire caliente permitiendo un ambiente más fresco, con lo que puede evitarse que se desarrollen enfermedades.

Suelo

El suelo proporciona a la planta agua, nutrientes, oxígeno y soporte a las plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) se desarrollan mejor en suelos de media a mucha fertilidad, que sean profundos y que tengan un buen drenaje y ligeramente ácidos,

por ejemplo, los franco-arenosos, arcillo-arenosos y orgánicos. Se calcula una densidad por hectárea de 15000 a 20000 plantas.

pH

El pH que favorece el desarrollo de las plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) se encuentra entre 5.9 a 6.5. (Chemonics International, 2008).

Enfermedades del jitomate (*S. lycopersicum* L.)

Las enfermedades en el cultivo de jitomate son causadas por más de 200 enfermedades, entre ellas, las enfermedades por fitopatógenos del suelo tanto en campo como en invernadero ocasionan entre 10 y 80% de pérdidas económicas (Singh et al., 2017). Dentro de los hongos habitantes del suelo, se encuentra *R. solani* que ocasiona un ahogamiento de plántulas considerado como el síntoma más común, aunque, el daño puede ocurrir desde la semilla, o en la etapa de pre y post emergencia de la planta. (Agrios, 2005; Quiroga et al., 2007; Koike et al., 2009; Hohman et al., 2011; Jasso, 2012).

3.2. El género *Rhizoctonia solani* Kühn (1958)

El hongo fitopatógeno *R. solani* Kühn es un habitante del suelo con capacidad para infectar a una amplia variedad de plantas desde malezas, ornamentales, árboles forestales y diferentes variedades de cultivos hortícolas en los que se observan síntomas de ahogamiento, cancros o pudrición de corona. El daño se localiza en el ápice de crecimiento de la radícula, y ocasiona su muerte, el hongo causa lesiones de color café que rodean al tallo, el cual se torna aguanoso, blando e incapaz de sostenerse por lo que cae y muere (Agrios, 2005; Quiroga et al., 2007; Koike et al., 2009; Hohman et al., 2011; Jasso, 2012).

El daño en la preemergencia de la semilla provoca la destrucción del meristemo

apical, si la plántula logra emerger el daño se produce en la base del tallo dando lugar a una pudrición húmeda, doblamiento del tallo y muerte de la plántula. La lesión se muestra hundida con coloraciones que van del café, al café rojizo dando lugar a lo que se conoce como ahogamiento postemergente. En plantas adultas el daño se manifiesta en forma de cancros en los tallos y pudrición de raíz, en donde se observa justo en la superficie del suelo lesiones hundidas de coloración café rojiza, y si las condiciones de suelo y clima le son favorables es capaz de abarcar toda la base del tallo y las raíces, lo que ocasiona debilitamiento general en la planta, amarillamiento del follaje y la muerte (Romero, 1988).

Los principales cultivos que se ven afectados por la formación de cancros en el tallo por *R. solani* son el frijol, la soya, el chícharo, el chile, la espinaca, el camote y el tomate. El inóculo es transportado en partes de plantas enfermas y principalmente en forma de esclerocios, aunque las basidiosporas son diseminadas por el viento (Romero, 1988).

Clasificación taxonómíca de *R. solani* Kühn (1958)

La clasificación taxonómica de acuerdo con Ajayi y Bradley (2018). es la siguiente.

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Orden: Ceretobasidiaceae

Familia: Cantharellales

Género: *Rhizoctonia*

Especie*: Rhizoctonia solani*

Ciclo biológico de *R. solani* Kühn (1958)

En el campo de cultivo, la infección inicial de *R. solani*, puede ocurrir con la

germinación de estructuras sexuales o basidiosporas, que en condiciones de alta humedad desarrollan apresorios que les permiten penetran directamente en las células de la epidermis de la planta, posteriormente, forma un estroma dando lugar a lesiones pequeñas en las partes externas del hospedero. O mediante hifas que pueden infectar a la planta a través de aberturas y heridas naturales, la cutícula y epidermis (Keijer, 1996; Demirci y Döken, 1998; Agarwai, 2010).

R. solani forma estructuras de resistencia conocidas como esclerocios, que le permiten soportar condiciones adversas y permanecer de forma latente en el suelo por tiempo indefinido. Le favorecen condiciones óptimas de humedad moderada y temperaturas de entre 15 y 18°C. En algunas razas su actividad patogénica se dispara a temperaturas mayores a 35°C (Agrios, 2005).

Durante la etapa de infección, las hifas se adhieren a la superficie externa de la raíz, forman clavijas de infección que penetran en la cutícula y en las paredes de las células epidérmicas provocando su colapso (Keijer, 1996; Demirci y Döken, 1998; Agarwai, 2010). Para lograr la infección *R. solani* secreta enzimas extracelulares, que intervienen en la penetración mecánica degradando la celulosa y la lignina del tejido vegetal y por los exudados que son liberados por células en crecimiento de raíces de las plantas, los cuales son ricos en carbohidratos, aminoácidos, fenoles y ácidos orgánicos, que son fuente importante de nutrientes para el crecimiento y desarrollo del hongo. (Keijer, 1996; Demirci y Döken, 1998; Agarwai, 2010).

Después de la penetración, el hongo fitopatógeno, inicia su crecimiento y colonización dentro del tejido infectando, primero en los tejidos adyacentes en los que se forma una almohadilla de micelio que crece y se distribuye por todo el tejido hasta lograr invadirlo por completo y formar en esta fase esclerocios (Keijer, 1996; Demirci y Döken, 1998; Agarwai, 2010). En el tallo de la planta se observa

una constricción del tallo por las lesiones que *R. solani* provoca en su tejido, el cual se seca y pierde la capacidad de sostenerse (Agrios, 2005). Figura 2.

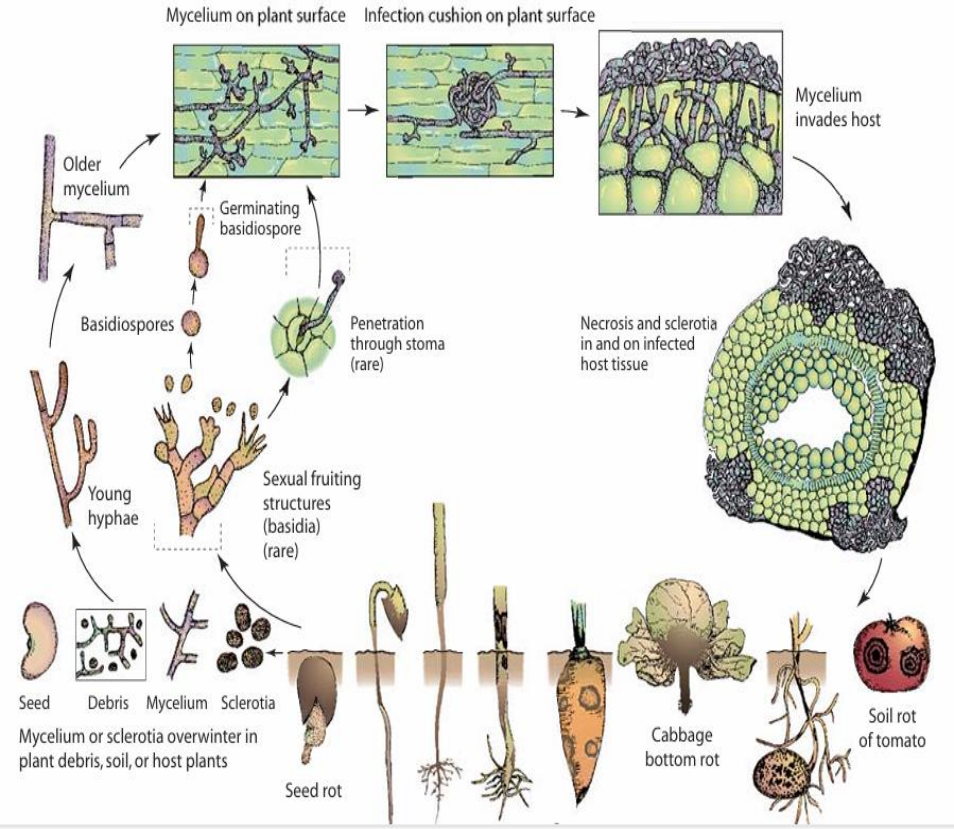


Figura 2. Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn, tomado de Agrios, 2005.

Métodos de control de *R. solani* Kühn

Control cultural

Consiste en utilizar semilla certificada, sembrar en la parte del lomo del surco, evitar encharcamientos, realizar rotación de cultivos con plantas no hospederas durante 2 o 3 años, trabajar con labranza mínima, aplicar enmiendas orgánicas, usar coberturas de restos de malezas y del cultivo anterior (Khan et al., 2010; Jasso, 2012).

Control genético.

Se recomienda utilizar variedades resistentes (Khan et al., 2010). Las estrategias con este método de control para *R. solani* son limitadas, porque no se cuenta con cultivos completamente resistentes, Ante esto, se recomienda la rotación de cultivos, pero a veces resulta insuficiente por el hábito polífago que incluye muchas especies vegetales (Abbas et al., 2017).

Control químico

Consiste en realizar un tratamiento a la semilla con fungicidas como Maneb, Zineb, Carboxil, Captan, Benomil. También se pueden aplicar fungicidas dirigidos al suelo como preventivos tales como: Azoxistrobin y Protioconazol o curativos tales como: Penflufen, Fluazinam, Pencycuron (Khan et al., 2010). Los fungicidas de amplio espectro aplicados al suelo pueden ser eficaces por un tiempo, pero son altamente tóxicos y de alto costo económico, además, provocan serias afectaciones en el ambiente (Abbas et al., 2017).

Control biológico

En este tipo de control se incorporan microorganismos antagónicos tales como *Rizobacterias,Verticillium* sp. y *Trichoderma* sp. que inhiben a los fitopatógenos que se encuentran en el suelo y de esta forma se pueda reducir el inóculo (Khan et al., 2010).

Manejo Integrado

En este tipo de control tiene por objetivo la disminución del inóculo en el suelo por lo que se recomienda Integrar varias prácticas de manejo agronómico en el cultivo entre ellas se pueden realizar rotación de cultivos, control químico reducido y aplicación de microorganismos benéficos. Se ha observado que el monocultivo además de causar deterioro al suelo física, química y microbiológicamente permite la supervivencia y proliferación de *R. solani* en donde puede causar pérdidas

significativas (Khan et al., 2010).

3.3. Mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de fitopatógenos

Cuando un patógeno invade los tejidos de una planta, se desencadena una serie de mecanismos de ataque por parte del patógeno y de defensa a nivel celular por parte de la planta para detener, aminorar o evitar el crecimiento y reproducción del agente patógeno. Tales mecanismos pueden ser de tipo constitutivo o de respuesta pasiva o “preformada” (Madriz, 2002).

En una respuesta estructural constitutiva pueden formarse capas gruesas de la cutícula, conteniendo compuestos como calosa, lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxipolina que permiten reforzar la estructura de la pared celular. La formación de tricomas, o la acumulación de ceras son también mecanismos estructurales de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos (Levine et al., 1994 citado por Madriz, 2002).

Durante el ataque de invasión por un fitopatógeno, las plantas activan mecanismos de defensa constitutivos que consisten en una reacción de hipersensibilidad (HR) o “apoptosis” que se caracteriza por una muerte celular controlada en el lugar donde ocurre la invasión del patógeno con la finalidad de aislar al patógeno en el área en donde se ha detectado la penetración, de este modo la planta interrumpe el flujo de nutrientes, engruesa las paredes celulares, incrementa el flujo del calcio (Ca) o activa cascadas de MAP cinasas y de genes de defensa o también secreta fitoalexinas. Además, se genera una producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis que están asociadas a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Se sabe que durante la muerte celular programada ocurre una cascada oxidativa donde se liberan agentes altamente oxidantes llamados AOS (Active Oxigen Species) como

el superóxido 0_2 y el peróxido de hidrógeno $H2O_2$ (Levine et al., 1994 citado por Madriz, 2002; Vivanco, 2005). También se ha encontrado la presencia de caspasas o cisteina-proteasas, enzimas que están involucradas en la reacción de hipersensibilidad de tejidos de plantas (Del Pozo y Lam, 1998).

Los metabolitos secundarios como primer frente en la defensa de la planta constituyen las principales barreras presentes en los tejidos, algunos inhiben la germinación de espora lo hongos fitopatógenos. Se localizan en el exterior de tejidos y órganos, en las paredes celulares y en la cutícula, también en el interior de las vacuolas. Son ejemplo, las agliconas de muchos flavonoides que se encuentran en forma cristalina sobre los tejidos exteriores de las hojas, o cuando la vacuola se vacía debido al proceso de infección se libera la aglicona hidrofóbica. Este tipo de defensas inducidas y constitutivas se han originado de procesos evolutivos y de presión de selección específicos de cada familia, es así como, las Fabáceas sintetizan fitoalexinas de tipo isoflavonoides, o las Solanáceas los sesquiterpenoides (Vivanco, 2005).

Además, de estos tipos de defensa, la planta cuenta con mecanismos de protección en la que intervienen enzimas, cuyo aumento puede contribuir directa o indirectamente en la resistencia patogénica, tales enzimas son la 1,3-glucanasa, quitinasa, peroxidasa, lipoxigenasa y catalasa (Gozzo, 2003; Vivanco, 2005). En los mecanismos de resistencia inducida se requiere de la activación de genes a través de un sistema de percepción conocidos como inductores que pueden ser polisacáridos, proteínas o peptidoglucanos localizados extracelular o en la superficie de los patógenos. Estos inductores se conocen como PAM por sus siglas en inglés (Patrones moleculares asociados a patógenos) los cuales se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que participan en la transducción de señal y en la activación de genes en las células vegetales para su defensa (Vivanco, 2005).

Las respuestas locales y sistémicas se inician con un reconocimiento de un PAM por un PRR o por un gen específico del patógeno y su receptor correspondiente en la planta del tipo gen por gen. Primero la respuesta es local y se liberan fitoalexinas durante este proceso puede ocurrir o no la reacción de hipersensibilidad, mientras que la defensa sistémica se realiza a distancia por la activación de genes defensivos como una señalización secundaria en donde preparan a tejidos y órganos para la defensa infectiva que comprende elevar la cantidad de toxinas y engrosamiento de las paredes celulares de los tejidos, esto afecta la actividad metabólica de la planta y por tanto su productividad. Durante la resistencia sistémica al activarse las señales de defensa bioquímica, ocurre la formación del ácido salicílico, del ácido jasmónico y del etileno. Las señales bioquímicas de defensa pueden activar genes de defensa en tejidos distantes o también a otras plantas que crecen a su alrededor y que pueden encontrarse expuestas a fitopatógenos o al ataque por herbívoros (Vivanco, 2005).

3.3. Interacción patógeno-planta

En cuanto a las interacciones de compatibilidad de un patógeno con su planta hospedera, se dice que una interacción patógeno-planta es compatible cuando el patógeno con capacidad virulenta logra atravesar todas las barreras de la planta ocasionado enfermedad y muerte del tejido celular, mientras que una interacción es incompatible cuando el patógeno no virulento no produce enfermedad en la planta (García y Ruiz, 2005).

La forma en que se alimentan los patógenos de las plantas se han clasificado en tres clases: 1) Biotrófica o endófitica se caracteriza porque el parásito se alimenta de las células de su hospedante sin matarlas y no producen síntomas de enfermedad. 2) Necrotrófica en la cual los patógenos parásitos van avanzando

entre las células y pueden seguir viviendo a expensa de ellas aun cuando éstas pierdan su integridad, estos patógenos matan las células de su hospedero y se alimentan del tejido en descomposición. 3) Hemibiotróficos, estos fitopatógenos, combinan ambas formas, la biotrófica y la necrotrófica cuando obtienen su alimento de las plantas (Madriz, 2002; Vivanco, 2005; Díaz, 2012).

3.4. El género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descubierto en Alemania por Persoon en 1794 y el primer agrupamiento en especies que se utiliza hasta el presente la realizó Rifai en 1969. El uso como antagonista de fitopatógenos se descubrió desde hace aproximadamente 200 años a finales del siglo XVII (Kumar, 2019). Este género antagonista de fitopatógenos ha sido estudiado durante más de 70 años, sin embargo, se comenzaron a comercializar como biocontroladores agrícolas al inicio del siglo XXI (Harman, 2001; Ezzyyani et al., 2004). Un agente antagonista es aquel que ejerce un efecto dañino en otro organismo mediante la liberación de antibióticos, enzimas líticas o por competencia de nutrientes dentro de un área (Cook y Baker, 1983).

Los hongos del género *Trichoderma*, son saprófitos del suelo y de la madera, de crecimiento muy rápido. Las principales especies agrupadas por Rifai son nueve: *T. piluliferum* (Webster y Rifai), *T. polysporum* (Link ex Pers Rifai). *T. hamatum* (Bon Bain), *T. koningii* (Rifai), *T. aureoviridae* (Rifai), *T. harzianum* (Rifai), *T. longibrachiatum* (Rifai), *T. pseudokoningii* (Rifai) y *T. viridae* (Pers ex S. F. Gray) (Rifai, 1969). Se conocen más de 100 especies de *Trichoderma* (Druzhinina, 2006). Las especies de *Trichoderma* se identificaron tomando en cuenta sus diferencias morfológicas y fisiológicas tales como el tipo de ramificación del conidióforo, forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia. (Druzhinina, 2006).

Además de su rápido establecimiento y crecimiento se han estudiado los efectos de biocontrol de *Trichoderma* sobre los fitopatógenos, tales como la competencia, la antibiosis y el micoparasitismo y se ha comprobado que ejerce una relación estrecha con las raíces de las plantas promoviendo su desarrollo e induciendo la resistencia sistémica (Woo et al., 2006). *Trichoderma* se ha utilizado para el manejo de los fitopatógenos tanto de origen en el suelo como de área foliar (Infante et al., 2009).

Biología

El hongo *Trichoderma* tiene amplia distribución y variabilidad genética, son saprófitos de crecimiento rápido; viven en el suelo, madera y materia orgánica en descomposición, habitan en bosques y suelos agrícolas (Grinyer et al., 2004; Samuels, 2006; Zhang et al., 2007; Martínez et al., 2013; Chaverri et al., 2011 citado por Ghazanfar et al., 2018). Su requerimiento nutrimental esbajo y para su reproducción requiere de una temperatura entre 25 y 30°C (Latifian et al., 2007; Sandle, 2014; Zeilinger et al., 2016). Es capaz de crecer en un medio con pH de 4.5 a 8.5, aunque el óptimo es de 4.5 y 5.5, y son capaces de soportar suelos con altas concentraciones de NaCl, arriba de 1000 µM. (Boat et al., 2018). Presenta una adaptabilidad ecológica que le permite crecer de manera saprófita en diversos sustratos (Sandle, 2014; Zeilinger et al., 2016). Los hongos del género*Trichoderma* pueden crecer y multiplicarse fácilmente en fuentes nutritivas como Malta Agar (MA), Papa Dextrosa Agar (PDA), producen conidios o esporas de varias formas con el característico color verde (Chaverry et al., 2003, citado por Ghazanfar et al., 2018), algunas forman clamidosporas de paredes gruesas. *Trichoderma* presenta mecanismos de vida endófita por lo que pueden vivir como simbiontes de plantas brindando beneficios como promover el crecimiento y desarrollo de la planta, mediante la producción de auxinas y giberelinas, también pueden producir ácidos orgánicos (glucónico, fumárico y cítrico) con los que se

puede disminuir el pH del suelo, permitiendo la solubilidad de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso, nutrimentos que son esenciales para el metabolismo vegetal (Ortíz, 2015; Sharma et al., 2017; Chaverri et al., 2011 citado por Ghazanfar et al., 2018).

Algunas de las especies de *Trichoderma* se han utilizado en el control de hongos fitopatógenos asociados principalmente con la pudrición de la raíz y marchitez porque se ha comprobado las propiedades micoparasitarias y antibióticas que presenta, aunque también pueden resultar eficientes consumidores de materia orgánica favoreciendo su descomposición por lo que es recomendable que en suelos agrícolas se incorpore materia orgánica o composta para favorecer su establecimiento y reproducción. (Ramos et al., 2008; Argumedo et al., 2009)

Clasificación taxonómica

De acuerdo con Companioni et al. (2019) La clasificación actual de *Trichoderma* es la siguiente:

Reino Fungi
División Mycota
Subdivisión: Eumycota
Clase: Hyphomycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género *Trichoderma* sp.

Características morfológicas

Las colonias de *Trichoderma* se desarrollan rápido en medios sintéticos, con tonos gris, verde, amarillo o marrón. Su reproducción es asexual mediante conidios. Las hifas son septadas generalmente hialinas, de pared lisa, compuesta por quitina y

glucano, los conidióforos hialinos con un eje principal muy ramificado, las fiálides verticiladas, alternas u opuestas, simples o en grupos. Howell, 1998; Harman, 2001; Howell, 2003; García, et al., 2017; Hyder et al., 2017).

Los conidios son unicelulares, de 3 a 5 µm de diámetro, de coloración verde por lo general, con pared lisa, de forma ovoide o elipsoidal, Tienen la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales estas son unicelulares, pero pueden unirse entre dos o más; crece y se ramifica formando hifas de 5 a 10 µm de ancho de forma elipsoidal, hialina, pueden presentar coloración verde o amarillo. La fase sexual se conoce como Hypocrea. (Howell, 1998; Harman, 2001; Howell, 2003; García, et al., 2017; Hyder et al., 2017).

Antagonismo sobre hongos fitopatógenos

El control biológico de fitopatógenos se define como la reducción de la densidad de inóculo de un fitopatógeno o su capacidad para producir enfermedad en las plantas utilizando uno o más microorganismos sin la intervención del hombre (Cook y Baker, 1983). Mientras que, el antagonismo se define como todo aquel organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro organismo (Infante et al., 2009). El antagonismo directo resulta del contacto físico y/o un alto grado de selectividad por el agente de biocontrol con el patógeno (Junaid et al., 2013).

El género *Trichoderma* es uno de los antagonistas ampliamente utilizados para control biológico de fitopatógenos por poseer diferentes mecanismos de acción (Méndez, 2010; Valencia et al., 2011). Además, por su rápido crecimiento en diferentes sustratos, facilidad para ser aisladas y cultivadas y capacidad de sobrevivencia a condiciones adversas (Rey et al., 2000; Benítez et al., 2004).

Además, se ha observado que la capacidad antagónica de *Trichoderma* para

controlar fitopatógenos es variable y va a depender de la cepa con la que se trabaje, y está relacionado con factores como: 1) La especificidad de la cepa, 2) Sus modos de acción, o actividad antagónica que presente ante el fitopatógeno tales como la antibiosis, competencia por espacio y nutrientes y el micoparasitismo, y 3) El fitopatógeno con el que se encuentre (Woo et al., 2006; Infante, 2009; Martínez, et al., 2013).

Micoparasitismo

En 1932 Weindling demostró la acción micoparásita de *Trichoderma*, sin embargo, fue hasta 1970 cuando se comenzaron a estudiar estos efectos en campo en cultivos de hortalizas y ornamentales (Chet, 1990).

El micoparasitismo es la acción de un microorganismo fúngico parasitando a otro hongo, se puede considerar como simbiosis antagónica entre organismos donde el antagonista utiliza como alimento al fitopatógeno (Atanasova et al., 2013). En esta simbiosis antagónica están implicadas enzimas que degradan las paredes celulares del hongo fitopatógeno parasitado como las quitinasas, celulasas, xylasas, pectinasas, glucanasas, lipasas, amilasas, arabinasas y proteasas (Harman, 2006; Ghazanfar et al., 2018).

De acuerdo con Martínez, et al. (2013), durante el micoparasitismo de *Trichoderma* sobre fitopatógenos ocurren cuatro etapas: 1) Reconocimiento. El reconocimiento de *Trichoderma* hacia fitopatógenos es mediado por lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas que están enlazadas con azúcares o glicoproteínas que interactúan con las paredes celulares del fitopatógeno, de este modo, *Trichoderma*. reconoce y crece quimiotróficamente hacia el hongo patógeno, 2) Adhesión y enrollamiento. Después del reconocimiento, las hifas de *Trichoderma* se adhieren y enrollan mediante procesos enzimáticos a las hifas del

patógeno formando estructuras parecidas a ganchos o apresorios. La adherencia ocurre con la unión de un azúcar presente en la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del fitopatógeno. 3) Actividad lítica. El hongo *Trichoderma* produce enzimas líticas como quitinasas, glucanasas, celulasas, lipasas y proteasas que degradan la pared celular del fitopatógeno lo que permite que las hifas del antagonista penetren las hifas del fitopatógeno .4) Muerte del fitopatógeno. El micoparasitismo termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del fitopatógeno (Infante, 2009). Las quitinasas son las enzimas líticas más importantes porque juegan un importante papel en la degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos (Vinale et al., 2008; Druzhinina et al., 2011; Romero et al., 2016; Ghazanfar et al., 2018).

Antibiosis

La antibiosis es considerada como la producción de metabolitos tóxicos antimicrobiales de un antagonista sobre un hongo fitopatógeno sin tener contacto físico. *Trichoderma* produce metabolitos volátiles y no volátiles consideradas “antibióticos” (Dennis y Webster, 1971; Hjeljord, 1998 citado por Infante, 2009).
Entre los metabolitos no volátiles que *Trichoderma* libera se encuentran los metabolitos peptídicos, tales como (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzukacilina y trichozianina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina (Infante, 2009).

Entre los metabolitos volátiles se encuentran Fenazinas, 2,4-diacetil cloroglucinol, 6-n-pentyl-2H--pyran-2-ona (6-PAP), alquil-pironas (6-a- pentil-pirona) isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina) y productos de desecho como el cianuro de hidrógeno, amoniaco, dióxido de carbono (Papavizas, 1985; Sivasithamparam,1998; Howell, 2003; Ghazanfar et al., 2018).

Competencia por espacio y nutrientes

El término competencia puede definirse como un comportamiento desigual entre dos organismos ante un mismo requerimiento siempre y cuando la utilización de uno de ellos reduzca la cantidad necesaria para el otro. La competencia por nutrientes que ejerce *Trichoderma* principalmente es por carbohidratos (almidón, celulosa, quitina, laminarina, pectina) y microelementos como el nitrógeno y hierro. Las cualidades que favorecen la competencia por espacio de *Trichoderma* son su velocidad de crecimiento y la secreción de metabolitos volátiles fungistáticos como la 6-pentyl-alfa pirona que tiene aroma a coco, además de enzimas líticas como la carboximetil celulosa, quitinasa y la b1,3 glucanasa (Stefanova, 1999; Infante, 2009). que frenan o eliminan a los competidores, por lo que en este mecanismo de acción *Trichoderma* bloquea el paso del patógeno y se disemina en el microambiente (Howell, 2003; Infante, 2009; Martínez et al., 2013).

Inductor de resistencia sistémica vegetal

Cuando un fitopatógeno, ataca a una planta ocurren alarmas mediadas por el ácido jasmónico y el etileno produciendo transducción de señales a nivel molecular para inducir la resistencia sistémica (ISR), estas señales activan un sistema nativo de defensa en las plantas; gracias a esto las plantas pueden controlar fitopatógenos que se encuentren distantes del antagonista (Harman et al., 2004). Mientras que, la producción de ácido salicílico induce señales de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Hermosa et al., 2012). Estos mecanismos de defensa inducen a la planta, por ejemplo, a reforzar la pared celular, a una muerte celular programada, producción de especies reactivas de oxígeno, producción de fitoalexinas y síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (Woo et al. 2006).

Inductor de crecimiento vegetal

La interacción de asociación endofítica que *Trichoderma* establece con la raíz de la planta involucra un reconocimiento a nivel molecular entre las dos partes a través de una red de señales mediadas por hormonas de la planta tales como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Hermosa et al., 2012).

Cuando el hongo *Trichoderma* inicia la colonización de la corteza de la raíz, libera algunos metabolitos que la planta reconoce como extraños por lo que genera mecanismos de defensa que consisten en liberar metabolitos de defensa tales como fitoalexinas, flavonoides y otros antimicrobiales y enzimas que *Trichoderma* debe resistir (Woo et al., 2006).

Al término de este proceso de reconocimiento y establecimiento de una relación simbiótica, por un lado, la planta, se ve beneficiada al adquirir nutrientes mejor asimilables gracias a la acción enzimática que *Trichoderma* ejerce en el suelo liberando ácidos orgánicos como el ácido fumárico y el ácido cítrico, compuestos que juegan un importante papel en la degradación de nutrientes que se encuentran cercanos a las raíces en el suelo transformando a compuestos más solubles, tales como el hierro, cobre, magnesio, zinc y nitrógeno. Otro beneficio para la planta es que *Trichoderma* estimula la producción de hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas que proveen a la planta un mejor crecimiento y desarrollo (Argumedo et al., 2009; Contreras et al., 2016).

Interacción con el hongo fitopatógeno

Una de las propiedades ampliamente estudiadas en el género *Trichoderma* es su capacidad micoparasítica al inhibir fitopatógenos de plantas cultivadas. Durante el

micoparasitismo, *Trichoderma* primero lleva a cabo un mecanismo de reconocimiento de su hospedero y posteriormente se adhiere a la pared celular del fitopatógeno, consecuentemente secreta enzimas líticas que provocan la hidrólisis de las hifas del fitopatógeno facilitando la extracción de los nutrientes contenidos en la célula del huésped. Durante esta interacción intervienen enzimas líticas como la quitinasa, glucanasa, N-acetilglucosamidasa y la proteasa, (Druzhinina et al., 2011) enzimas que facilitan la degradación hidrolítica de las paredes celulares de los patógenos las cuales están compuestas de quitina y glucano polisacáridos (Ghazanfar et al., 2018).

Interacción con su planta hospedera

El hongo *Trichoderma* establece con la con la raíz de su planta hospedera una relación de asociación endofítica que involucra primero un reconocimiento a nivel molecular entre las dos partes a través de una red de señales activadas por hormonas de la planta tales como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET). Durante esta interacción, *Trichoderma* debe tener la capacidad para adherirse a la raíz, penetrarla y resistir a los metabolitos tóxicos que se producen como respuesta a la invasión de las hifas en las paredes celulares de la raíz (Hermosa et al., 2012).

Por su parte, *Trichoderma* libera una serie de proteínas hidrofóbicas llamadas hydrofobinas, que se encuentran en la parte más externa de la pared celular así como expansinas que se relacionan con el desarrollo de la pared celular y otras como las TasSwo que son capaces de reconocer la celulosa y modificar la estructura de la pared celular de la planta al momento de la colonización, durante este proceso interviene la enzima endopolygalacturonasa ThPG1 que degrada la pared celular de la planta (Hermosa et al., 2012).

Dentro de los beneficios que *Trichoderma* aporta a la planta al establecerse en las raíces de las plantas es que mejora de manera natural su desarrollo al producir vitaminas, ácidos glucónico y cítrico, disminuye el pH del suelo (Sharma, et al., 2017). mejora el aprovechamiento de nutrientes solubiliza fosfatos y minerales como el hierro, fósforo, magnesio y manganeso (Vinale et al., 2008; Sharma, et al., 2017; Ghazanfar et al., 2018).

Además, estimula los mecanismos de defensa en la planta hacia los patógenos al inducir enzimas líticas como la peroxidasa, quitinasa, β1,3 glucanasa, fenilalanina y la hidroperoxidasa liasa, incluso, activas señales, para la biosíntesis y de acumulación de fitoalexinas de bajo peso molecular (Yedidia et al., 2003; Ghazanfar et al., 2018).

De este modo se establece una relación simbiótica en donde por un lado *Trichoderma* se beneficia con los nutrientes que la raíz produce y por el otro la planta se beneficia con la protección que *Trichoderma* le proporciona (Ghazanfar et al., 2018).

IV. JUSTIFICACIÓN

El jitomate (*S. lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor consumo y producción a nivel mundial, se encuentra en el cuarto lugar de los diez principales cultivos en el mundo (Vincent et al., 2013). Como todas las hortalizas, en el cultivo de jitomate se presentan microorganismos patógenos causantes de serias enfermedades que afectan el rendimiento. De acuerdo con Agrios (2005), entre los microorganismos que provocan enfermedad al cultivo de jitomate se encuentran más de 80 especies de hongos, 11 bacterias, 16 virus y varios nematodos y fitoplasmas.

El uso convencional de fungicidas inorgánicos para el control de enfermedades en las plantas cultivadas ha demostrado su eficacia en el control de las enfermedades incrementando el rendimiento, el beneficio económico y social sin embargo, ha generado una serie de problemáticas ambientales, en la biodiversidad de la microbiota benéfica presente en los suelos, ha provocado resistencia en las plagas, daño en la salud de animales y humana (Hermosa et al., 2012; Chen et al., 2016; Samaniego et al., 2018).

Por esta razón se buscan alternativas de control que sean amigables con el medio ambiente, se disminuya o evite el uso de plaguicidas tóxicos y se obtengan productos inocuos. El uso de *Trichoderma* es una alternativa por las bondades antagónicas que este hongo presenta de competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis, además de proveer en la planta protección ante patógenos al inducir la resistencia sistémica e inducida (Howell, 2003; Vinale et al., 2008; Infante et al., 2009; Hermosa et al., 2012) con lo que proporciona una mejor nutrición y por ende un mejor rendimiento en la producción al final del cultivo.

V. HIPÓTESIS

Ho: El aislado nativo de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y la cepa comercial de *T. harzianum* no tendrán actividad antagónica sobre *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual; no disminuirán la incidencia ni la severidad y no promoverán el crecimiento fitopatógeno en plántulas de jitomate (*Solanum. lycopersicum* L.) en invernadero.

Ha: El aislado nativo de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y el comercial de *T. harzianum* tendrán actividad antagónica sobre *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual y disminuirán la incidencia y la severidad del fitopatógeno, además, promoverán el crecimiento en plántulas de jitomate (*Solanum. lycopersicum* L.) en invernadero.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antagónica de la cepa nativa de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y de la cepa comercial de *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual *In-Vitro* y en plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero.

Objetivos específicos

a) Tipificar a nivel molecular las cepas nativas de *Trichoderma* TAV-6 y de *Rhizoctonia* PB1.

b) Evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* TAV-6 y de *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual *In-Vitro*.

c) Estimar la incidencia y la severidad de *Rhizoctonia solani* PB1 sobre plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero.

d) Evaluar el efecto en la promoción del crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) por las cepas nativa de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y la comercial de *T. harzianum* en invernadero.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Tipo de estudio

El estudio que se realizó es de tipo cuantitativo porque se tomaron datos numéricos para las evaluaciones de las variables y análisis estadístico de los datos, también es de carácter transversal, prospectivo porque se tomaron datos en una sola fase experimental sobre el antagonismo de una cepa nativa de *Trichoderma* asperellum TAV-6 y de una comercial de *Trichoderma harzianum*. sobre una cepa nativa del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual *in-Vitro* y en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum*) en condiciones de invernadero.

7.2. Población de estudio

Para el bioensayo en cultivo dual *in-vitro*, se utilizaron 75 cajas Petri de 100x15 cm con 10 mL de medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), marca Bioxón®. En donde se establecieron cinco tratamientos, en cada tratamiento se consideró a una caja Petri como una unidad experimental más 14 repeticiones. Para el bioensayo *in-Vivo*, en invernadero, la población de estudio fue de 200 plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Se establecieron 10 tratamientos con una plántula como unidad experimental más 19 repeticiones, establecidas en contenedores de unicel de 124 oz (355 mL), con 1000 g de sustrato a base de (50%) peat moss® especial para germinación, más (30%) de lombricomposta y (20%).de perlita.

7.3. Ubicación del área de estudio

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología II del Departamento de Interacciones Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional. Se localiza a 18°53´ N y 99°04´ O a

1210 msnm y en el área de invernaderos del campo experimental del CEPROBI.

7.4. Obtención del material biológico y su propagación

Las semillas de jitomate, variedad Rio Grande (Seminis Inc.) se adquirieron con el proveedor de agroquímicos (Agrícola el Amate) Francisco I. Madero 164 B. Col. Emiliano Zapata, Cuautla, Morelos, México. C.P. 62744.

El aislado nativo de *Rhizoctonia* PB1 se obtuvo a partir de tubérculos de papa con síntomas de Costra Negra. Los tubérculos infectados se obtuvieron de lotes comerciales, de la central de abasto de Cuautla, Morelos. Las muestras se etiquetaron, conservaron en bolsas de polietileno estériles para su análisis en laboratorio.

Las muestras de tubérculos se lavaron con agua potable y jabón y se secaron con papel absorbente. A partir de tejido con síntomas de la enfermedad se hicieron cortes entre tejido necrosado y tejido sano de 0.5 a 1 cm^2 del área infectada en condiciones de asepsia dentro de una cámara de aislamiento, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 2 minutos y se pasaron por tres lavados de agua destilada estéril. Las muestras se secaron en papel absorbente estéril y se sembraron en cajas Petri de 9 cm de diámetro, con medio (PDA), Marca Bioxón® y los cultivos se incubaron a temperatura de 27°C ± 2.

Los aislamientos se purificaron sembrando en cajas con PDA micelio de 48 horas mediante la técnica de punta de hifa para esto se utilizó un microscopio estereoscópico ZEISS. Se realizaron réplicas de este aislado en nuevas cajas Petri con PDA utilizando un horadador de 10 mm. Las hifas crecidas en este medio se observaron en un microscopio óptico NIKON® Eclipse E2000 a 40X0.65 y se identificaron a nivel morfológico con claves taxonómicas especializadas

De las colonias en crecimiento se observó el micelio característico de *Rhizoctonia* sp. clasificándola para este trabajo como *Rhizoctonia* PB1. De acuerdo con Barnett y Hunter (1998), Las hifas observadas presentaron septos con células, multinucleadas, las hifas más jóvenes hialinas y las maduras con tono café, también se observó el crecimiento característico de sus ramificaciones a 90 grados.

El aislado nativo de *Trichoderma* se obtuvo de plantas de albahaca (*Ocimun basilicum* L.) con síntoma de enfermedad traídas de un cultivo en campo en Amacuzac, Morelos. Se ubica a 18°32´LN y 90°07´LO a 982 msnm. Para su aislamiento se llevó a cabo el mismo procedimiento realizado para la obtención del hongo fitopatógeno y posteriormente se conservaron en cajas con medio PDA en refrigeración. De acuerdo con claves taxonómicas especializadas, las estructuras de las colonias en crecimiento, bajo microscopio óptico NIKON® Eclipse E2000 a 40X0.65 se observó micelio, cuerpos fructíferos y esporas que corresponden a *Trichoderma* sp. clasificándola como *Trichoderma* sp. TAV-6 para fines de esta investigación.

La cepa de *T. harzianum* se obtuvo del producto comercial marca Natucontrol® 13x400 g con registro: RSCO-FUNG-0301B-307-002-001 de la misma casa comercial donde se obtuvo la semilla de jitomate.

Propagación de los aislados

Para propagación de la cepa de *T. harzianum* y de los aislados de *Trichoderma TAV-6 y Rhizoctonia* PB1*,* se utilizaron cajas Petri estériles de 100x15mm con medio (PDA) y también medio con jugo V8, en las placas se sembraron discos de cada aislado utilizando un horadador de 10 mm. Las cajas sembradas se

incubaron a temperatura de 27 ± 2 °C, con luz natural, para descartar una posible contaminación se realizaron observaciones en intervalos de 24 h y los cultivos se dejaron crecer por 10 días.

7.5. Pruebas de patogenicidad *Rhizoctonia* PB1

Las pruebas de patogenicidad realizadas con *Rhizoctonia* PB1 consistieron en inocular tubérculos de papas sanas con micelio del aislado de *Rhizoctonia* PB1. Las papas se obtuvieron en un centro comercial, se buscó que no presentaran síntoma alguno de enfermedad y se llevaron al laboratorio, se lavaron con jabón y agua potable y se dejaron secar sobre papel absorbente. En campana de flujo laminar se procedió a desinfectar estos tubérculos con hipoclorito de sodio al 2%, durante dos minutos se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, dejando en cada paso 2 minutos y se secaron sobre papel absorbente estéril.

De tubérculos de papa ya secos, algunos se dejaron como testigo y otros fueron inoculados con el aislado de *Rhizoctonia* PB1 utilizando tres palillos de madera estériles, mismos que fueron portadores de propágulos de la cepa en estudio, por punción la punta de los palillos se introdujeron en el tubérculo, la profundidad de inserción de los palillos en la estructura de la papa fue de 1 cm a partir de la epidermis, la posición de los palillos fue en la parte media del tubérculo y de forma encontrada, con la finalidad de que fungieran como soporte al tubérculo, al ser suspendido en la superficie de papel absorbente y en el interior de charolas previamente desinfestadas con alcohol al 95% que sirvieron como cámaras húmedas, en las que se colocó una base de algodón y papel absorbente estéril, humedecido con agua destilada estéril. Las charolas se dejaron a temperatura ambiente 25 ± 2°C. Se revisaron en intervalos de 24 h hasta observar la expresión de los síntomas de infección (Figura 3).

De los tubérculos inoculados se tomó micelio y se sembró en cajas Petri, observando en microscopio óptico las características morfológicas de *Rhizoctonia* PB1.

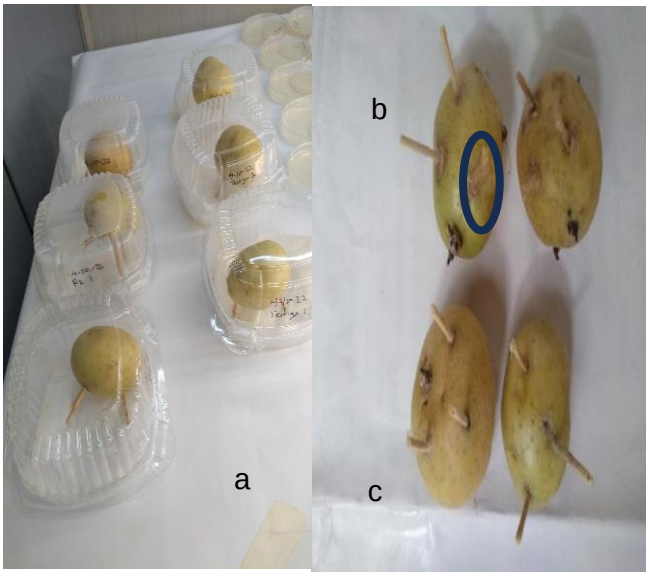


Figura 3. Pruebas de virulencia y Postulados de Koch. **a)** prueba de patogenicidad en tubérculos de papa; **b)** tubérculos infectados y **c)** tubérculos no infectados.

7.6. Tipificación molecular de *Trichoderma TAV-6* y *Rhizoctonia* PB1

Para realizar la extracción de ADN de los aislados, previamente por separado, se sembró micelio de *Trichoderma* TAV-6 y de *Rhizoctonia* PB1 en matraces Erlenmeyer de 25 mL con medio líquido Papa-Dextrosa (PD) Marca Difco™ y se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm a temperatura de 25 ± 2 °C. (Figura 4)

A partir de cultivo de 48 horas se extrajo el micelio del medio líquido (aproximadamente, un gramo) y se eliminó el exceso de humedad con papel absorbente estéril. Posteriormente se maceró con nitrógeno líquido y se siguieron los pasos del protocolo contenido en el Kit comercial de extracción de ADN,

Marca, ZYMO RESEACH® Catálogo No. D6020 (Figura 5).

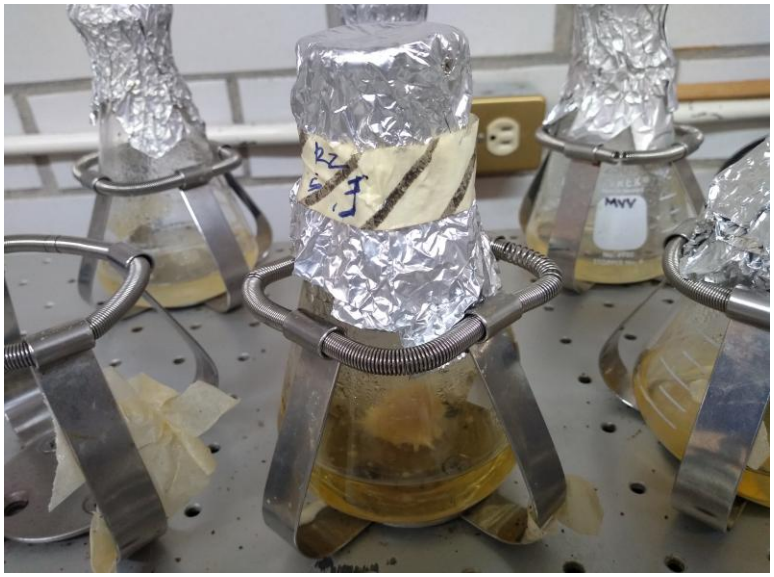


Figura 4. Cultivo de los aislados de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizotonia* PB1 en medio líquido de PD

Figura 5. Kit comercial para extracción de ADN;

Prueba de electroforesis

Una vez extraído el ADN de las cepas de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizoctonia* PB1 se procedió a correr por electroforesis con gel de agarosa al 1% y a 114 V por 40 min. Para formar el gel de agarosa, en un frasco Erlenmeyer se mezcló 0.6 g con 60 mL del Buffer de corrida TAE 1X, y se adicionó 3 µL de bromuro de etidio (BrEt), (fluorósido que permite observar las bandas del ADN en el transiluminador), se agitó suavemente y se calentó en microondas por periodos de 10 segundos en rondas de tres precalentamientos hasta disolver completamente la agarosa y cuando se observó un color homogéneo de la mezcla, el contenido se vertió en una base o cubeta de electroforesis, en este caso se colocaron dos gomas alrededor de la base y una peineta en uno de los extremos para formar los pozos en el gel. Se dejó gelificar por 40 a 50 minutos a temperatura ambiente.

Cuando se obtuvo el gel de agarosa, se retiró el peine, se colocó en la cubeta de electroforesis y se agregó Buffer TBE 1X. En un tubo eppendorf se prepararon las muestras de ADN adicionando 5 µl de la muestra en estudio más 1 µL de Buffer de siembra 6X DNA Loading Dye. Esta mezcla se depositó en los pocillos del gel de agarosa utilizando una micropipeta, y en otro de los pocillos se depositó 10 µL del marcador de peso molecular marca GeneRuler® 1Kb con fragmentos de ADN de 600 pb que permitió comparar las muestras en estudio y determinar el tamaño de los fragmentos de ADN (Figura 6).

Figura 6. Equipo utilizado para analizar la calidad y cantidad del ADN extraído de los aislados de *Trichoderma* sp. y *Rhizoctonia* PB1 **a)** Cámara de electroforesis; **b)** Transiluminador y **c)** Nanodrop.

Finalmente se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder de la corriente eléctrica a 100 V para dejar correr la muestra de ADN a través del gel de agarosa durante 40 minutos.

Enseguida el gel de agarosa se sacó de la cámara de electroforesis y se colocó en el transiluminador Benchtop 3uv tm Transiluminator, marca BioDoc-It ^{TM} Imaging System, para visualizar la pureza e integridad de las bandas de ADN de las muestras de los aislados en estudio. Las bandas del ADN se observaron brillantes e íntegras y se procedió a realizar la prueba de PCR.

Para determinar la cantidad y calidad de la muestra, después de obtener el ADN de los aislados en estudio, se colocó 1 µL de la muestra en un Nanodrop 2000 Marca Thermo Cientific® Piko 24, en este equipo se obtienen cantidades porcentuales del ADN puro, además, de materiales orgánicos y proteicos.

Para visualizar la pureza e integridad del ADN se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos y se valoró la calidad las muestras de ácido nucleico en NanoDrop con a absorbancia UV de 260 nm. Las mediciones de absorbancia permitieron cuantificar la concentración de ácidos nucleicos y tener una indicación de la pureza de las muestras de ADN. Los resultados obtenidos en cuanto a calidad, integridad y cantidad de ADN fueron aceptables para realizar una PCR (Cuadro1).

Cuadro 1. Valores obtenidos del análisis del ADN de las cepas en estudio con Nanodrop.

Cepa	A 260(10mm path)	A 280(10mm path)	Ng/µL
Trichoderma TAV-6	1.959	1.69	97.9
Rhizoctonia PB1	4.75	1.62	237.9

Prueba de PCR

Para realizar la prueba PCR de la muestra de ADN de los aislados de *Trichoderma* TAV-6 y de *Rhizoctonia* PB1, se amplificaron las regiones ribosomales ITS utilizando los cebadores ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) e ITS5 (5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3´) (White et al., 1990) los cuales se anclan en los ADNr 25S y 18S respectivamente por lo que incluyen también el 5.8S.

Además de los cebadores mencionados; en un tubo Eppendorf de 1.0 µL se mezclaron los siguientes reactivos:16.5 µL de Mh_2O (agua ultrapura milikive), 2.5 µL de Buffer 10X, 2.5 µL de MCl_2, 0.5 µL de dNTPS, 0.5 µL de Cebador 1 ITS5, 0.5 µL cebador 2 ITS4, 1.0 µL de DNA de la muestra de los aislados en estudio y 1.0 µL de Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

La mezcla contenida en el tubo Eppendorf se introdujo en un termociclador marca Thermo Cientific® Piko 24 de punto final y se programó a una corrida de desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, una alineación a 55 °C para los ITS por 30 s y una extensión a 72 °C por 1.30 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 5 min, el proceso se realizó en 1.30 h.

Las amplificaciones fueron corridas en un gel de agarosa al 1% w/v (1xTAE buffer)

teñidas con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y visualizado bajo luz UV en un transiluminador. Los fragmentos fueron determinados por comparación con un marcador de 1kb (Promega®) y las bandas únicas que se obtuvieron posteriormente fueron secuenciadas.

Secuenciación

Después de obtener la PCR de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizoctonia* PB1, se enviaron muestras al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) ubicado en Cuernavaca, Morelos, México, donde se realizó la secuenciación molecular de los nucleótidos del ADN de los aislados. Se secuenciaron ambas hebras por amplicón. La secuencia molecular obtenida fue etiquetada con la numeración para *Trichoderma* TAV-6 13454 (por factor de elongación), 13456 *Trichoderma* TAV-6 (ITS) y 13460 para *Rhizoctonia* PB1 (ITS). Los archivos de las secuencias fueron enviadas por el IBT en formato ABI, por lo que fueron transformados a formato FASTA mediante el programa BioEdit, para poder ingresar el archivo de estos nucleótidos a la plataforma del NCBI y buscar la identidad porcentual de las muestras de ambos aislados con las existentes en la base de datos del GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ para corroborar el orden y determinar las especies a las que pertenecen estos aislados.

7.7. Valoración de la actividad antagónica de *Trichoderma asperellum TAV-6* y T*. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual *In-Vitro*

Para llevar a cabo la valoración de la actividad antagónica de *Trichoderma TAV-6* y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia* PB1 se establecieron cinco tratamientos con un diseño completamente al azar. Cada tratamiento consistió en 15 placas. Cada caja Petri se consideró como una unidad experimental más 14 repeticiones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos *In-Vitro* de la valoración dual entre *Trichoderma* TAV-6, *Trichoderma harzianum* y *Rhizoctonia* PB1.

	Tratamientos	**N**
T1	*Rhizoctonia PB1*	15
T2	*Trichoderma* TAV-6	15
T3	*Trichoderma harzianum*	15
T4	*Trichoderma* TAV-6 + *Rhizoctonia* PB1	15
T5	*Trichodema harzianum* + *Rhizoctonia* PB1	15

Se utilizaron cajas Petri de 90x15 mm con 15 mL de medio PDA. Para la confrontación dual se colocaron dos discos de 5 mm en extremos opuestos con distancia entre ellos de 4 cm, uno de los discos con micelio de *Trichoderma asperellum* TAV-6, otro con *T. harzianum* y en el otro extremo un disco con micelio de *Rhizoctonia solani* PB1 (Dennis y Webster, 1971). Mientras que, en los controles sólo se colocó un solo disco de cada aislado en un extremo de la caja. Se incubaron a 25 ± 2°C, con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. En intervalos de 24 h se observó y marcó el crecimiento del micelio en cada uno de los tratamientos con tinta indeleble (Figura 7). Para los tratamientos en confrontación, las mediciones se realizaron hasta la interacción física de los micelios del antagonista con el fitopatógeno y en los testigos hasta que cubrieron por completo la caja Petri (Guédez et al., 2012; Osorio, et al., 2016). Posteriormente, se tomaron fotografías de las áreas marcadas para medir el crecimiento micelial en mm^2 con el programa ImageJ (versión 1.48) (Figura 8). Con los datos de las mediciones se obtuvo el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) empleando la fórmula de Ezzyyani et al (2004) e Infante et al (2013).

$$PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

Donde:

R1= Crecimiento radial del micelio (cm^2) Testigo (*Rhizoctonia* PB1 en medio de cultivo sin *Trichoderma* sp.)

R2= Crecimiento radial del micelio (cm^2) de *Rhizoctonia* PB1 en confrontación con *Trichoderma* sp.

Mientras que el porcentaje de micoparasitismo se estimó con la fórmula de Osorio, et al (2016), considerando el área de crecimiento de *R. solani* PB1 como testigo y en confrontación con los dos aislados de *Trichoderma*.

$$\%PM=[((D1-D2)/D1)*100]$$

Donde:

D1= Diámetro de la colonia de *R. solani* PB1, creciendo sin la presencia de *Trichoderma*

D2=Diámetro de la colonia de *R. solani* PB1, creciendo en presencia de *Trichoderma*

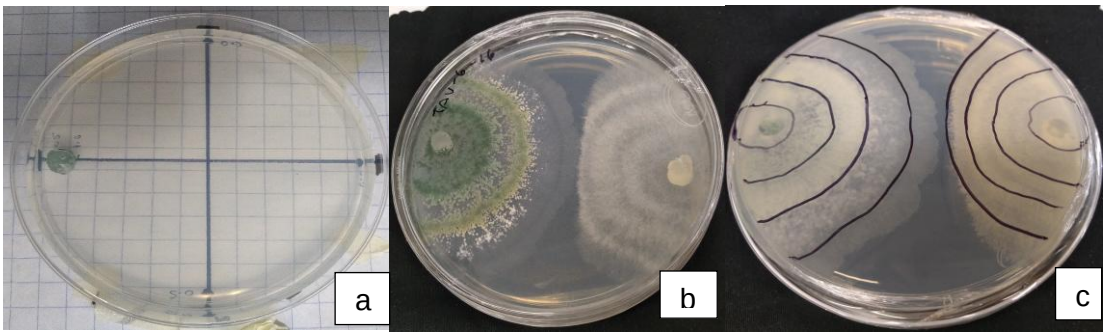


Figura 7. Disposición del antagonista *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* y del fitopatógeno *Rhizoctonia* PB1en cajas Petri con medio PDA para el bioensayo de cultivo dual *in-vitro*, **a)** En sentido opuesto se colocaron los discos de PDA uno con el antagonista y el otro con el fitopatógeno; **b)** crecimiento en cultivo dual de los aislados en estudio (anverso) y **c)** mediciones radiales del crecimiento de los aislados (reverso).

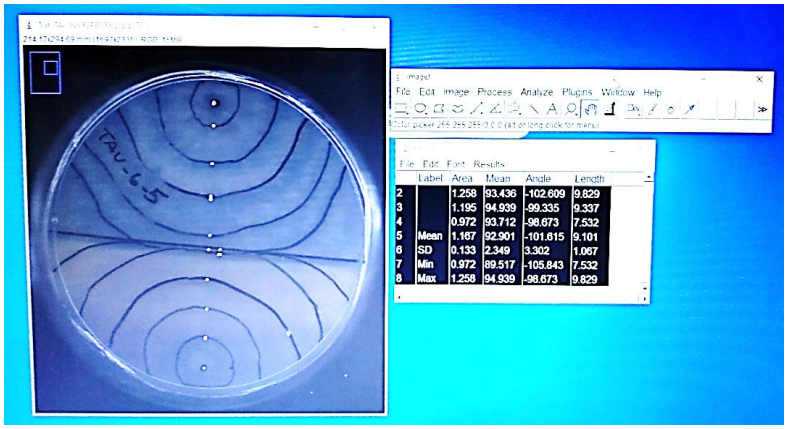


Figura 8. Programa ImageJ (1.48) utilizado para la medición del crecimiento radial de los aislados en cultivo *dual In-Vitro*.

La valoración del antagonismo de *Trichoderma* TAV.6 y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia* PB1 se realizó mediante observación en un microscopio estereoscópico marca ZEISS® 500 con un aumento de 100X tomando como índice de antagonismo la invasión del hongo antagonista sobre el crecimiento del micelio del patógeno utilizando la escala de Bell et al. (1982) y de acuerdo con Acosta et al. (2021) se asignó un valor a cada grado de antagonismo (Cuadro 3). Posteriormente con los datos obtenidos con la escala de Bell (1982) los valores se transformaron para obtener el porcentaje de antagonismo aplicando la fórmula de Townsend y Heuberger (1943) en el cultivo dual.

$$P = \frac{\sum nxv}{CMxN} \times 100$$

Donde:

P= Grado de antagonismo en %

n= Número de cajas Petri de cada categoría

N= Número total de cajas Petri evaluadas

V= Valor numérico de cada categoría

CM= Categoría mayor

Cuadro 3. Escala de evaluación del antagonismo *In-Vitro* tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* sp. (Bell et al.,1982; Acosta et al., 2021)

Grado	Valor (%)	Antagonismo
0	0	Ningún crecimiento de *Trichoderma* spp.
1	100	*Trichoderma* spp. coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno
2	92.05	*Trichoderma* spp. coloniza dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno
3	50	*Trichoderma* spp. y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie de cultivo, ningún hongo domina.
4	7.95	El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de *Trichoderma* spp.
5	0	El fitopatógeno coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre *Trichoderma* spp.

7.8. Diseño del experimento en invernadero

Obtención de plántulas

Para obtener las plántulas se sembraron semillas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) de la variedad Rio Grande® (Seminis Inc.) en cámaras húmedas, después de lavar con abundante agua y detergente para trastes para eliminar el fungicida con el que vienen tratadas, se dejaron secar sobre papel absorbente estéril a 25 ± 2°C. En campana de flujo laminar se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril dejando 2 min en cada paso y se colocaron sobre papel absorbente estéril (Figura 10).

Figura 9. Preparación de semilla para la siembra **a)** Desinfestación de semillas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) y **b)** Establecimiento de semilla en sustrato estéril.

Preparación del sustrato

Como sustrato se utilizó una mezcla de 10 kg de tierra preparada para plantas, Marca: Germinador®-Enraizador Delta®, 10 Lt. de peat moss® Marca: Eco Sustrato® y 10 L. de perlita Marca: Eco Sustrato®. (Jasso, 2012; Vazquez,2020). Se pesaron y colocaron en bolsas de plástico de polietileno 2 kg de suelo, 500 g de peat moss® y 100 g de perlita, la mezcla consistió en aproximadamente 76 % de tierra, 19,1 % de peat moss® y 4,26 % de perlita (Figura 11). El sustrato se esterilizó en autoclave Marca AESA®, Modelo CV 250, 3 calores 127 Volts C.A. a

121°C y 15 lb/in² durante 40 min. Posteriormente, los vasos se llenaron con el sustrato. Cuando se sembraron las radículas, el riego del sustrato se mantuvo a capacidad de campo con agua purificada.

Figura 10. Preparación del sustrato para los tratamientos en invernadero

Obtención de las concentraciones de esporas

Para la obtención de esporas de *Trichoderma* y de propágulos de *Rhizoctonia* utilizó como dispersante de esporas agua destilada estéril con Tween 80 al 1%. Se obtuvo una concentración de esporas agregando 5 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 1% a cajas Petri con esporas de los aislados de *Trichoderma* de 12 días de crecimiento micelial, sobre la superficie de la colonia se realizó un raspado suave con una varilla de Drigalski en L estéril.

La suspensión se colocó en un vaso de precipitado estéril, para retirar los excesos de micelio se utilizó gasa simple estéril para colar los excesos de micelio. Se obtuvo una concentración madre y posteriormente se ajustaron las dos concentraciones de esporas agregando agua destilada estéril con Tween 80 al 1%. Para determinar la concentración de esporas contenida en las suspensiones se realizó un conteo de las esporas con una cámara de Neubauer Loptik Labor =.100mm, 0.0025 profundidad (Troya y Vaca, 2014) (Figura 12).

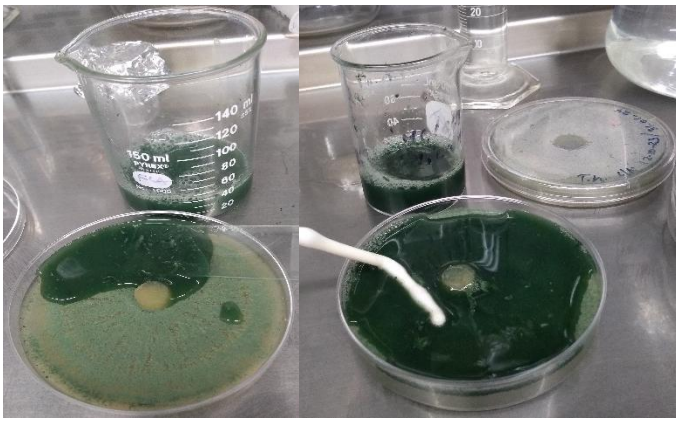


Figura 11. Suspensión de esporas de los aislados de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* con agua destilada estéril y Tween 80 al 1%

Obtención del inóculo de Rhizoctonia *solani* PB1

Para obtener el inóculo de *Rhizoctonia* PB1, se tomaron cajas Petri cubiertas con micelio de 8 días de crecimiento micelial en medio PDA, se raspó superficialmente, trituró y homogenizó por un minuto en 10 mL de agua destilada estéril utilizando un triturador Moulinex obteniendo una suspensión de micelio (propágulos). Se obtuvo el número de propágulos/mL utilizando para el conteo una cámara de Neubauer con las especificaciones arriba mencionadas (Figura 12).

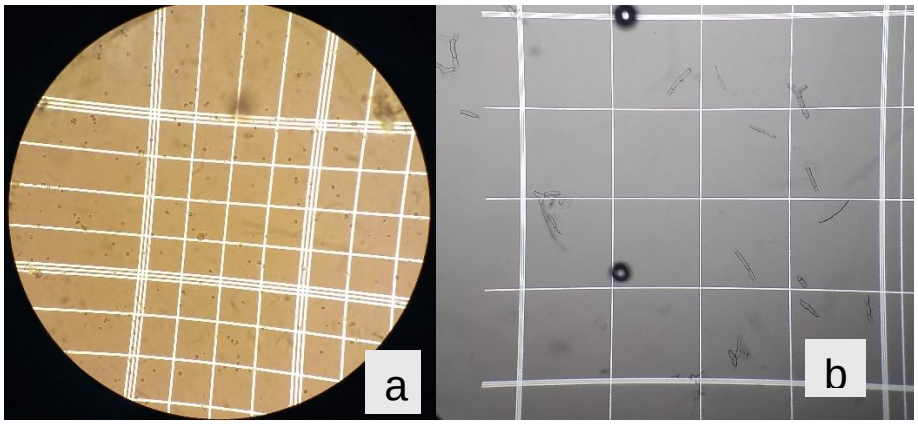


Figura 12 Conteo en cámara de Neubahuer de esporas de los aislados de *Trichoderma* y de propágulos de *Rhizoctonia* PB1 bajo microscopio óptico **a)** esporas de *Trichoderma* y **b)** Propágulos de *R. solani* PB1

Distribución de los tratamientos en invernadero

En invernadero, el diseño experimental consistió en 10 tratamientos con 20 vasos de unicel 4J4R con capacidad de 4 0z (118 mL) conteniendo una plántula para cada repetición (Figura 9), distribuidos en un diseño completamente al azar. Cada vaso se consideró como una unidad experimental más 19 repeticiones (Cuadro 4). Las plantas se dispusieron a 24 ± 2°C, humedad relativa de 80±4 y fotoperiodo de 12:12 h luz.

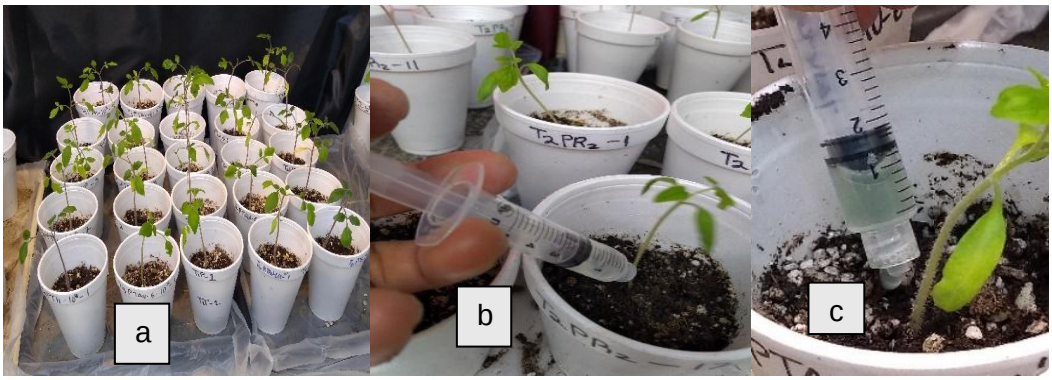


Figura 13. Disposición de tratamientos e inoculación de los aislados de *Trichoderma* y de *Rhizoctonia* PB1 **a)** Plántula de jitomate como tratamiento **b)** inoculación de plántulas con *Rhizoctonia* PB1 y **c)** Inoculación de plántulas con *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum.*

Cuadro 4. Tratamientos de los aislados de *Rhizoctonia* PB1, *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* para evaluar en forma curativa sobre plántulas de jitomate *S. lycopersicum* L. en invernadero.

Tratamiento	Inóculo	Dosis/2mL Esporas/mL (e/mL) Propágulos/mL (p/mL)	N
T1	Plántula sola		20
T2	*Rhizoctonia* PB1	($5.4x10^5$) p/mL	20
T3	*Trichoderma* TAV-6	($8.9x10^7$) e/mL	20
T4	*Trichoderma* TAV-6	($1.3x10^9$) e/mL	20
T5	*T. harzianum*.	($2.2x10^7$) e/mL	20
T6	*T. harzianum*	($6.6x10^9$) e/mL	20
T7	*Trichoderma TAV-6* + *Rhizoctonia* PB1	($8.9x10^7$) e/mL + ($5.4x10^5$) p/mL	20
T8	*Trichoderma TAV-6* + *Rhizoctonia* PB1	($1.3x10^9$) e/mL + ($5.4x10^5$) p/mL	20
T9	*T. harzianum* + *Rhizoctonia* PB1	($2.2x10^7$) e/mL + ($5.4x10^5$) p/mL	20
T10	*T. harzianum* + *Rhizoctonia* PB1	($6.6x10^9$) e/mL + ($5.4 x10^5$) p/mL	20

Se aplicaron en los tratamientos respectivos de forma curativa una suspensión de 2 mL de cada aislado de *T.asperellum* TAV-6, *T. harzianum* a dos diferentes concentraciones de esporas y *R. solani* PB1 a una concentración única de propágulos en la base del tallo de la plántula de jitomate (*S. lycopersicum* L.).

7.9. Estimación de la incidencia y severidad de *Rhizoctonia solani* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.)

Para estimar la incidencia se tomaron datos de las observaciones diarias del estado de las plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) después de 2 días de la inoculación con *Trichoderma TAV-6, T. harzianium*© y *Rhizoctonia* PB1 por un periodo de tres semanas. Para la evaluación de la incidencia se utilizó la fórmula de Rivera y Wright (2020):

$$I = \frac{A}{a} x100$$

Donde:
I = Incidencia
A= número de plantas enfermas en el tratamiento
a= Número de plantas totales muestreadas

Para estimar la severidad de la Pudrición Café ocasionada por *Rhizoctonia* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) (Figura 14), se utilizó la escala cualitativa ordinal de virulencia (severidad) de Montealegre et al. (2003).

Cabe mencionar que para este trabajo se modificó esta tabla de severidad (Cuadro 5) y se aplicó a una escala visual, nominal ordinaria con las plantas de los tratamientos inoculados con *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* y *Rhizoctonia* PB1 (Cuadro 6).

Figura 14. Afectación basal del tallo con Pudrición Café ocasionado por *R. solani* PB1 en plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) **a)** en planta y **b)** Daño a nivel de tallo

Cuadro 5 Escala de severidad por el daño de *Rhizoctonia* PB1. sobre plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L). Modificada de Montealegre et al. (2003).

Nivel	% de daño en el talluelo
0	Sin daño
1	1 a 10
2	10 a 20
3	20 a 30
4	30 a 40
5	40 a 50 (Muerte de planta)

Cuadro 6. Escala visual nominal ordinaria para evaluar la severidad de la Pudrición Café en plantas de jitomate *S. lycopersicum* L. con *Rhizoctonia* PB1 e inoculo de *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* en forma curativa. (Elaboración propia)

Clase	Descripción	Imagen
0	Planta sana, hojas turgentes de color verde intenso, con 4 a 5 foliolos, tallo erguido, sistema radical sano y abundante, no se observa necrosis en base de tallos ni en raíz	
1	Planta con marchitez leve, hojas encorvadas, con 3-4 foliolos, poco turgentes, tallo sin necrosis visible en la zona basal	
2	Planta con marchitez moderada, hojas encorvadas, con 2-4 foliolos poco turgentes, tallo erguido, sin necrosis visible	
3	Marchitez avanzada. Hojas encorvadas poco turgentes, con 2-3 foliolos, tallo con necrosis visible, pérdida de raíces y deterioro de haces vasculares. Crecimiento detenido	
4	Marchitez muy avanzada. Hojas muy enrolladas, no turgentes, con 1 foliolo se observa lesión en tallo basal, tallo caído.	
5	Marchitez severa. Hojas secas, lesión en tallo color café, con apariencia húmeda, tallo caído	

Para obtener el porcentaje de severidad se utilizó la escala de Montealegre et al. (2003) modificada y los datos obtenidos se transformaron aplicando la fórmula de Townsend y Heuberger (1943).

$$P = \frac{\sum nxv}{CMxN} \times 100$$

Donde:

P= Grado de severidad en %
n= Número de plantas de cada categoría
N= Número total de plántulas
V= Valor numérico de cada categoría
CM= Categoría mayor

7.10. Evaluación del crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum*). por efecto de *Trichoderma asperellum TAV-6 y T. harzianum* en invernadero

Antes de inocular los aislados de *Trichoderma* y *Rhizoctonia* PB1 después de15 días de germinada la semilla se midió la altura y diámetro del tallo, se contó el número de foliolos y de hojas. Posterior a la aplicación de los tratamientos se realizaron estas mediciones y conteos de la plántula en estudio por un periodo de tres semanas. Para medir la altura del tallo se utilizó una regla metálica graduada. El diámetro del tallo se midió utilizando un Vernier digital S/M, con resolución de 0.1 mm/0.01” y precisión de ±2 mm/0.01” (Figura 15). Al término de este periodo, se procedió a retirar el sustrato de las plantas con lavados de agua potable y se retiró el exceso de agua con papel absorbente. Para obtener el peso fresco y seco, se utilizó una balanza analítica Marca OHAUS® EXPLORER. Para obtener el peso seco se colocaron las plantas en papel absorbente y se colocaron en una estufa de calentamiento a 50°C por dos días y posteriormente se pesó en balanza analítica el peso total de la planta y por separado el peso de foliolos, tallo y raíz (Medellín, 2015).

Figura 15. Evaluación del efecto de *Trichoderma* TAV-6 *y T. harzianum* en el crecimiento de plántulas de jitomate**. a)** Medición del diámetro del tallo; **b)** Medición de altura del tallo; **c)** obtención de peso fresco y seco en balanza analítica y **d)** Corte del tallo, hoja y raíz de la planta.

7.11 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental para el cultivo dual *In-Vitro* fue completamente al azar, con cinco tratamientos. En cada tratamiento se consideró a una caja Petri con medio PDA como unidad experimental más 14 repeticiones.

En invernadero *In-Vivo* el diseño experimental fue completamente al azar, se utilizó un vaso de unicel de 12 Oz (355 mL) conteniendo una plántula con 50 gr de sustrato considerando ésta como una unidad experimental más 19 repeticiones.

La aplicación en forma curativa del concentrado de esporas de los aislados nativo y comercial de *Trichoderma* se realizó vía “Drench” en la base del tallo de la plántula de jitomate (*S. lycopersucum* L.), se aplicaron 2 mL de suspensión de esporas, a dos concentraciones diferentes de suspensión de esporas, para *T. asperellum* TAV-6 se utilizaron (8.9×10^7 y 1.3×10^9) esporas/mL y para *T. harzianum* (2.2×10^7 y 6.6×10^9) esporas/mL y para el fitopatógeno de *R. solani* PB1 se utilizó una suspensión única de (5.4×10^5) propágulos/mL en los tratamientos correspondientes.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con prueba no paramétrica en rangos de Kruskall-Wallis y comparación de medias por el método de Tukey $P<0.05$ en el programa SIGMAPLOT® versión14.0

VIII. RESULTADOS

8.1. Recuperación y activación del material biológico en estudio

Se recuperaron y activaron los aislados de los antagonistas *Trichoderma* TAV-6, *T. harzianum* y del fitopatógeno *Rhizoctonia* PB1 El medio PDA (papa-dextrosa-agar).

8.2. Identificación cultural y morfológica de los aislados de estudio

Se realizó la identificación cultural y morfológica de las cepas de acuerdo con la coloración de las conidias, el arreglo en la forma de crecimiento micelial y la observación de las estructuras a nivel microscópico utilizando las claves de Bisset, (1991); Barnett y Hunter (1998); Samuels et al. (2006) (Figura 16y 17).

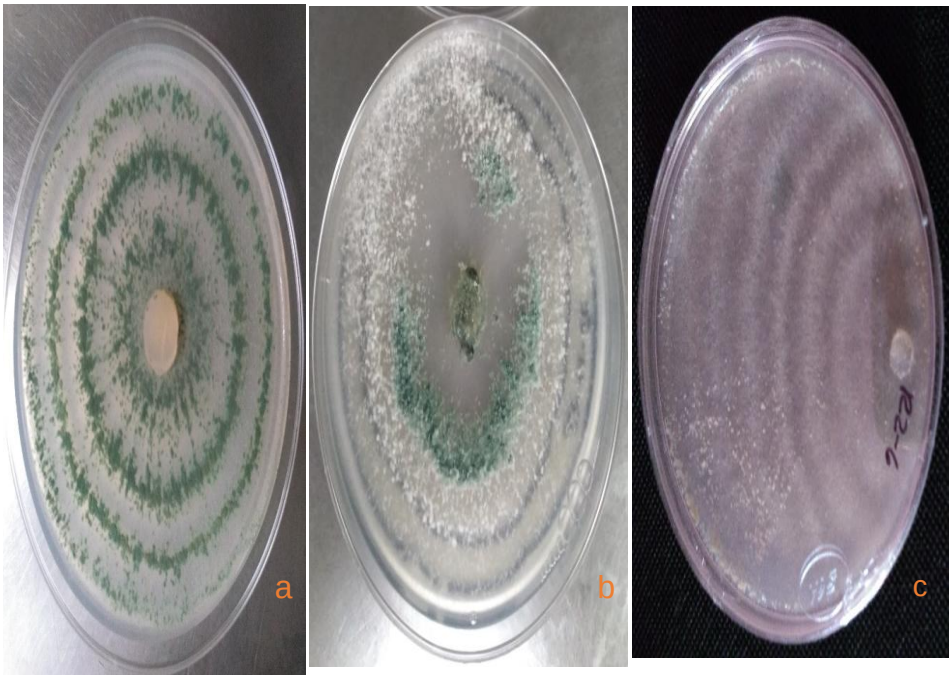
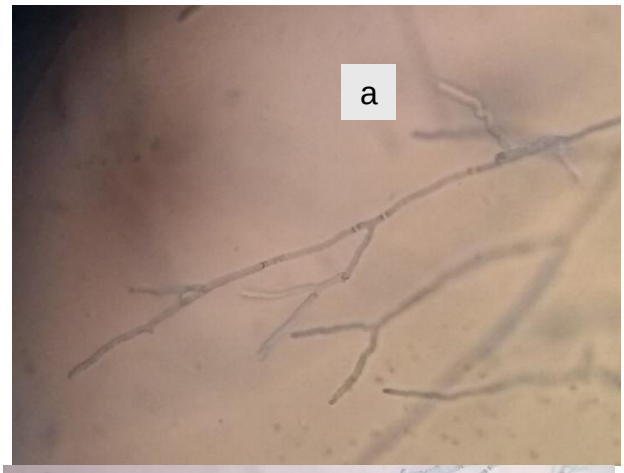
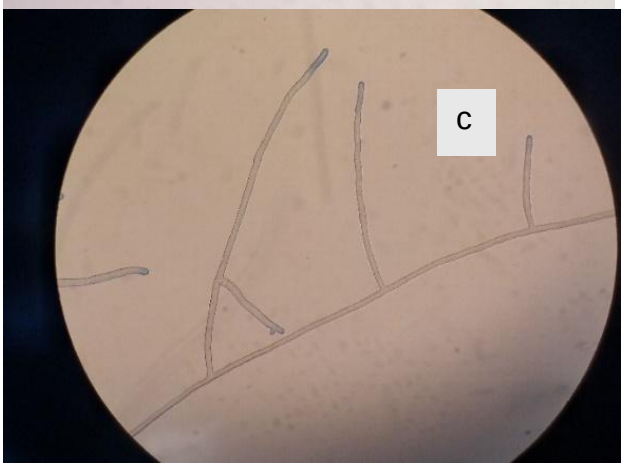


Figura 16. Identificación cultural de los aislados **a)** *Trichoderma* TAV-6; **b)** *T. harzianum* y **c)** *Rhizoctonia* PB1



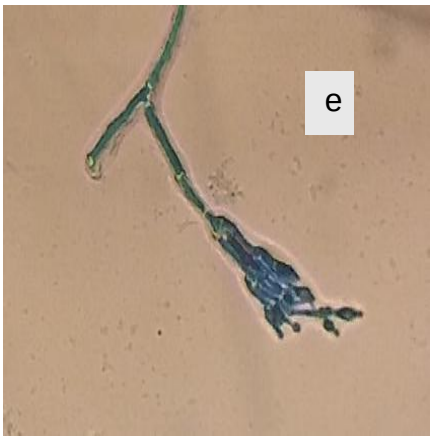
a) Hifas de *Trichoderma* TAV-6

b) Hifas de *Trichoderma harzianum*



c) Hifas de *Rhizoctonia* PB1

d) Conidióforos, fiálides y conidias de *Trichoderma* TAV-6.



e) Conidióforos, fiálides y conidias de *Trichoderma harzianum*

Figura 17. Identificación morfológica de los aislados de **a)** *Trichoderma* TAV-6; **b)** *T. harzianum* y **c)** *Rhizoctonia* PB1

8.3. Pruebas de patogenicidad de *Rhizoctonia solani* PB1

La prueba de patogenicidad consistió en inocular tubérculos de papa con *Rhizoctonia* PB1. Después de 10 días se tomaron muestras de 0.5 a 1 cm del área inoculada, desinfectando con hipoclorito de sodio al 2% y 3 enjuagues con agua destilada estéril, por 2 minutos en cada paso. Después de 2 días se observó al microscopio óptico micelio del crecimiento de las colonias sembradas observando el micelio característico de *Rhizoctonia* PB1 por lo que se corroboró la patogenicidad de *Rhizoctonia* PB1 en estos nuevos aislados (Figura 18).

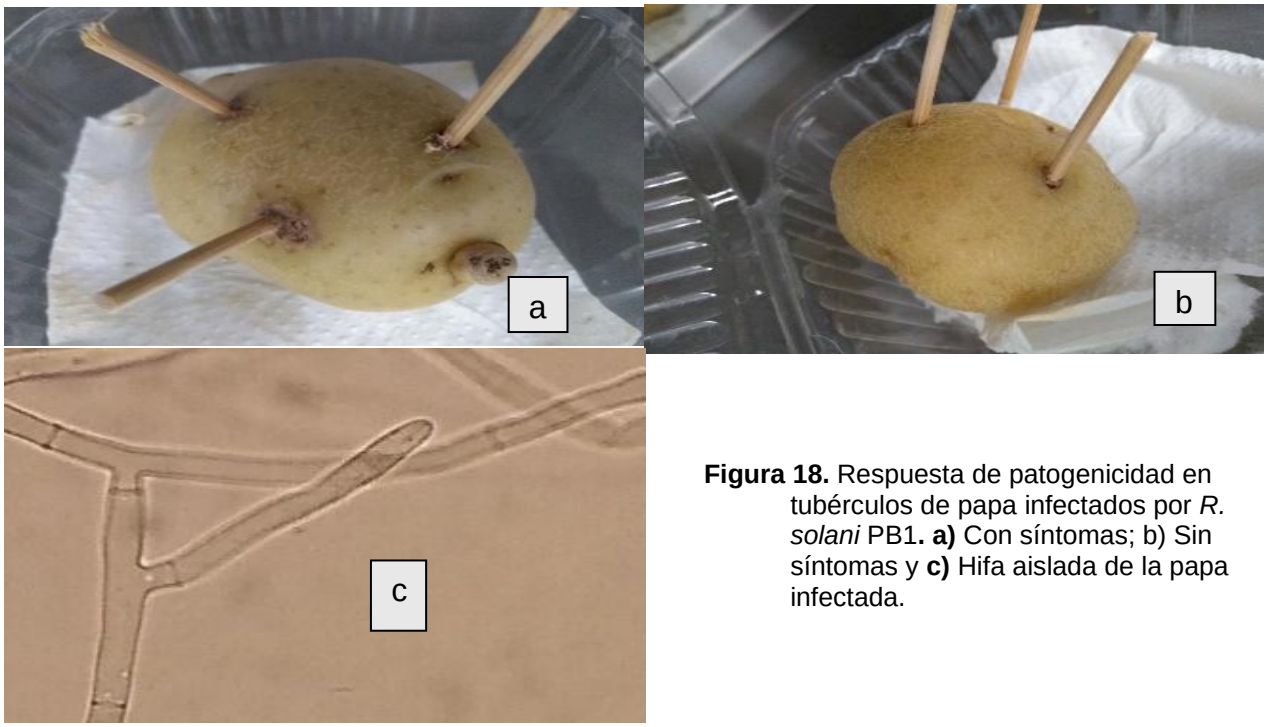


Figura 18. Respuesta de patogenicidad en tubérculos de papa infectados por *R. solani* PB1**. a)** Con síntomas; b) Sin síntomas y **c)** Hifa aislada de la papa infectada.

8.4. Tipificación molecular de *Trichoderma* TAV-6 y *Rhizoctonia* PB1

Las secuencias del ADN de los aislados nativos de *Trichoderma* TAV-6 y de *Rhizoctonia* PB1 obtenidas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM fueron etiquetadas con la clave numérica 13454 para *Trichoderma* TAV-6 identificada por Factor de Elongación y 13456 *Trichoderma* TAV-6 identificada por Espacio Transcrito Interno (ITS) por sus siglas en inglés.

La clave para el fitopatógeno *Rhizoctonia* PB1 identificado por Espacio Transcrito Interno (ITS), fue 13460. Las tres secuencias fueron transformadas formato FASTA por el programa bioinformático BIOEDIT. Las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

>13454 Trichoderma TAV-6 (factor de elongación)

ATSGAYGTATCGTAGTTGCAATCCCTTTCTTCCCACCAGCGGCATTCTCT
CTGCCGTTGCCTGCGAATGACATTGTGCTGACCATCATCGTCTCTAGGGG
TTCGTATTTCTCCGGCAATCTGCTTTCGATCGACTCTAATACTGACTTGC
TACAACAGCCACGTCGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAATATCCA
ATTCCTCGAGCACCCTCTGCTATCGACTCTGTCGGGCAGCGCGGGGCAAC
TTGATTGTAGCAACATCCAGCTAACGTTTTTCCCAATAGACTGGTCACTT
GATCTACCAGTGCGGTGGTATTGACAAGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGA
AGGTAAGCTCATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAGTCATAT
GCCCGACAATTCTGCTCTCAGTTTTTGTCTTTTTTTTCCAGCGTCACCCC
GCTTTGCCAGTCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTTCTGGC
TGCCTTGTTTGGCTTTTAGTGGGGTGTCAAATTTTTTGGCAGCAACCCCG
CTATCGCCACTGCACCTCTTCCATCACCCACCACATGCTATTTGCTCAAT
CGCGTCGTCTTTTTTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGA
AGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACA
AGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGG
AAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGAC
TCTTCTCTCTAGCTATCGACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACATGCTCTT
CCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTCATCAAGAACATGTAKKGGGG
GRCYYYYMMMA

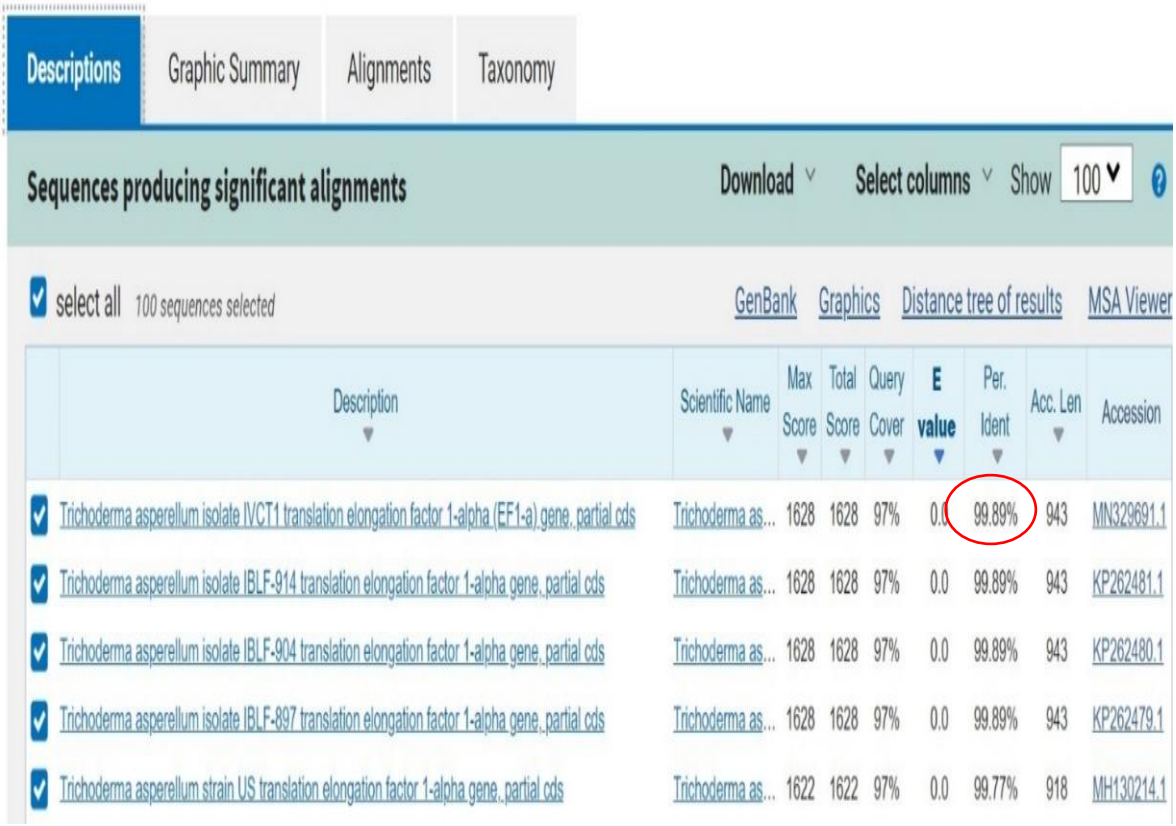
>13456 Trichoderma TAV-6 (ITS)

GSCTCGRGCTYACTCCCAACCCAATGTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCG
GCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCG
GAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTT
ACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAA
CCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCG
GCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTT
TGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCA
ACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGAA

>13460 Rhizoctonia PB1 (ITS)

CCCCTGCATCTATGCAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCTATTTATTTAGGCA
TGTGCACACCTCCCTCTTTCATCCCACACACACCTGTGAACTTGTGAGAC
AGTTGGGGAATTTATTTGTTATTWTTTGTAATAAAATGATAATAAGTCAT
TGAACCCTTCTGTCTACTCAACTCATATAMAMTCAATTTATTTTAAATGA
ATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTG
GTATTCCTTGGAGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAATCAA
TCTTTTTGTTAACTCAATTAGTTTGATTTTGGTATTGGAGGTCTTTTGCA
GCTTCACACCTGCTCCTCTTTGTGTATTAGCTGGATCTCAGTGTTATGCT
TGGTTCCACTCAGCGTGATAAATTATCTATCGCTGAGGACACTGTAAAAA
GTGGCCAAGGTAAATGCAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGG
ACACTATTATTATGATCTGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC
TTWAGCATATCAATAAWYSGRRRGARRGRRGGGRA

Al analizar la secuencia de *Trichoderma* TAV-6 en el Gen-Bank del NCBI por factor de elongación 1-α (Fl- α) se obtuvo una identidad de 99.89% con el género y especie de *Trichoderma asperellum* (Figura 19) y la secuencia mediante ITS (Región Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal mostró una identidad del 100% con *Trichoderma* y un 99.82% con *T. asperellum* (Figura 20).



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trichoderma asperellum isolate IVCT1 translation elongation factor 1-alpha (EF1-a) gene, partial cds	Trichoderma as...	1628	1628	97%	0.0	99.89%	943	MN329691.1
Trichoderma asperellum isolate IBLF-914 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	Trichoderma as...	1628	1628	97%	0.0	99.89%	943	KP262481.1
Trichoderma asperellum isolate IBLF-904 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	Trichoderma as...	1628	1628	97%	0.0	99.89%	943	KP262480.1
Trichoderma asperellum isolate IBLF-897 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	Trichoderma as...	1628	1628	97%	0.0	99.89%	943	KP262479.1
Trichoderma asperellum strain US translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	Trichoderma as...	1622	1622	97%	0.0	99.77%	918	MH130214.1

Figura 19. Porcentaje de identidad para *Trichoderma* TAV-6 en el Blast Gen-Bank mediante el Factor de Elongación 1-Alfa (EF1- α)

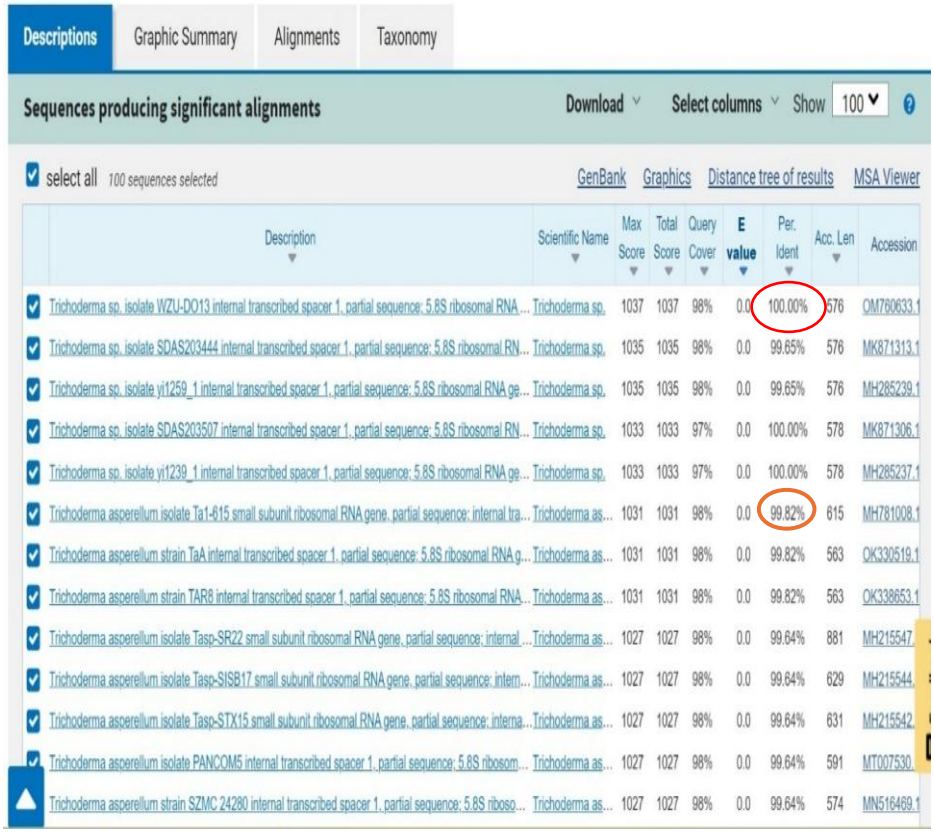


Figura 20. Porcentaje de identidad para *Trichoderma* TAV-6 en el Blast Gen-Bank del NCBI mediante la región ITS 5.8S ribosomal RNA.

El análisis realizado por ITS (Internal Transcribed Spacer) 5.8S del ADN ribosomal para el aislado del fitopatógeno *Rhizoctonia* PB1 mostró una identidad de 98.94% con *Rhizoctonia solani* Kühn y 99.24% con *Thanatephorus cucumeris* anamorfo *R. solani* (Figura 21).

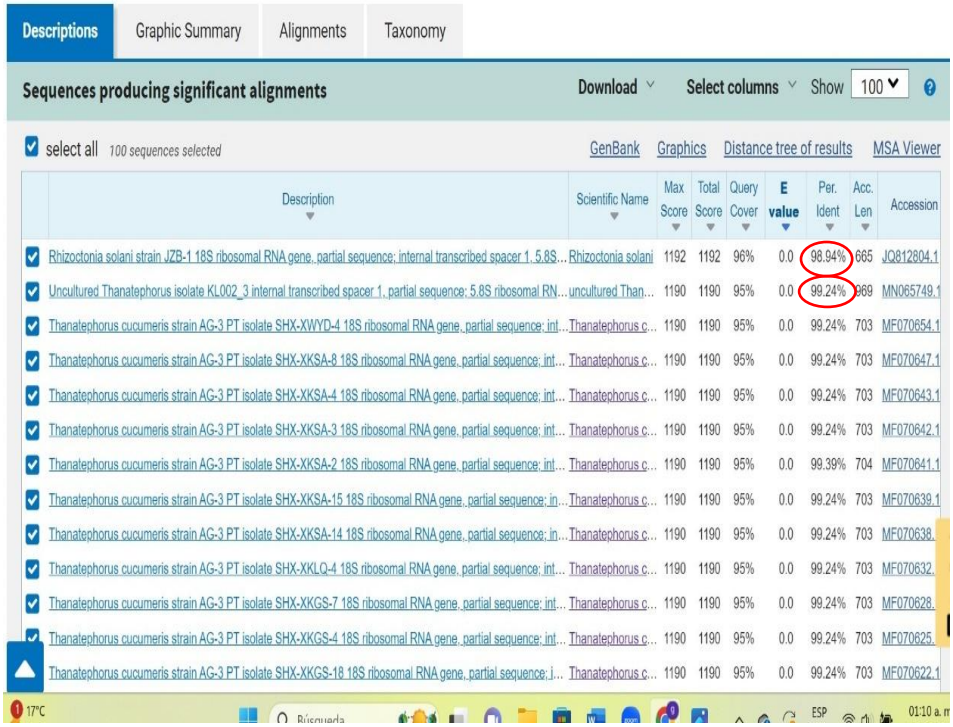


Figura 21. Porcentaje de identidad de *Rhizoctonia* PB1 en el Blast Gen-Bank.

Mediante software específicos como CLUSTAL X2 (Larkin et al., 2007) para el alineamiento de secuencias y SEAVIEW (Galtier et al., 1996) para la edición y elaboración de cladogramas, se analizaron las similitudes de las secuencias obtenidas de las cepas de *Trichoderma asperellum* TAV-6 con secuencias registradas en el Geen-Bank del NCBI. Por factor de elongación (F-1α) se observó similitud con la mayoría de las cepas ubicadas en los clados centrales del cladograma (Figura 22).

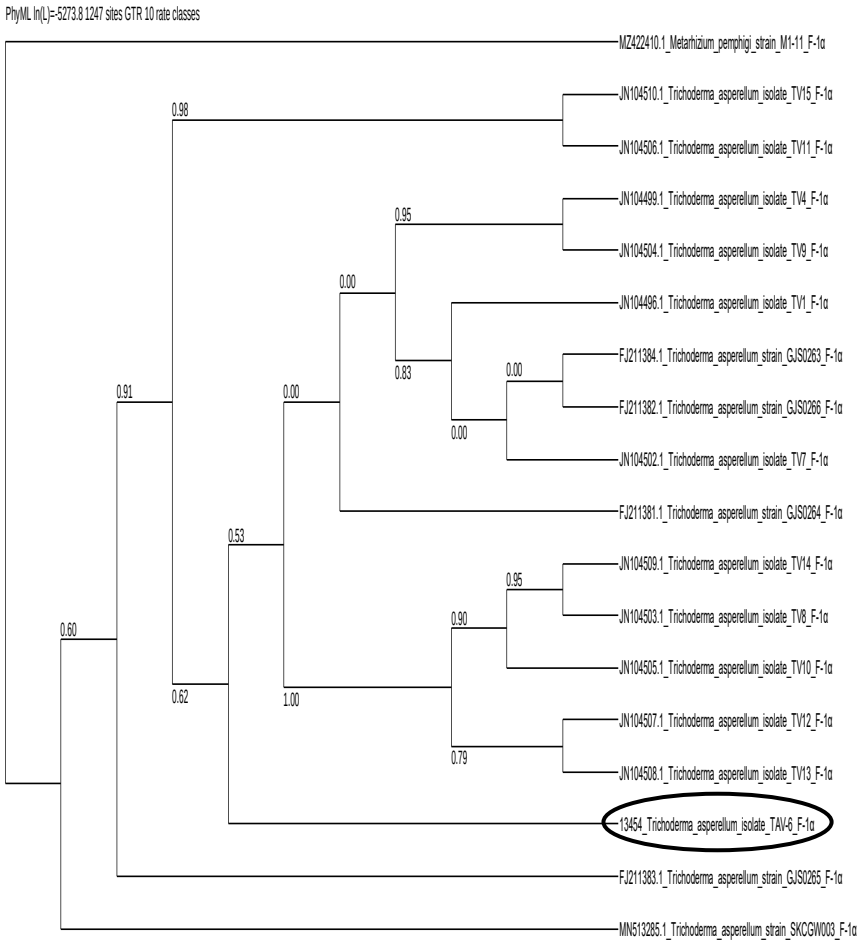


Figura 22. Cladograma del aislado de *Trichoderma asperellum* TAV-6 identificado por el factor de elongación 1 Alpha (F-1α). Realizado con alineamiento MUSCLE en formato Phy, calculando distancias por pares, analizado por el criterio de evolución mínima de máxima verosimilitud, modelo evolutivo de GTR (General Time Reversible) con 500 réplicas y en el programa SEAVIEW

y por ITS (Espacio Transcrito Interno) del ADNr, se observó similitud con el aislado JN004179.1 de *T. asperellum* NBAII-Ta36 y se encuentra relacionado a su vez con aislados del mismo género y especie. Por lo que se confirma que este aislado nativo utilizado en este trabajo de investigación corresponde a *T. asperellum* (Figura 23).

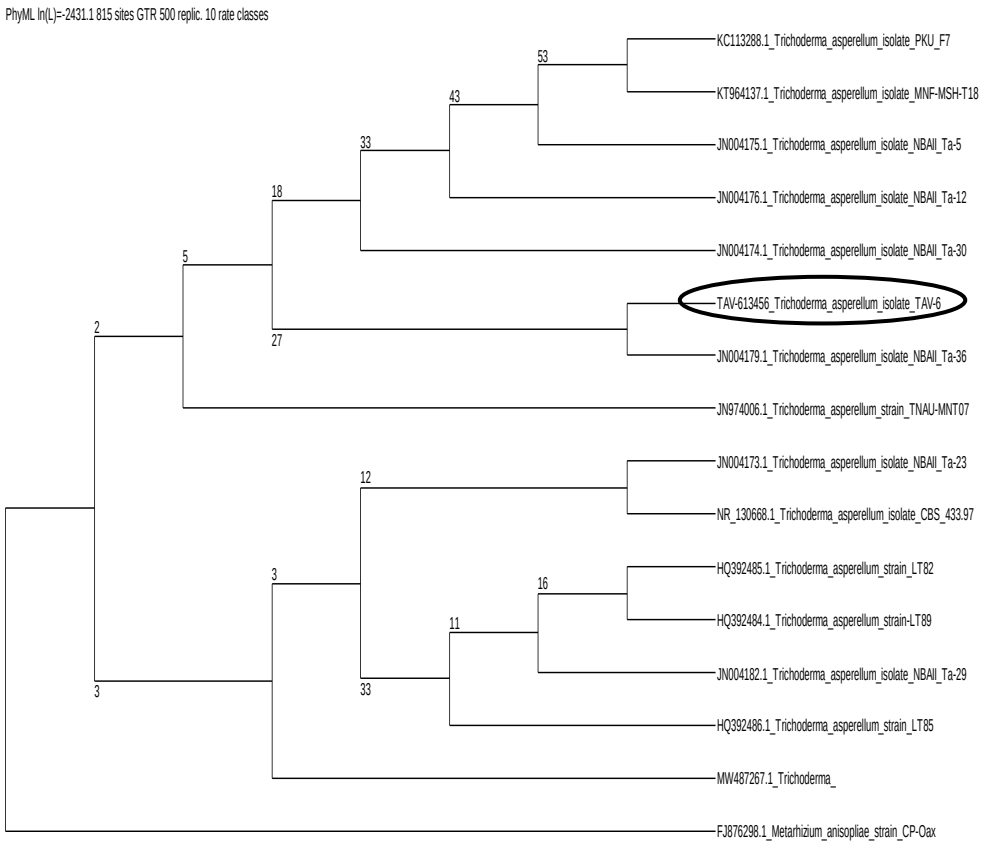


Figura 23. Cladograma del aislado de *Trichoderma asperellum* TAV-6 identificado por ITS (Espacio Transcrito Interno). Realizado con alineamiento MUSCLE en formato Phy, calculando distancias por pares, analizado por el criterio de evolución mínima de máxima verosimilitud, BioNJ, modelo evolutivo de GTR (General Time Reversible), 10 rangos de clases, 500 réplicas, en el programa SEAVIEW

De igual forma, se observó similitud evolutiva de *R. solani* PB1 con otros aislados registrados en el Geen-Bank del NCBI, se observa afinidad con la cepa AG4, emparentada con plantas de la familia *Solanaceae* (Figura 24).

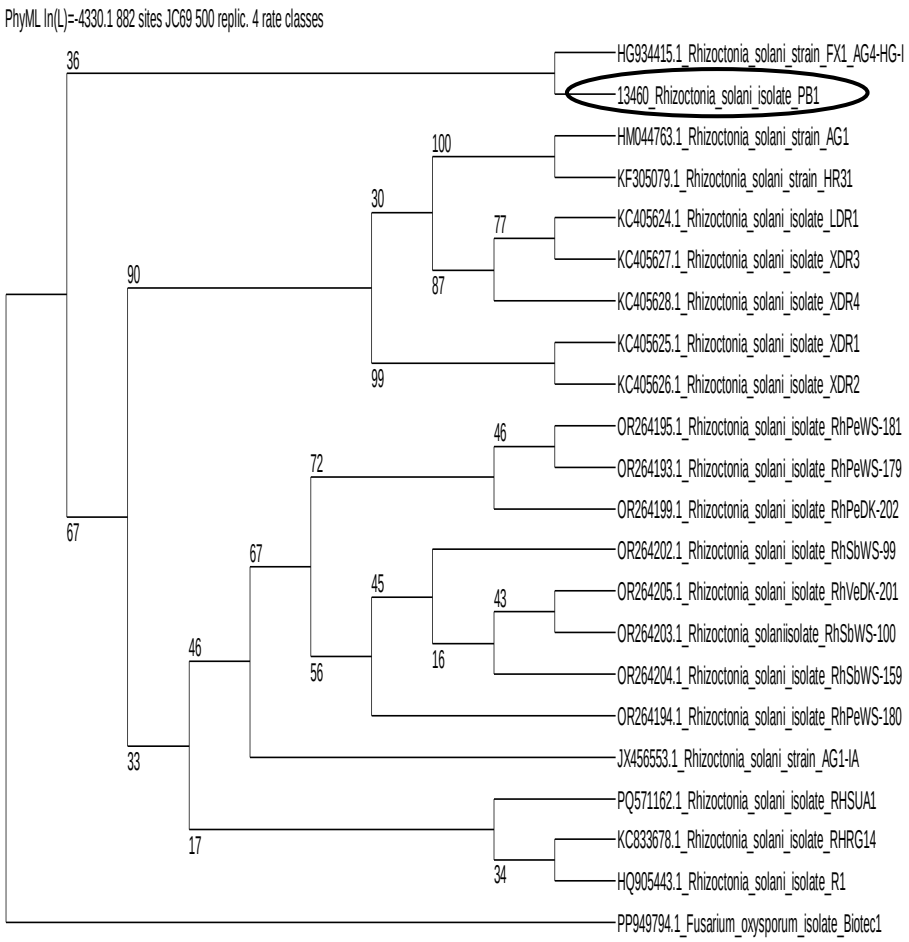


Figura 24. Cladograma del aislado de *Rhizoctonia solani* PB1. Realizado con alineamiento de secuencias MUSCLE, formato Phy, analizado por el criterio de evolución mínima de máxima verosimilitud, modelo evolutivo de Jukes Cantor 69, con 500 réplicas y en el programa SEAVIEW.

8.5. Evaluación de la actividad antagónica de *Trichoderma asperellun TAV-6* y T*. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani PB1* en cultivo dual *in-vitro*

Los aislados utilizados de *T. asperellum TAV-6 y T. harzianum* limitaron al 100% el crecimiento de *R. solani* PB1 en medio de cultivo PDA, cinco días después de la inoculación, el micelio de los aislados de *Trichoderma* se unieron con el micelio del *R. solani*, a los nueve días la colonización del antagonista cubrió el 100% de la

superficie de placa, e invadió las estructuras del micelio de *R. solani* a los 12 días se observó la formación de cuerpos fructíferos y desarrolló esporas, finalmente a los 14 días se observó la desintegración total del micelio del fitopatógeno invadido. De acuerdo con la escala de Bell et al, (1982), tanto *Trichoderma* TAV-6 como *T. harzianum* presentaron el grado 2 de antagonismo frente a *Rhizoctonia* PB1, con un valor del 92.05 %. En este grado, el antagonista colonizó dos terceras partes de la superficie de la caja Petri limitando el avance en el crecimiento del fitopatógeno. (Figura 25,26 y 27).

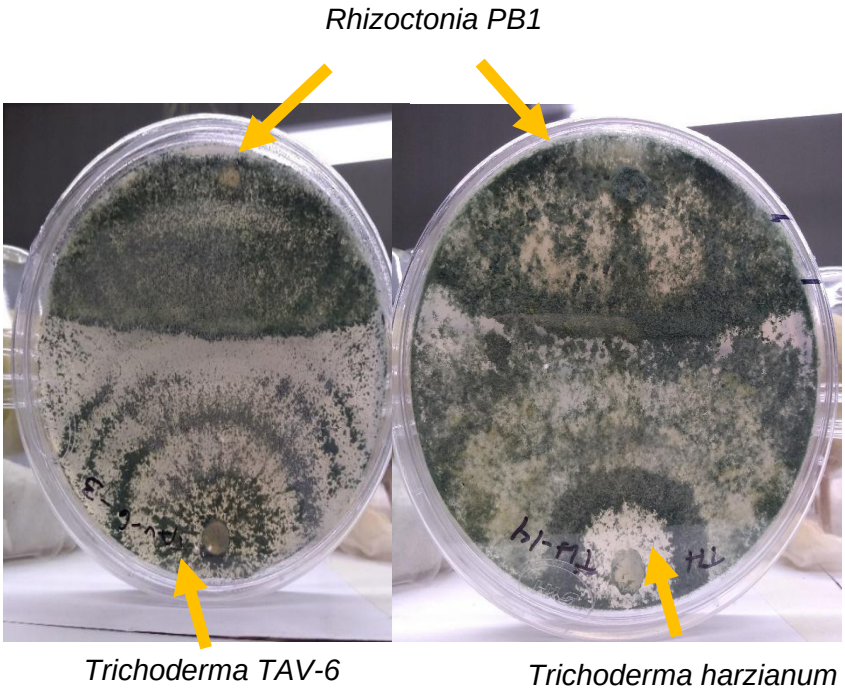


Figura 25. Antagonismo de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1.

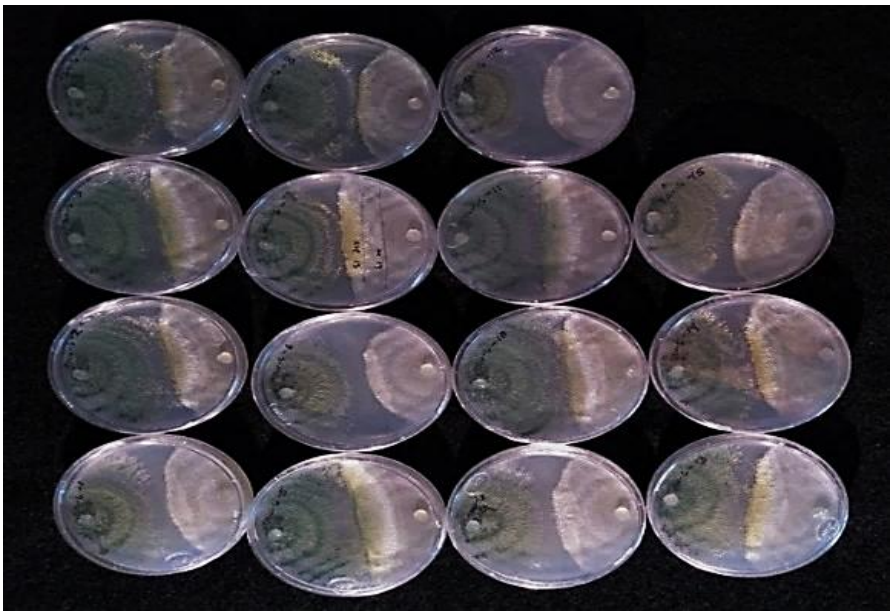


Figura 26. Actividad antagónica en cultivo dual *in vitro* de *Trichoderma* TAV-6 con *Rhizoctonia* PB1

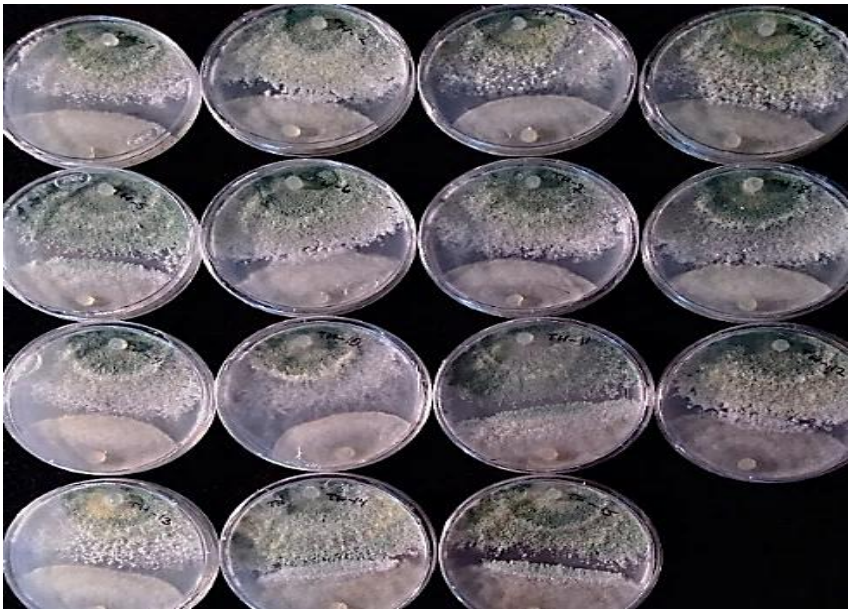


Figura 27. Actividad antagónica en cultivo dual *in vitro* de *Trichoderma harzianum* con *Rhizoctonia* PB1

Micoparasitismo

En este trabajo se estimó el micoparasitismo de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual con base en el área de crecimiento micelial radial en medio PDA. El mayor porcentaje de crecimiento micelial radial (PCMR) fue de *T. harzianum* (30.10%) y el menor (21.69%) de *T. asperellum* TAV-6 en contraste con el crecimiento y desarrollo del micelio de *R. solani* PB1 (figura 28).

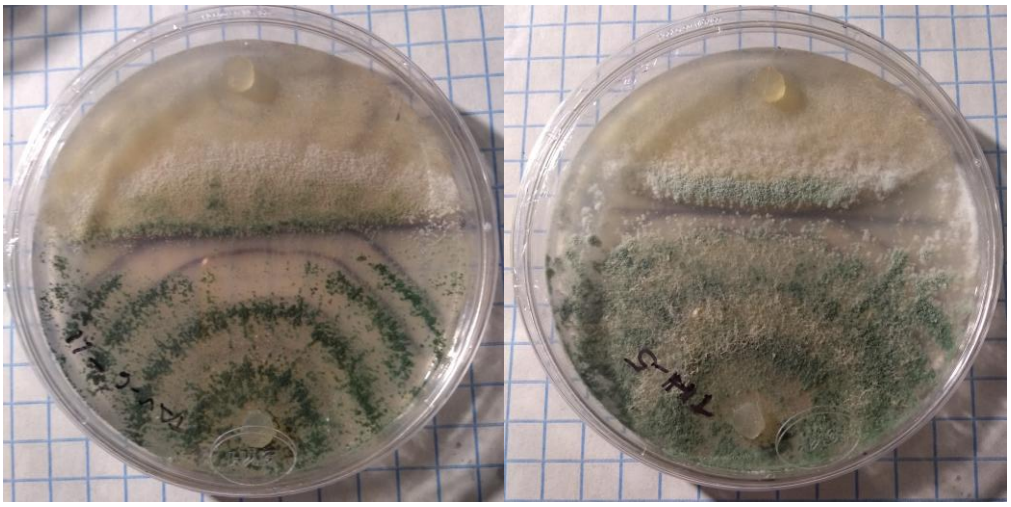


Figura 28. Micoparasitismo de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual *in vitro*. **a)** *T. asperellum* TAV-6 y **b)** *T. harzianum*

Así mismo, con microscopio óptico, se observó el micoparasitismo en sus diferentes etapas de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 que corresponden a 4 etapas: 1) Crecimiento quimiotrófico; 2) Reconocimiento; 3) Adhesión y enrollamiento y 4) Degradación de hifas por efecto de la liberación de enzimas (Figura 29).

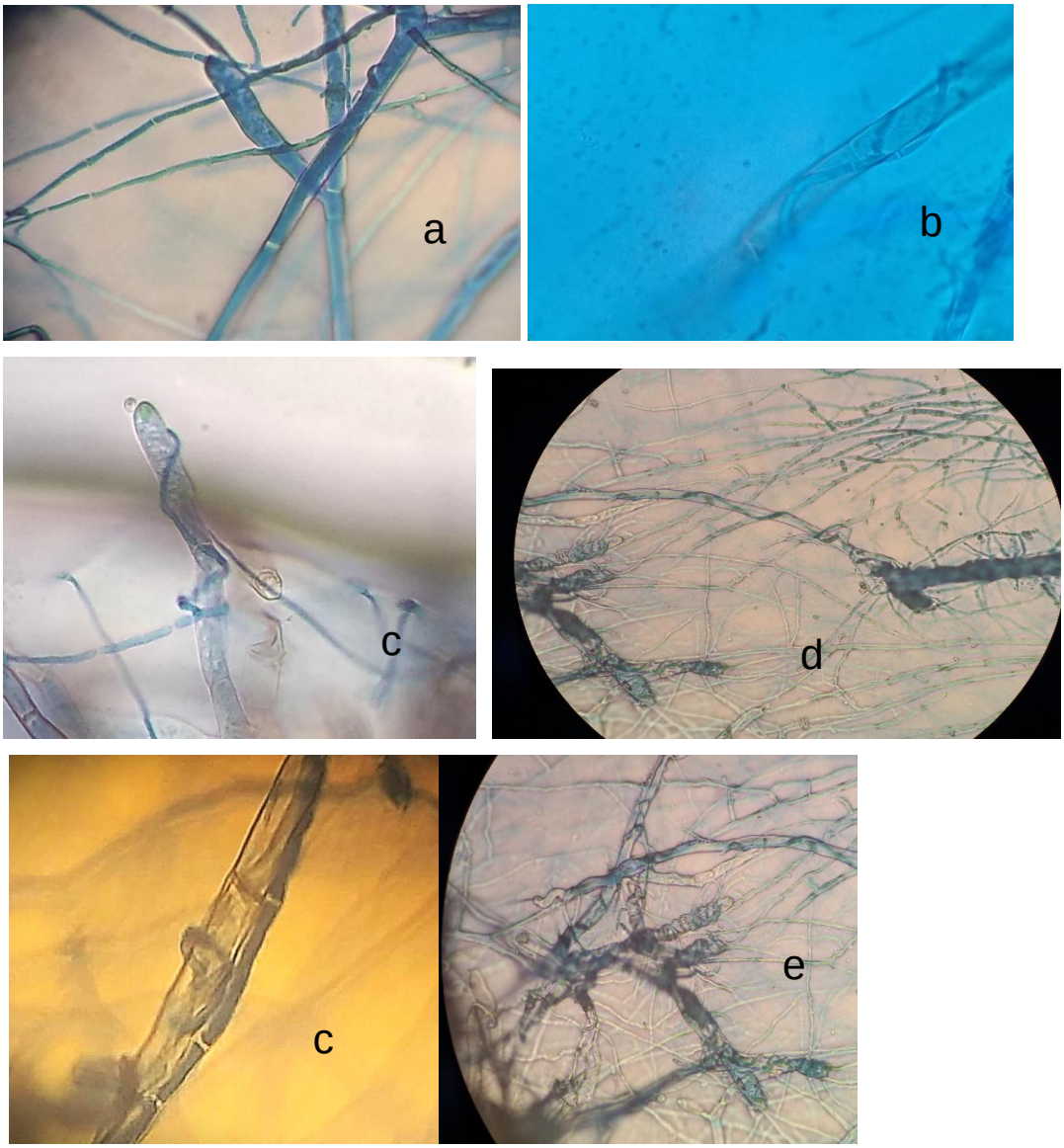


Figura 29. Proceso de micoparasitismo *Trichoderma* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia* PB1. **a**) Reconocimiento de hifas; **b**) Adhesión de hifas; **c**) Penetración y enrollamiento de hifas; **d**) Colonización de hifas y **e**) Destrucción de hifas del fitopatógeno por el antagonista.

Antibiosis

En la actividad antagónica por antibiosis de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1, se observaron hifas del fitopatógeno *R. solani* PB1 a través del microscopio óptico con deterioro debido a la presencia de hifas de las cepas de *Trichoderma* en estudio. (Figura 30).

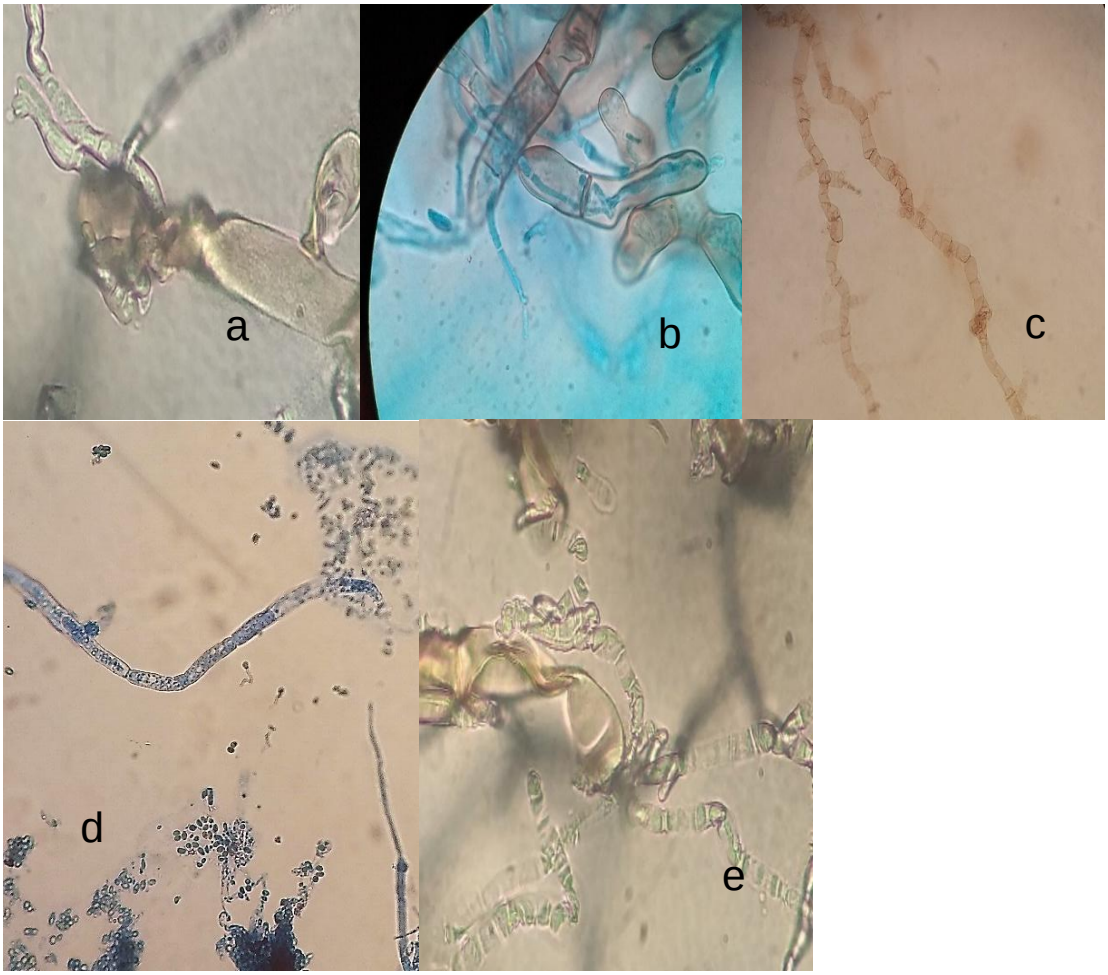


Figura 30. Actividad de antibiosis por *Trichoderma asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre hifas de *R. solani* PB1. En **a**, **b**, **c**, **d** y **e** se observa degradación de hifas por efecto de liberación de metabolitos antifúngicos de las especies de *Trichoderma*.

Competencia por espacio y nutrientes

El crecimiento micelial de las 24 a las 264 horas en los tres aislados correspondientes a los testigos fue muy variada, Sin embargo, cada uno de ellos completaron su crecimiento y desarrollo en las cajas Petri con medio de cultivo PDA, el primero fue *R. solani* PB1 a las (192 h) seguido de *T. harzianum* (240 h) y *T. asperellum* TAV-6, (264 h). El crecimiento micelial radial en este tiempo para los tres asilados fue de 7.97, 7.78 y 8.09 cm, respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Crecimiento micelial radial entre tratamientos testigos de las cepas nativas de *R. solani* PB1, *T. asperellum* TAV-6 y la comercial de *T. harzianum*

Horas/cm	*R. solani* PB1	*T. harzianum*®	*T. asperellum* TAV-6	P≤0.0001
24	0.99 ± 0.99^{b}	0.93 ± 0.71^{b}	1.04 ± 0.85^{a}	
48	1.07 ± 1.28^{a}	0.93 ± 0.71^{b}	1.04 ± 0.85^{a}	
72	0.99 ± 1.20^{a}	0.96 ± 1.20^{a}	1.02 ± 0.71^{a}	
96	1.19 ± 1.05^{a}	1.07 ± 0.68^{b}	1.03 ± 0.91^{b}	
120	1.11 ± 0.78^{a}	0.77 ± 1.06^{b}	0.75 ± 1.09^{b}	
144	1.12 ± 0.94^{a}	0.72 ± 1.02^{b}	0.71 ± 0.94^{b}	
168	1 ± 1.06^{c}	0.75 ± 1.17^{a}	0.66 ± 0.78^{b}	
192	0.49 ± 0^{b}	0.78 ± 7.1^{a}	0.63 ± 5.5^{b}	
216	0^{b}	0.73 ± 5.3^{a}	0.64 ± 5.4^{a}	
240	0^{a}	0.13 ± 0^{b}	0.45 ± 3.6^{b}	
264	0^{a}	0^{b}	0.12 ± 0^{ab}	

Con letras diferentes se observa diferencia significativa P≤0.0001 en el crecimiento micelial radal entre los tratamientos testigo de las cepas de *R. solani* PB1, *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* por ANOVA de una vía; Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk; Prueba de igualdad de Brown-Forsithe y comparación de medias por el método de Tukey P<0.05

8.6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 en cultivo dual

El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial radial (PICMR) de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en cultivo dual sobre *R. solani* PB1 se evaluó a las 24, 48,

72, 96 y 120 h considerando la unión de los micelios del antagonista con el fitopatógeno. Durante este tiempo, el (PICMR) en *T. harzianum* fue de 18.98, 30.31, 34.94, 60.51 y 100% respectivamente y de *T. asperellum* TAV-6, 15.17, 15.02, 18.57, 39 y 95%, respectivamente. Lo que permite sugerir que el aislado nativo de *Trichoderma* TAV-6 posee alta capacidad de inhibición sobre el fitopatógeno (Figura 31).

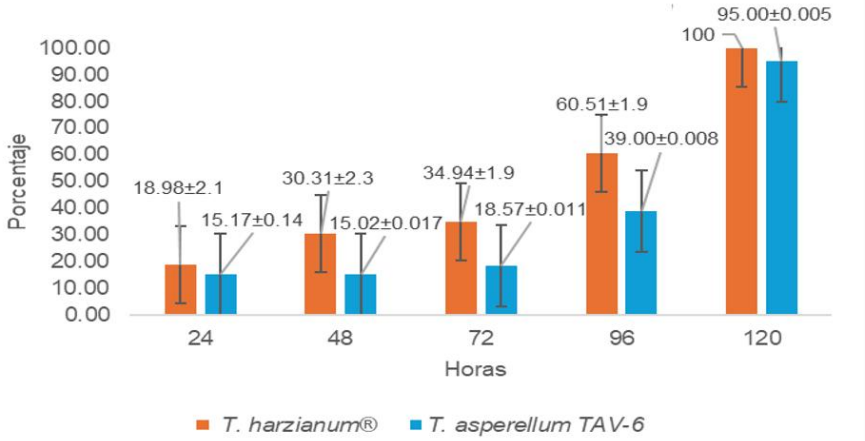


Figura 31. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial radial de *T. harzianum* y *T. asperellum* TAV-6 sobre *R. solani* PB1 en confrontación dual a 120 h.

Se registró también el crecimiento micelial radial de *R. solani* PB1 en cultivo dual con *T. asperellum* y *T. harzianum* durante las 24, 48, 72, 96 y 120 h y se comparó con el crecimiento micelial radial del testigo de *R. solani* PB1 a las mismas horas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P<0.001$) en el crecimiento micelial radial entre el testigo y los tratamientos confrontados, en cada análisis el testigo fue diferente a los tratamientos en confrontación y estos últimos estadísticamente sin diferencia, sin embargo, cabe destacar que si se mostró diferencias estadísticas significativas ($P<0.001$) entre los tres tratamientos a las 96 h es decir, entre los tratamientos en cultivo dual antagonista-fitopatógeno y el tratamiento testigo de *R. solani* con crecimiento micelial radial de 1.19, 0.73 y 0.47

cm para *R. solani* PB1 testigo, *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* respectivamente (Figura 32).

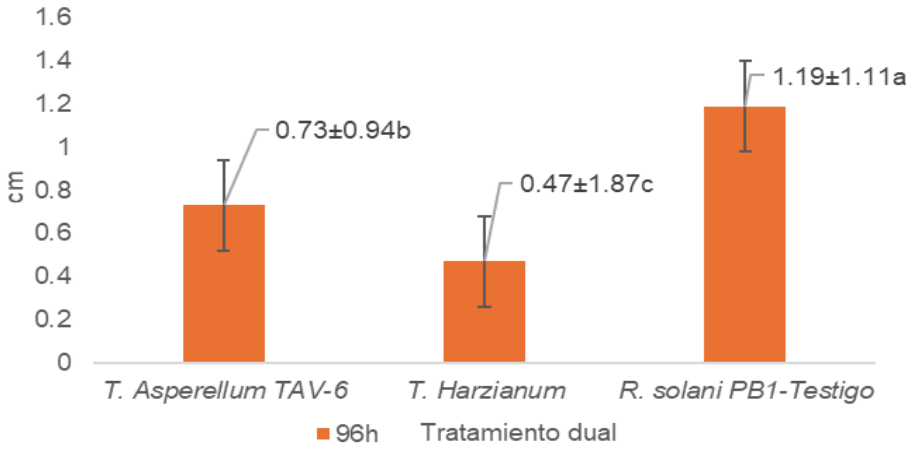


Figura 32. Inhibición del crecimiento micelial radial de *R. solani* en cultivo dual con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum.* Se observaron diferencias estadísticas significativas (P<0.001) a las 96 h de la confrontación dual de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1. Por ANOVA de una vía, Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (P=0.151), Prueba de igualdad de varianzas de Brown-Forsythe (P=0.122), F=106.311.

8.7. Estimación de la incidencia y la severidad en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) por efecto de *R. solani* PB1 en invernadero

Incidencia

Se estimó la incidencia y la severidad de Pudrición Café causada por *R. solani* PB1 con ($5.4x10^5$) propágulos/mL en plántulas de jitomate en presencia de las cepas nativa de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y la comercial de *T. harzianum* a dos diferentes concentraciones de esporas aplicadas en forma curativa, en condiciones de invernadero.

Bajo estos parámetros, el menor grado de incidencia (15%) se observó en el tratamiento T9-*T. harzianum* ($2.2x10^7$) esporas/mL + *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL, mientras que, entre los tratamientos con *T. asperellum* TAV-6 no

se manifestó diferencia estadística significativa entre los valores de las dos concentraciones de esporas (alta y baja) aplicadas para el control del fitopatógeno y la mayor (40%) se encontró en el tratamiento T10-*T. harzianum* $6.6x10^9$ esporas/mL (Cuadro 8).

Cuadro 8. Incidencia de la Pudrición Café causada por *R. solani* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.), en condiciones de invernadero

Tratamiento	Inóculo/2mL	Concentración *Trichoderma* esporas/mL	Concentración *Rhizoctonia* propágulos/mL	N	Porcentaje de Incidencia
T2	*R. solani* PB1		$5.4x10^5$	20	35
T7	*T. asperellum TAV-6* + *R. solani* PB1	$8.9x10^7$	$5.4x10^5$	20	30
T8	*T. asperellum TAV-6* + *R. solani* PB1	$1.3x10^9$	$5.4x10^5$	20	30
T9	*T. harzianum* + *R. solani* PB1	$2.2x10^7$	$5.4x10^5$	20	15
T10	*T. harzianum* + *R. solani* PB1	$6.6x10^9$	$5.4x10^5$	20	40

Severidad

Se estimó el porcentaje de severidad de Pudrición café sobre plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en interacción con la cepa nativa de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y la comercial de *T. harzianum* a dos diferentes concentraciones de esporas.

El porcentaje de severidad con el menor grado (29%) se obtuvo en el tratamiento T8-*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$) esporas/mL + *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL de la cepa nativa, seguido del tratamiento T9-*T. harzianum* ($2.2x10^7$) esporas/mL, + *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL (37%) de la cepa comercial.

El porcentaje con el mayor grado de severidad se obtuvo en el tratamiento testigo T2-Plántula+*R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL (61%), seguido del tratamiento T7-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL + *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL (47%) de la cepa nativa y del tratamiento T10-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL. + *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL (45%) de la cepa comercial (Figura 33).

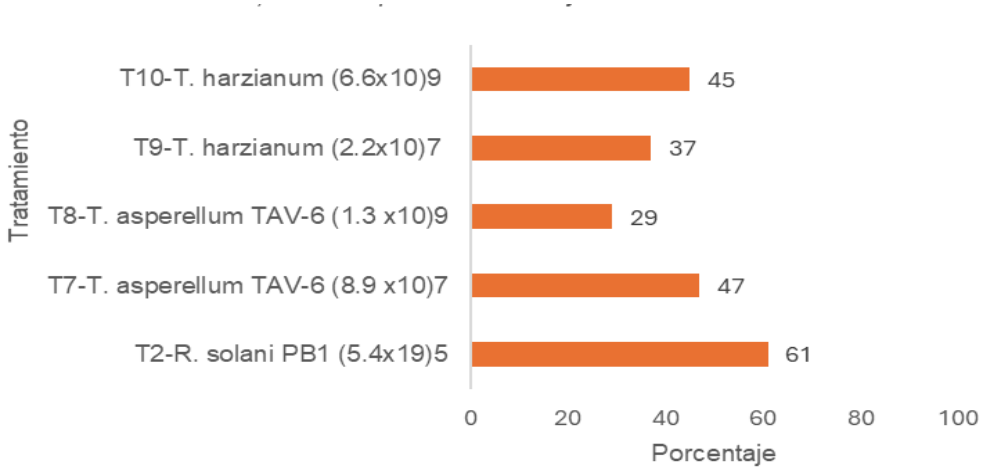


Figura 33. Estimación de severidad de *R. solani* PB1, causante de Pudrición Café en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en interacción con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en invernadero.

8.8. Evaluación del efecto de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en el crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en invernadero

En investigaciones se ha reportado que cuando se aplica *Trichoderma* sp. al sustrato provee beneficios a las plantas. En plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) se evaluó este efecto con las variables Diámetro del Tallo (DT), Altura de la Plántula (AP), Peso Fresco (PF) y Peso Seco (PS) aplicando dos concentraciones diferentes de esporas/mL en los tratamientos correspondientes de *T. asperellum* TAV-6 y de *T. harzianum.*

Efecto de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum s*obre el diámetro del tallo. En la variable Diámetro del Tallo (DT) de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en tratamientos con *Trichoderma* TAV-6 *y T. harzianum* se presentó diferencia significativa ($p< 0.001$) 15 días antes de inoculadas (dai) y 22 días después de inoculadas (ddi). Los valores que marcaron la diferencia en ambas mediciones se mostraron en los Tratamientos: T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y Tratamiento T3-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL (Cuadro 9).

Cuadro 9. Diámetro del tallo de la planta de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 15 días antes de la inoculación y 22 días después de la inoculación con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum.*

	Tratamiento	N	Mediana 15 (dai) (mm)	DE	P	Mediana 22 (ddi) (mm)	DE	P
T1	Planta (sin ningún inóculo)	20	1.92[a]	±0.28	0.001	2.55[a]	±0.24	0.001
T3	*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$)	20	1.80[ab]	±0.19		1.80[b]	±0.21	
T4	*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x0^9$)	20	1.60[b]	±0.13		1.70[b]	±0.11	
T5	*T. harzianum* ($2.2x10^7$)	20	1.70[b]	±0.25		1.80[b]	±0.21	
T6	*T. harzianum* ($6.6x10^9$)	20	1.92[a]	±0.13		2.10[a]	±0.34	

Letras diferentes entre tratamientos muestran diferencias estadísticas significativas a los 15 días antes del inóculo (dai) de *Trichoderma,* H=27.133, 4 grados de libertad, P≤0.001 con ANOVA de una vía en rangos de Kruskal-Wallis y 22 días después (ddi). H=56.636, 4 grados de libertad, P<0.001 y comparación de medias por el método de Tukey P<0.05. (dai=días antes del inóculo), (ddi=días después del inóculo).

Efecto de *T. asperellum TAV-6 y T. harzianum* en la altura de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.). En la variable Altura de la Planta (AP) se midieron las plántulas con 10 días de edad antes de inocular con las cepas nativa de *T. asperellum TAV-6* y la comercial de *T. harzianum.* En las mediciones no se mostraron diferencias significativas. Sin embargo, se observaron valores más altos en las plántulas del tratamiento T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y T3-*T.*

asperellum TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL. Es importante hacer notar que se mencionan los tratamientos con el inóculo, pero éste aún no se ha aplicado. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Altura de la planta de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 10 días, antes de la inoculación con *Trichoderma asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*

	Tratamiento	N	Media 10 (dai)/cm	DE	P
T1	Planta sola	20	11.18	±1.74	0.081
T3	*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$)	20	10.65	±1.23	
T4	T. *asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$)	20	10.45	±1.25	
T5	*T. harzianum* ($2.2x10^7$)	20	10	±1.17	
T6	*T. harzianum* ($6.6x10^9$)	20	10.88	±1.31	

Así mismo, después de aplicar en la base del tallo de las plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) la suspensión de esporas de la cepa nativa de *T. asperellum* TAV-6 y de la cepa comercial de *T. harzianum* a dos diferentes concentraciones, se realizaron mediciones de la altura de las plántulas a los 05, 10, 15 y 22 días.

En el análisis estadístico se mostraron diferencias significativas a los 05 y 10 días. A los 05 días ($p<0.001$) y a los 10 días ($p<0.010$) los valores más sobresalientes se ubicaron los tratamientos T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y T3-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL (Cuadro 11).

Cuadro 11. Altura plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) 5, 10, 15 y 22 días después de inoculada con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*

Tratamiento		N	Altura(cm)/ Días después del inóculo			
			05±DE p<0.001	10±DE p<0.010	15±DE p<0.107	22±DE p<0.060
T1	Planta sola	20	13.02^{c} ±1.9	13.94^{a}±1.78	14.18±2.01	14.65±1.9
T3	*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^{7}$)	20	11.85^{c}±1.14	12.94^{ab}±1.19	13.42±1.26	13.93±1.34
T4	*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x0^{9}$)	20	11.70^{ab}±1.24	12.81^{ab}±1.07	13.18±1.26	13.40±1.40
T5	*T. harzianum* ($2.2x10^{7}$)	20	11.30^{ab}±1.16	12.68^{b}±1.14	13.14±1.23	13.62±1.23
T6	*T. harzianum* ($6.6x10^{9}$)	20	12.26^{c}±1.40	13.64^{ab}±1.35	13.84±1.25	14.07±1.47

Letras diferentes en filas, entre tratamientos muestran diferencias estadísticas significativas (05) Se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en rangos de Kruskal-Wallis, H=27.133, 4 grados de libertad, P=<0.001 y comparación de medias por el método de Tukey P<0.050. (10) Se observó diferencia estadística significativa con ANOVA de una vía P=0.010 con pruebas de Shapiro-Wilk P=0.473 y Brown-Fosythe, P=0.188 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.05 (15) No se observó diferencia estadística significativa P=0.107 por ANOVA de una vía y pruebas de Shapiro-Wilk P=0.263 y Brown-Forsythe P=0.192. (22) No se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en rangos de Kruskal-Wallis, H=9.025,4 grados de libertad, P=0.060

Para evaluar del peso fresco en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculadas con la cepa nativa de *T. asperellum* TAV-6 y la cepa comercial de *T. harzianum* a dos diferentes concentraciones de esporas, *s*e obtuvo el Peso Fresco Total (PFT), Peso Fresco de Hojas (PFH), Peso Fresco del Tallo (PFT) y Peso Fresco de Raíz (PFR).

En la variable Peso Fresco Total (PFTT) se observaron diferencias estadísticas significativas (p<0.002) en el tratamiento T6-*T. harzianum* ($6.6x10^{9}$) esporas/mL y valores similares en los tratamientos T3-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^{7}$) esporas/mL y T4-*T. asperellum* ($1.3x10^{9}$) esporas/mL.

En la variable Peso Fresco de Hojas (PFH) no se observaron diferencias estadísticas significativas, sin embargo, los valores de las mediciones más altas se muestran en el Tratamiento T5-*T. harzianum* ($2.2x10^{7}$) esporas/mL y T3-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^{7}$) esporas/mL.

En la variable Peso Fresco del Tallo (PFT) se observaron diferencias estadísticas significativas ($p<0.001$) en plántulas con el tratamiento T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y valores similares en los tratamientos T3- *T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL y T4-*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$) esporas/mL.

En la variable Peso Fresco de Raíz (PFR) se observaron diferencias significativas ($p<0.001$) en plántulas del tratamiento con la cepa comercial T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y el tratamiento de la cepa nativa T4-*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Evaluación del peso fresco de la plántula de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculada con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*

Tratamiento		Peso Fresco de la Planta (mg)/ Después del inóculo				
		N	Peso Fresco Total ± DE p<0.002	Peso Hoja ± DE p<0.080	Peso Tallo ± DE p<0.001	Peso Raíz ± DE p<0.001
T1	Planta	20	0.671^{a}±0.15	0.184±0.60	0.253^{a}±0.60	0.180^{ac}±0.07
T3	*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$)	20	0.501^{ab}±0.13	0.172±0.05	0.198^{ab}±0.04	0.124^{b}±0.05
T4	*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$)	20	0.500^{b}±0.08	0.162±0.03	0.198^{bc}±0.03	0.134^{bc}±0.03
T5	*T. harzianum* ($2.2x10^7$)	20	0.523^{ab}±0.23	0.175±0.06	0.184^{b}±0.04	0.154^{bc}±0.06
T6	*T. harzianum* ($6.6x10^9$)	20	0.580^{a}±0.07	0.151±0.03	0.229^{ac}±0.03	0.206^{a}±0.03

Letras diferentes en filas entre tratamientos muestran diferencias estadísticas significativas. Se observan diferencias estadísticas significativas en Peso Fresco Total (PFTT) por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=17.189, 4 grados de Libertad y P=0.002 y comparación de medias por la prueba de Tukey P≤0.050. En Peso Fresco de Hojas (PFH) no se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=8.326, 4 grados de libertad y P=0.080. En Peso Fresco de Tallo (PFT) se observó diferencias estadísticas significativas por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=23.475, 4 grados de libertad y P=0.001 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.050. En Peso Fresco de Raíz (PFR) se observó diferencias estadísticas significativas por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=23.522, 4 grados de libertad y P<0.001, prueba de normalidad de Shapiro-Wilk P=0.418 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.050.

Evaluación del peso seco de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculadas con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*

Se registró la biomasa de variables Peso Seco Total (PSTT), Peso Seco de Hojas (PSH), Peso Seco de Tallo (PST) y Peso Seco de Raíz (PSR). Se observaron diferencias estadísticas significativas en las variables Peso Seco Total (PSTT) ($p<0.001$) Peso Seco de Hojas (PSH) ($p<0.002$), Peso Seco de Tallo (PST) ($p<0.001$) y Peso Seco de Raíz (PSR) ($p<0.001$). En cada una de estas variables, el valor más alto se registró en los tratamientos T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y T4-*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$) esporas/mL Se destaca que en la variable Peso Seco de Tallo (PST) ($p<0.001$) los tratamientos T3, T4 y T5 no presentaron variación en los valores obtenidos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Evaluación del peso seco plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculadas con *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum*

			Peso seco de la planta (mg)/ Después del inóculo			
Tratamiento		N	PST±DE p<0.001	PSH±DE p<0.002	PST±DE p<0.001	PSR±DE p<0.001
T1	Planta sola	20	0.0469^{a}±0.012	0.0168^{a}±0.005	0.0147^{a}±0.004	0.0110^{a}±0.004
T3	*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$)	20	0.0262^{b}±0.011	0.0121^{b}±0.004	0.0109^{b}±0.003	0.0072^{ab}±0.003
T4	*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$)	20	0.0300^{b}±0.007	0.0134^{a}±0.003	0.0109^{b}±0.002	0.0078^{ab}±0.002
T5	*T. harzianum* ($2.2x10^7$)	20	0.300^{b}±0.017	0.0134^{ab}±0.007	0.0109^{b}±0.004	0.0081^{ab}±0.006
T6	*T. harzianum* ($6.6x10^9$)	20	0.0451^{a}±0.007	0.0166^{a}±0.003	0.0144^{a}±0.002	0.0129^{a}±0.002

Letras diferentes con diferencia estadística significativa. En Peso Seco Total (PSTT) se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=29.804, 4 grados de libertad y P<0.001 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.050. En Peso Seco de Hojas (PSH) se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=17.340, 4 grados de libertad y P=0.002 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.050. En peso Seco de Tallo (PST) se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=33.168, 4 grados de libertad y P≤0.001 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.050. En Peso Seco de Raíz (PSR) se observó diferencia estadística significativa por ANOVA de una vía en Rangos de Kruskal-Wallis. H=25.370, 4 grados de libertad y P<0.001 y comparación de medias por la prueba de Tukey P<0.050.

8.9. Actividad endofítica de las cepas de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* en tejidos de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.)

En este trabajo se corroboró la actividad endofítica de las cepas de *Trichoderma asperellum* TAV-6 *y T. harzianum* cuando se sembraron y purificaron colonias de fragmentos de tejidos radiculares de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en medio PDA, mismas que fueron inoculadas con los diferentes tratamientos de estas cepas de *Trichoderma* y de *Rhizoctonia* PB1 (Figura 34).

Figura 34. Actividad endófita de *Trichoderma asperellum* TAV-6, y *T. harzianum* sobre tejido radicular de jitomate (*S. lycopersicum* L.). Se observan micelio y abundantes esporas dentro de tejidos de raíz de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* PB1 en cultivo dual

En la evaluación de antagonistas en cultivo dual *in vitro*, se incluyen solo dos componentes (antagonista y fitopatógeno) que brindan información sobre la actividad antagónica que *Trichoderma* sp. presenta sobre un fitopatógeno. En este trabajo se observó mediante microscopio óptico la actividad de micoparasitismo, que los aislados, nativo de *T. asperellum* TAV-6 y el comercial de *T. harzianum* presentaron sobre el aislado nativo de *R. solani* PB1.

De acuerdo con Samaniego et al. (2018), durante la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. sobre *R. solani*, los aislados de *Trichoderma* sp. liberan enzimas que degradan las paredes del hongo fitopatógeno, incluso durante la confrontación dual, se puede observar la formación de un halo inhibitorio con actividad antifúngica seguida del micoparasitismo.

En cultivo el dual, el porcentaje de mayor inhibición de *R. solani* PB1 (100%) fue a las 120 h por interacción de la cepa comercial de *Trichoderma harzianum* en donde se observó abundante esporulación, resultados similares obtuvieron Pérez et al. (2017), quienes observaron que a las 120 horas la cepa A-34 de *T. harzianum* inhibió el 100% de *Pyricularia grisea* Sacc presentando actividad antagónica por competencia, micoparasitismo y antibiosis. Así mismo, Garrido y Vilela (2019), observaron *in vitro* que el micelio de la cepa comercial a base de *T. harzianum* en interacción con *R. solani* presentó enrollamiento y penetración de las hifas del fitopatógeno a las 72 h.

Por su parte, Guedez (2012) refiere que *T. harzianum* tuvo interacción con *R.*

solani a partir de las 72 h después de la inoculación y el porcentaje de inhibición total fue del 72%. Así mismo, Osorio et al. (2016) menciona que la cepa de *T. asperellum* (T16 y T18) presentaron antagonismo en forma de traslape o invasión sobre el crecimiento micelial de tres cepas de *R. solani* (TJ53, ACH42 y HSO) y de acuerdo con la escala de Bell et al. (1982), el antagonismo se ubicó en la clase 1.

Investigaciones relacionadas con el control de *R. solani* mediante cepas de *Trichoderma* sp. han demostrado diferentes respuestas en la capacidad de inhibir el micelio del fitopatógeno porque pueden presentar diferentes mecanismos de actividad antagónica, capacidad de esporulación y crecimiento micelial. Por ejemplo, Vargas y Gilchrist (2015) confirmaron *in vitro* que la cepa de *T. asperellum* T109 presentó actividad antagónica sobre *Fusarium* sp. aislado de jitomate y bajo condiciones controladas la cepa expresó alta capacidad de liberación de glucanasas. Así mismo, Hernández et al. (2015) mencionaron que, en confrontación dual, las cepas de *Trichoderma* HTE807, HTE810, HTE815 y HTE809 que corresponden a *T. harzianum* y *T. virensen* presentaron antagonismos mediante antibiosis contra *Macrophomina phaseolina*. En esta investigación durante la confrontación dual *in vitro* se observó actividad de antibiosis de la cepa comercial de *T. harzianum* por la formación de un halo característico de inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* PB1, Al respecto, Hernández et al. (2015) menciona que en estudios sobre antibiosis de diferentes cepas de *T. harzianum* se han obtenido metabolitos antifúngicos como la viridina, trichodermina, peptabioles entre otros.

La efectividad en el control de fitopatógenos por la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. puede estar directamente relacionada con la especie que se estudie como refiere Acosta et al. (2021) quienes probaron en cultivo dual tres especies diferentes de *Trichoderma* sp. para control de *Botritis* sp. fitopatógeno de *Passiflora ligularis* Juss y en sus resultados mencionan que la cepa MCHT07 de *T.*

harzianum obtuvo menor grado de inhibición (6.81%) en relación con las otras dos de *T. longibraquiatum* MJHU01 (22.01%) y *T. atroviridae* MBOSHO03 (20.4%).

También, Sánchez et al. (2017) evaluaron la actividad antagónica de cepas nativas de *T. asperellum* y *T. harzianum* sobre *Fusarium* spp. y *R. solani* aislados de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) observaron que estas cepas nativas inhibieron el crecimiento micelial de *Furarium* y *R. solani* en un 72.3% y 87.5% respectivamente.

En otra investigación, Espinoza et al. (2019) dispusieron en confrontación dual *In-Vitro* cepas nativas de *T. asperellum* y de *T. harzianum* sobre cepas de *Fusarium* sp. en sus resultados obtuvieron que el mayor porcentaje de inhibición fue de *T. asperellum* (54.9% a 74.1%) seguido de *T. harzianum* (54.9 a 64.7%).

Como se ha señalado, la actividad antagónica y efectividad de las cepas de *Trichoderma* sp. pueden manifestar diferentes porcentajes de control en un determinado fitopatógeno, esto se demostró nuevamente con esta investigación en donde mediante cultivo dual se comparó la efectividad de un aislado nativo de *T. asperellum* TAV-6 y de una cepa comercial de *T. harzianum* para el control de *R. solani* PB1 aislado de tubérculos de papa *(S. tuberosum L.).* Los resultados mostraron diferencias en el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial del fitopatógeno, Para *T. asperellum TAV-6* se obtuvo 95% y para *T. harzianum* 100% el resultado de estos porcentajes en la inhibición del crecimiento micelial radial del fitopatógeno sugiere que la cepa nativa de *T. asperellum* TAV-6 representa una alternativa de control que puede investigarse utilizando modelos *In-Vivo*.

De los mecanismos de actividad antagónica que presenta *Trichoderma* sp. el micoparasitismo juega un papel importante en el control de fitopatógenos al liberar enzimas líticas como proteinasas, glucanasas y quitinasas que degradan la pared

celular de los hongos fitopatógenos (Acosta et al., 2021). En esta investigación, a los 12 días tanto *T. asperellum* TAV-6 como *T. harzianum* colonizaron la totalidad de la caja Petri, cubriendo la superficie del micelio de *R. solani* PB1 a los 14 días produciendo cuerpos fructíferos, fiálides y esporas. Resultados similares obtuvieron Hu et al. (2022) a los 12 días después de la inoculación *Trichoderma* sp. sobrepasó las colonias del fitopatógeno y cubrió toda la superficie del medio.

También, Martínez y Marcia (2016) evaluaron cepas nativas de *Trichoderma sp.* sobre *R. solani*, *F. oxysporum*, *Verticillium dahliae* y *Phymatotrichopsis omnivora*, al segundo día de confrontación, los aislados T20 y T21 inhibieron (98%) el desarrollo de *F. oxysporum*, *V. dahliae* y *R. solani*, el aislado T23 inhibió (88.2%) el desarrollo de los fitopatógenos y degradó totalmente el micelio de *R. solani* y *P. omnivora* 10 días después del inicio de la confrontación, mientras que T27 inhibió (91.3%) el crecimiento micelial de los cuatro fitopatógenos, así mismo los aislados T26 y T21 sólo (90.7%). Estos autores observaron en sus resultados que, entre los nueve y diez días, los aislados T2, T8, T9, T20, T21, T22 T23 y T24 presentaron micoparasitismo degradando el micelio de los fitopatógenos y cubrieron el (100%). Estos resultados coinciden con el tiempo y desarrollo del (95% y 100%) en las placas con medio de cultivo de la cepa nativa de *T. asperellum* TAV-6 y de la cepa comercial de *T. harzianum* en confrontación con *R. solani* PB1.

De acuerdo con la escala de Bell et al. (1982), en este trabajo, tanto el aislado nativo de *T. asperellum* TAV-6 como del aislado comercial de *T. harzianum* sobre *R. solani* PB1 se clasificó en el grado 2 de antagonismo, similar a lo reportado por Sánchez et al. (2017) y Duarte et al. (2017) en donde la mayoría de las cepas de *T. asperellum* evaluadas obtuvieron el grado 2. A diferencia de Osorio et al. (2016), quienes en sus investigaciones la respuesta de antagonismo de los aislados de *Trihoderma* sp. sobre *R. solani* se clasificó en el grado 1 de la misma escala.

9.2. Incidencia y severidad

Es importante destacar que la variación en la incidencia y la severidad de las enfermedades en plantas puede estar relacionada con las condiciones en que la planta se desarrolló, la nutrición de la planta, la concentración del inóculo o también por el estrés al que se sometieron las plantas al momento de ser inoculadas, así como temperatura, humedad relativa (HR) y el fotoperiodo.

Por otro lado, aunque el hecho de que se obtengan resultados favorables en pruebas de confrontación dual *in vitro* entre un antagonista y un fitopatógeno, los resultados pueden variar cuando se pretende replicar *in vivo* el efecto de los aislados antagonista-fitopatógeno en este caso, de *Trichoderma* sp. con *R. solano PB1* en condiciones de invernadero, esto puede ser debido a que las condiciones ambientales son completamente diferentes y además intervienen más factores tal como mencionan Montealegre et al. (2014) quienes realizaron pruebas *In-Vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sp. para control *de Rhizoctonia* sp. mediante confrontación dual y posteriormente en invernadero, mencionan que solo algunas de las cepas que fueron efectivas en cultivo dual tuvieron comportamiento similar durante las pruebas de invernadero *In-Vivo*.

Así mismo, es importante destacar que en los ensayos que se realizan en invernadero intervienen más de dos componentes, entre los que se mencionan, los antagonistas, el fitopatógeno, la planta hospedante, el sustrato utilizado, humedad relativa, cantidad y calidad de la luz (fotoperiodo) y temperatura. Estos componentes proporcionan diferente información sobre la actividad del antagonista sobre el fitopatógeno en interacción con la planta. Además, este tipo de investigaciones pretende igualar condiciones en las que las plantas se desarrollan en el campo.

En este trabajo la temperatura osciló entre los 24±3°C y una HR de 57±3%, mientras que el fotoperiodo fue 12:12 h. Lo que permite suponer que el tratamiento T10 con la concentración alta de esporas de *T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL en presencia de *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL presentó mayor incidencia debido a un estrés durante su desarrollo. Al respecto, Guédez (2012) plantea que los aislados nativos pudieran ejercer un buen control de *R. solani* si se aplican de manera preventiva tanto en semilleros como en plantaciones definitivas y tener mayor efectividad biológica cuando se dan las condiciones de adaptación medioambientales. En este trabajo los aislados antagonistas se aplicaron de manera curativa; es decir, después de dos días de haber inoculado al fitopatógeno se aplicaron los antagonistas en los tratamientos respectivos. Por otro lado, en condiciones similares *T. asperellum* ejerce buen control sobre *R. solani* como lo reportan Díaz et al. (2014) al retrasar la aparición de síntomas sobre frutos tiernos de calabaza pipiana (*C. argyrosperma*).

Además, en una investigación de campo, se debe considerar que los problemas fitosanitarios pueden ser más severos para los cultivos y causar mayores pérdidas debido a pudriciones de raíz, principalmente cuando los fitopatógenos presentes en el suelo se asocian. Al respecto, Parveen et al. (2020) realizaron una investigación en campo relacionada con fitopatógenos habitantes del suelo afectando a plantas de chile (*Capsicum annum*) mencionan que cuando se presentó una asociación entre *F. solani* con *R. solani* ocurrieron pérdidas entre 35% y 55%. También encontraron que, en el cultivo del melón, cuando se asocian *M. phaseolina* con *R. solani*, pueden ocurrir pérdidas del 30% al 35% y que en el cultivo de girasol, cuando se encuentran asociados los fitopatógenos *M phaseolina*, *F. solani* y *R. solani*. las pérdidas en campo oscilan entre 30% y 40%.

Sumado a esto, Madriz (2002) menciona que un fitopatógeno puede ocasionar una enfermedad dependiendo del grado de patogenicidad y de la susceptibilidad de la

planta, por lo que, un fitopatógeno pudiera ser altamente virulento para un determinado hospedante y ser levemente virulento para otro. Además, es importante considerar en el desarrollo de una enfermedad la cantidad del inóculo existente y las condiciones medioambientales.

En este sentido, en las investigaciones in vivo es importante realizar pruebas preliminares como las de patogenicidad para verificar la efectividad del inóculo infectivo. En este estudio, el aislado de *R. solani* PB1, se obtuvo de tubérculos de papa y las pruebas de patogenicidad se realizaron inoculando tubérculos de papa en los que se obtuvo la reacción de hipersensibilidad por parte del fitopatógeno, el cual expresó infección positiva con lesiones en la epidermis y degradación de la estructura interna del tubérculo, además de que se observó la formación y desarrollo de micelio típico de *R. solani.*

En contra parte, las aplicaciones del inóculo infectivo en las pruebas in vivo son fundamentales para obtener las respuestas positivas. Al respecto, entre los métodos para inocular *R. solani,* Fernández et al. (2013) menciona que en su investigación utilizó la técnica de inmersión de raíz desnuda con una solución de 86 x 10^3 propágulos/mL en plantas de jitomate variedad Río Grande® señalan que, durante los 50 días que duró el bioensayo no se presentaron síntomas de enfermedad en las plantas tratadas con *R. solani*. Además de este método de inoculación en su bioensayo probaron granos de trigo infectados por *R. solani* , mencionan que por este método no se ocasionó la muerte de las plantas, pero sí se presentó incidencia del 100% en la población de plantas tratadas que manifestaron reducción del crecimiento hasta del 50% y amarillamiento generalizado en el área foliar.

En relación con esto, la inoculación de *R. solani* para esta investigación fue mediante el método conocido como “Drench”, que consistió en depositar

propágulos del fitopatógeno mediante una suspensión líquida, de esta forma, se aplicaron 2 mL de *R. solani* a una concentración de ($5.4x10^5$) propágulos/mL en la base del tallo o cuello de la raíz de la plántula de jitomate de la variedad Río Grande®. Se observó que por este método no se obtuvo 100% de incidencia en la población de plántulas tratadas, sin embargo, se observaron síntomas característicos de esta enfermedad en las plántulas inoculadas de amarillamiento y retraso en el crecimiento. Así mismo, Fernández et al. (2013) en su investigación observaron los primeros síntomas de la enfermedad causados por *R. solani* a los 10 días después de aplicar el inóculo en plántulas de jitomate de 35 días después de la germinación, observaron también, que a los 20 días después de la inoculación, la enfermedad se expresó 100% en la población tratada. En esta investigación, la evaluación de patogenicidad de *R. solani* PB1 en plántulas de jitomate se realizó 22 días después de la inoculación, con 37 días de edad de la plántula y no se manifestó una incidencia significativa, lo que sugiere la posibilidad de que la cantidad del inóculo de *R. solani* PB1 ($5.4x10^5$) propágulos/mL no fue el suficiente para que se desarrollaran los síntomas por *R. solani* PB1 en las plántulas, o que, el inóculo de *R. solani* PB1 no se desarrolló en las condiciones de sustrato utilizado, o que el método de inoculación no fue el apropiado o también, que los propágulos no lograron penetrar los tejidos de las plantas.

9.3. Efecto de *Trichoderma asperellum* TAV-6 T y *T. harzianum* en el crecimiento de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) en invernadero

Efecto en el diámetro del tallo

El tiempo de aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. es un factor determinante en la estimulación del crecimiento de las plantas. De acuerdo con los resultados de Martínez (2022) en investigaciones con plantas de tomate (*S. lycopersicum* L.) observaron que se estimuló el crecimiento y grosor del tallo en

plantas al aplicar al suelo las cepas sp. Ta13 y Ta90 de *Trichoderma* a 10^5 esporas/mL a los 15 días del cultivo y siete días postratamiento del suelo. Esto sugiere que para que se establezcan y proliferen estructuras de *Trichoderma* sp. en el sustrato, se debe inocular las esporas de los aislados de *Trichoderma* sp. con anticipación, previo al establecimiento de la semilla o sobre las plántulas de jitomate.

En este sentido, Gómez et al. (2013) en su investigación reportan que de cuatro cepas de *T. asperellum* (T25, T46, T84 y T109) a concentraciones de (10^4, 10^5, 10^6, 10^7 y 10^8) esporas/mL, las diferencias significativas en crecimiento del tallo se registró en la cepa de *T. asperellum* T109 a concentraciones de (10^5, 10^6) esporas /mL

En relación con el diámetro del tallo de la planta antes y después de inocular con las cepas nativa de *T. asperellum* TAV-6 y comercial de *T. harzianum* en la presente investigación se observaron diferencias significativas ($p<0.001$) y es de notar, que los mismos tratamientos con valores altos al inicio de la evaluación también fueron los más representativos al final de la misma. En este caso el valor más alto se obtuvo en el tratamiento T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL, sin embargo, en el aislado nativo el valor más alto en el diámetro del tallo se registró en el tratamiento T3-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL.

Efecto en altura de la plántula

El género *Trichoderma* está ampliamente documentado como promotor de crecimiento y desarrollo vegetal, así como el de activar la resistencia de las plantas a enfermedades causadas por fitopatógenos. Al respecto, Gómez et al. (2013) mencionan que el estímulo del crecimiento en las plantas de jitomate puede

estar influenciado por la especie de planta, las cepas de *Trichoderma* sp. y la concentración de esporas/ml aplicado. En su investigación reportan que de cuatro cepas de *T. asperellum* (T25, T46, T84 y T109) a concentraciones de (10^4, 10^5, 10^6, 10^7 y 10^8) esporas/mL, las diferencias significativas en crecimiento de la planta se registró en la cepa de *T. asperellum* T109 a concentraciones de (10^5, 10^6) esporas /mL los autores de este estudio sugieren que el estímulo del crecimiento de plántulas de jitomate se relacionó con el aislamiento particular de *T. a*sperellum y con los rangos específicos de concentraciones de esporas/mL.

Además, Jiménez et al. (2011) confirman que los factores climáticos no determinados y el tiempo de evaluación puede ser determinante para que el antagonista manifieste su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas. Estos autores realizaron sus evaluaciones a los 30 días y concluyen que los resultados fueron no significativos por el corto periodo de evaluación en el que el antagonista no fue capaz de estimular el crecimiento en las plantas. En este mismo orden de ideas, Martínez et al. (2022) mencionan que la concentración de la suspensión de esporas y el momento de la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. en plantas de tomate tienen influencia en la colonización del suelo y de este modo presentar una respuesta diferencial en el crecimiento de plantas de jitomate.

En esta investigación se evaluó el efecto en la altura de plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) inoculadas con las cepas nativa de *T. asperellum* TAV-6 y comercial de *T. harzianum* a los 22 días después de la inoculación. El análisis estadístico estimó diferencias significativas los primeros 5 y 10 días después de inocular los aislados de *Trichoderma* sp. mientras que a los 15 y 22 días después del inóculo no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.001$) lo que sugiere que ambos aislados de *Trichoderma* sp. mantuvieron los mismos niveles de

inóculo en la planta sin influir en su desarrollo.

En este sentido, Martínez et al. (2022) sugieren en su estudio que la acción de *T. asperellum* dependió del momento de su aplicación, en su investigación obtuvieron los mejores resultados en la aplicación de los aislados de *T. asperellum* con las cepas Ta13 y Ta90 cuando fueron aplicadas siete días antes de la siembra, además de que se favoreció la germinación y el crecimiento de plántulas en tomate con incremento en valores de diámetro del tallo, masa total y radical.

También, Jiménez et al. (2011) realizaron diferentes momentos de aplicación de *T. harzianum* en plantas de tomate (*L. esculentum*) en semillero, trasplante, 15 días después del trasplante, aunque en todos sus tratamientos no obtuvieron diferencias estadísticas significativas con el tratamiento testigo, en los diferentes tratamientos el crecimiento fue variable para el área foliar y de raíz, en sus resultados concluyeron que *T. harzianum* aplicado en semillero y 15 días después de la siembra estimuló el crecimiento y desarrollo de la planta de tomate al evaluar 30 días después de la inoculación.

En esta investigación las cepas de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* se aplicaron a dos diferentes concentraciones de esporas/mL en un solo momento sobre la base de las plántulas utilizando una jeringa estéril aplicando en “Drench”. Los mejores resultados se obtuvieron con la concentración alta de *T. harzianum* y la concentración baja de *T. asperellum* TAV-6 en los tratamientos T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL y T3-*T. asperellum* TAV-6 ($8.9x10^7$) esporas/mL esto sugiere que las esporas de la cepa nativa de *T. asperellum* TAV-6 fueron más efectivas al estimular el crecimiento de las plantas a una concentración menor a diferencia de la cepa comercial de *T. harzianum*, sin embargo en base a las investigaciones expuestas es recomendable considerar la cantidad de aplicaciones, el área de aplicación, el periodo de aplicación y la concentración de esporas en la evaluación

del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como el periodo de tiempo de la evaluación.

Además, es importante considerar la interacción planta-*Trichoderma* sp. Al respecto, Segarra et al. (2009) mencionan que la planta al detectar al hongo antagonista puede activar mecanismos de defensa y liberar metabolitos secundarios que pueden afectar e inhibir a las esporas del organismo benéfico. Estos resultados sugieren que para que un aislado resulte efectivo es necesario la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. en varios momentos del cultivo, y en aplicaciones sucesivas, es importante señalar que durante la presente investigación se inoculó una sola vez las cepas de *T. asperellum* TAV-6, *T. harzianum* sobre el sustrato conteniendo la plántula de jitomate (*S. lycopersicum* L.) de 17 días de edad. Por lo que es de suponer, que el comportamiento biológico de *Trichoderma* sp. es más favorable cuando se realizan más de una aplicación y en diferentes momentos del cultivo. Es de suponer que al realizarse una sola aplicación y con plántulas de más de 10 días, la interacción *Trichoderma*-planta no tuvo suficiente tiempo para establecer en los demás tratamientos con la cepa nativa y la cepa comercial la relación simbiótica.

Efecto en el peso fresco y peso seco

Se ha documentado que la incorporación de *Trichoderma* sp. al suelo en etapas tempranas del crecimiento del cultivo promueve un mejor desarrollo de las plantas, al obtener mejor absorción de los nutrientes. En este sentido Jiménez et al. (2011) mencionan que en su estudio no se obtuvieron resultados significativos entre tratamientos en relación con el testigo cuando inocularon *T. asperellum* en el semillero y 15 días después de la siembra. sin embargo, mencionan que observaron diferencias positivas en el crecimiento y desarrollo del área foliar y de la raíz, en el peso fresco y seco de plantas de jitomate y concluyen que los

tratamientos con mejores resultados fueron cuando aplicaron *T. asperellum* en el semillero y 15 días después de la siembra.

En esta investigación, en las variables Peso Fresco Total (PFT), Peso Fresco del tallo (PFT) y Peso Fresco de Raíz (PFR) se observaron diferencias significativas ($p<0.001$) entre tratamientos cuando se aplicaron altas concentraciones de esporas en el aislado nativo del tratamiento T4-*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$) esporas/mL y en el comercial del tratamiento T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL. En relación con las variables del peso seco, el análisis estadístico muestra diferencias significativas ($p<0.0001$) en las variables del Peso Seco Total (PST), Peso seco de Hoja (PSH), Peso Seco de Tallo (PST) y Peso seco de Raíz (PSR) en los tratamientos T4-*T. asperellum* TAV-6 ($1.3x10^9$) esporas/mL y T6-*T. harzianum* ($6.6x10^9$) esporas/mL al favorecer el desarrollo de las plantas de jitomate (*S. lycopersicum* L).

En esta investigación, cabe destacar que se aplicó una sola vez al sustrato conteniendo a las plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) las cepas de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* y se compararon con dos diferentes concentraciones de esporas/mL y la evaluación se realizó 22 días después de inoculadas. En base a las investigaciones expuestas se infiere que, tanto la cantidad de inóculo aplicado y los diferentes momentos de aplicación son determinantes para que se establezca el inóculo de estas cepas de *Trichoderma* sobre el sustrato conteniendo a la plántula y para que promueva el crecimiento y desarrollo de la plántula.

9.4. Actividad endofítica de *Trichoderma* en tejidos de raíz de plántula de jitomate (*S. lycopersicum* L.)

La actividad endofítica de *Trichoderma* en los tejidos de la raíz de las plantas es

un proceso de adaptación en el cual el micelio de *Trichoderma* de manera inicial debe establecerse en el sustrato y posteriormente en el área de la rizosfera, desarrollando una relación simbiótica dentro de los tejidos adyacentes a las raíces de la planta, en esta interacción antagonista-planta, ambos organismos se benefician, por un lado *Trichoderma* se alimenta de los exudadados que la planta libera a través de sus raíces como parte de su metabolismo y por el otro, la planta en presencia de *Trichoderma* activa mecanismos de defensa que le permiten contrarrestar la invasión de microorganismos fitopatógenos (Gverosca y Ziberosky, 2011; Dixit et al., 2015; López et al., 2015; Chen et al., 2016; Zhang, et al., 2007 y Howell y Puckhaber, 2005). Además, la alta actividad enzimática que *Trichoderma* sp. presenta sobre el sustrato permite que los nutrientes sean fácilmente utilizados por la planta en sus procesos metabólicos de nutrición, promoviendo de esta forma un mejor crecimiento y desarrollo (Gverosca y Ziberosky, 2011; Dixit et al., 2015; López et al., 2015; Chen et al., 2016; Zhang, et al., 2007 y Howell y Puckhaber, 2005). Cabe destacar que, en este trabajo fue posible observar la actividad endofítica de *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* sobre tejidos de plántulas de jitomate cuando se sembraron en medio PDA partes del tejido de plántulas inoculadas 22 días previos y se observó en microscopio óptico un eficiente crecimiento micelial y abundante esporulación dentro de estos tejidos.

X. CONCLUSIONES

La identidad de *Trichoderma* TAV-6 por Factor de Elongación F1-α, fue de 99.89% con el género *Trichoderma* y 99.77% con el género y especie de *Trichoderma asperellum* y mediante ITS con *Trichoderma* (100%) y (99.82%) con género y especie de *Trichoderma asperellum.* La identidad (98.94%) de *Rhizoctonia* PB1 fue con *Rhizoctonia solani* Kühn y (99.24%) con *Thanatephorus cucumeris* anamorfo *R. solani*.

Entre los tratamientos testigo, el crecimiento micelial radial fue mayor en *R. solani* PB1 seguido de *T. harzianum* y *T. asperellum* TAV-6. En cultivo dual La cepa de *T. asperellum* TAV-6 y de *T. harzianum* presentan actividad antagónica por competencia de espacio y nutrientes, antibiosis y micoparasitismo sobre el fitopatógeno *R. solani* PB1. *T. harzianum* Inhibió (100%) del Crecimiento Micelial Radial (PICMR) de *R. solani* PB1 y *T. asperellum* TAV-6 (95%).

La incidencia de *R. solani* PB1 en plántulas de jitomate (*S. lycopersicum* L.) fue menor (15%) en el tratamiento T-9 y mayor (40%) en el tratamiento T-10 con *T. harzianum*, mientras que en los tratamientos con *T. asperellum* TAV-6 no presentó variación.

La severidad por *R. solani* PB1 en plántulas de jitomate fue mayor en el tratamiento testigo T2 (61%) seguido del tratamiento T7 (47%) y T10 (45%). El menor grado se obtuvo en el tratamiento T8 (29%) seguido de T9 (37%).

En el efecto del crecimiento de plántulas de jitomate por *T. asperellum* TAV-6 y *T. harzianum* destacaron los tratamientos T6, T3 y T4 en las variables diámetro del tallo, altura de la plántula y peso fresco de tallo y de raíz. En la evaluación del peso seco destacaron los tratamientos T6 y T4, en los tratamientos T3, T4 y T5 no se manifestó variación significativa.

La cepa nativa de *T. asperellum* TAV-6 y la comercial de *T. harzianum* mostraron actividad endófita en tejidos de la plántula de jitomate (*S. lycopersicum* L.)

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Jiang D, Fu Y (2017) *Trichoderma* spp. as Antagonist of *Rhizoctonia solani*. J Plant Pathol Microbiol 8: 402. doi: 10.4172/2157- 7471.1000402

Acosta, L. T., Azania, D. K., and Azania, R. (2021). Cultivo dual *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. patógeno de *Passiflora ligularis* Juss. Revista de investigación Agropecuaria Science and Biotechnology,*1*(4), 43-55. ISSN:2788-6913. http://dx.doi.org/10.25127/riagrop.20214.720

Adams, P.B. (1990). The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annu Rev. Phytopathol. 28 (1), 59-72.

Ajayi-Oyetunde, O. O., and Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. Plant pathology,67(1), 3-17.

Agrios, N.G. (2005). Plant Pathology. 5ª Edición. Elsevier Academic Press. 903 p.

Agarwai, D.K. (2010). *Rhizoctonia* D.C.: taxonomy, ecology, and management, In: Mukerji, K. G. Manoharachary C (eds) Taxonomy and ecology of indian fungi. I K International Publishing House, New Delhi, pp. 19-49.

Arcos J. y Zúñiga D. (2015). Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Ecología Aplicada. 14(2): 95-101.

Argumedo, D. R., Alarcón, A. R., Ferrera, C. y Peña, C. J.J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 25(4),257-269.

Atanasova, L., Knox B. P., Kubicek C. P., Druzhinina I.S. Baker S.E. (2013). The polyketide synthase gene pks4 of *Trichoderma reesei* provides pigmentation and stress resistance. Eukaryot Cell 12:1499–1508.

Barnett, H., and Hunter, H. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. MacMillan, New York, U.S.A.

Bell, D. K., Wells, H.D., and Markham, C.R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72:379-382.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249-260.

Bernacer, C. (2016). Dieta y nutrición: Tomate (en línea). Madrid, España. 1 p. Consultado 20 mar. 2022 Disponible en http://www.webconsultas.com/ dieta-y-nutricion/dieta-equilibrada/ propiedades-nutricionales-del-tomate-13085

Bissett, J. (1991). Una revisión del género *Trichoderma*. II. Clasificación infragenérica. Revista Canadiense de Botánica, 69(11), 2357–2372.doi:10.1139/b91-297

Boat, M. A. B., Iacomi, B., Sameza, M. L., and Boyom, F. F. (2018). Fungicide tolerance and effect of environmental conditions on growth of *Trichoderma* spp. with antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold of

common bean (*Phaseolus vulgaris*). International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research,2(3), 226-243. doi.org/10.29329/ijiaar.2018.151.8

Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortez, A. Gutierrez y A. Herrera, E. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol. 65, 929-935.

Companioni, G. B., Domínguez, A. G. y García, V.R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. Biotecnología Vegetal 19 (4),237-248. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. MES.

Chemonics International, (2008). Programa de diversificación hortícola. Proyecto de Desarrollo de la cadena de valor y Conglomerado Agrícola. Manual del cultivo del tomate *Lycopersicum esculemtum* o *Solanum lycopersicum*. 34p.

Chen, J. L., Sun, S. Z., Miao, C. P., Wu, K., Chen, Y.W., Xu, L. H., and Zhao, L.X. (2016). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of Panaz notoginseng. Journal of Ginseng Reseach, 40(4), 314-324.

Chet, I. (1990). Biological control of soil borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments p. 15-25. In: Hurnby, Y. (ed). Biological Control of soil borne Plant Pathogens Wallingford. U.K.: Cab International.

Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, 539 pp. USA.

Contreras, C.H.A., Macías, R.L., Del-Val, E.K. and Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS Microbiology Ecology, 92(4),1-17. doi: 10.1093/femsec/fiw036

Cortés, F. C., Acevedo, C. S., Espinal, H. S., Martínez, M. R., Mendoza, V. E. de J. y Soto, B. K.V. (2017). Cultivo del tomate. Universidad Autónoma Chapingo. 38 p.

Del Pozo, O. and Lam, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. Current Biology, 8:1129-1132.

Demirci, E., Döken, M.T. (1998). Host penetration and infection by the anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from potatoes. Trans. J. Agric.For 22: 609-613.

Dennis, C., and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal Interaction. Transactions of the British Mycological Society,57(3), 363-IN2.

Dianéz, M.F., Santos, M., Carretero, F. and Marín F. (2016). *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. Journal of the Science of Food and Agriculture. 96(6),1934-1944.

Díaz, N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA,10(2), 257-267.

Diodoro, L.A., Forchiassin, F., Papinutti, V.L. and Sueldo, D.V. (2003). Actividad

enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomucotina). Revista Iberoamericana de Micología, 20:10-15.

Dixit, R., Singh, R. B. and Singh, H. B. (2015). Screening of antagonistic potential and plant growth promotion activities of *Trichoderma* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. isolates against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of French bean. Legume Res. 38 (3), 375-381.

DGSV-CNRF. (2020). Pudrición de la Raíz, *Rhizoctonia solani*. SADER-SENASICA Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha Técnica. Tecámac, Estado de México, 10 p.

Druzhinina, I., Kopchinskiy, A. and Kubicek, C. (2006). The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. Mycoscience. 47:55-64.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M. Monte, E., and Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*; the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology, 9(10), 749-759.

Duarte, L. Y., Lamz, P. A., Martínez, C. B. (2017). Antagonismo in vitro de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc. Revista Protección Vegetal. 32(3),1-11.

Espinoza, A. C. A., Gallegos, M. G., Ochoa. F. Y. M., Hernández, C. F. D., Méndez, A. R., and Rodríguez, G. R. (2019). Microbial antagonists for the biocontrol of wilting and its promoter effect on the performance of serrano chili.Revista mexicana de ciencias agrícolas,10(SPE23), 187-197.

Ezzyyani, M., Pérez, C., Sid, A., Requena, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophtora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) Annales de biología (26),35-45.

FAOSTAT. (2020). Base de datos estadísticos corporativos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019-2020). Consulta: 8 de septiembre de 2022. Disponible en: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize.

FAOSTAT. (2021). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Disponible en:https://www.fao.org/faostat/es/#datafecha=02/04/2022.

FAO-PRODAR. (2014). Manual. Productos frescos de verduras. Fichas técnicas. Ed. FAO-IICA. 80 p. http://www.fao.org/3/a-au174s.pdf

Fernández, H., E., Ruiz, J. G., Puente, E. R., y Ramos, M. A. (2013). Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México.Biotecnia,15(3), 46-50.

FIRA. 2017. Panorama agroalimentario Tomate Rojo (2017). Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. 25 p. Disponible en: https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-agraria-antonio-narro/microbiologia/panorama-agroalimentario-tomate-rojo-2017/9731893 fecha=04/01/2022

Flores, C., Buono, S. y Giorgini, S. (2012). Enfermedades de tomate: Guía consulta. 1ra. Ed. Yuto: Ediciones INTA. 136 p.

Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, *12*(6), 543-548.

García, N. H. G., Martínez, C. A. R., Hermosa, P. M. R., Monte, V. E., Aguilar, O. C. J. y González, E. C. E. (2017). Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología. 35: 58-79.

García, M. S., y Ruíz, M. G. (2005). Las MAP cinasas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. Revista de Educación Bioquímica,24(1), 4-11.

Ghazanfar, M. U., Raza, M., Raza, W., and Qamar, M. I. (2018). *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a Review.Plant Protection,2(3).

Garrido, R. M. y Vilela, S. N. (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakatea sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivo de arroz. Sientia Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo. 10(2),199-2006. Website: http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop

Goldman, G.H., C. Hayes y Harman, G. E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends Biotechnol. 12: 478-482.

Gómez, R. S. E., Gilchrist, R. E., y Reynaldi, S. (2013). Importancia del aislamiento y del rango de concentración de conidias en el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* L. Revista Colombiana de Biotecnología, XV (1),118-125. ISSN: 0123-3475

Gondal, A. S., Rauf, A., and Naz, F. (2019). Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan.*Scientific reports*,9(1), 3910.

Gozzo, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry,51(16), 4487-4503.

Grinyer, J., McKay, M., Nevalainen, H. and Herbert, B.R. (2004). Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. Current Genetics 45: 163-169.

Guedez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., and 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.

Gveroska B and Ziberoski J. (2011). The influence of *Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by *Rhizoctonia solani*. International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology. 2 (2), 1-11.

Harman, G. (2001). *Trichoderma* spp. including *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system. Disponinle en: http://www.Biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html Consultado 26 de febrero de 2022.

Harman, G.E., Lorito, M., Lynch, J.M. (2004). Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. Advances in Applied Microbiology 56: 313-330.

Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito, M. (2006). *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbiont. Nature Reviews Microbiology 2(1),43-56.

Hernández, M. J. L., Sánchez, P. M. I., González, P.J.M., Quiróz, V. J.D.C., García. O. J.G., Gill, L.H.R. (2015). Antibiosis of *Trichoderma* spp. strains native to northeastern Mexico agaisnt the patogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Brazilian journal of Microbiology 46(4),1093-1101. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420120177. www.sbmicrobiologia.org.br

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*,*158*(1),17-25.

Hohman, P., Jones, E.E., Hill, R.A. and Stewart, A. (2011). Understanding *Trichoderma* in the root system of Pinus radiata: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially seedling. Fungal biology, 115(8),759-767.

Howell, C. R. (1998). The role of antibiosis. ln: GE Harman and CP Kubicek.(Eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications.

Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. The history and evolution of current concepts. Plant disease. 87(1),4.10.

Howell C. R. and Puckhaber L S. (2005). A study of the characteristics of “P” and “Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. Biol. Control. 33: 217–222.

Hu, Y. H., Yang, H. M., Jin, J., Yang, H. H., Wang, J. P. y Zhang, R. Q. (2022). Synergistic activity of antagonistic *Trichoderma* spp and *Rhizoctonia s*olani increases disease severity on strawberry petioles. Eur. J. Plant Pathol. 164:375-389. https://doi.org/10.1007/s10658-022-02568-w

Hyder, S., Inam-ul-Haq, M., Bibi, S., Malik, A.H., Ghuffar, S. y Iqbal, S. (2017). Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent. Journal of Entomology and Zoology Studies. 5(4), 214-222.

IICA (instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura), FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Fichas técnicas. Productos Frescos de verduras. Disponible en: https://www.fao.org/3/au174s/au174s.pdf.

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

Infante, D., Martínez, B., Peteira, B., Reyes, Y., y Herrera, A. (2013). Identificación molecular y evaluación patogénica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. Frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. Biotecnología Aplicada, 30(1), 17-22.

ITIS. Integrated Taxonomic Information System. (2012). Consulta: 12 de marzo de 2022. Disponible en: http://www.itis. gov/.

Jaramillo, J., Rodríguez, V.P., Guzmán, M., Zapata, M. y Rengifo, T. (2007). Manual

Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO. Gobernación de Antioquía, MANA, CORPOICA. Centro de Investigación “La selva”. 331p.

Jasso, C.C., Martínez, G., M. A., Chávez, V.J.R., Ramírez, T. J.A. y Garza, E. U. (2012). Guía para cultivar jitomate en condiciones de malla sombra en San Luis Potosí. SAGARPA-INIFAP. Folleto Técnico No. Mx 310305-40-03-17 09-44. 54p.

Jiménez, C., Sanabria de Albarracín, Altuna, G. y Alcano, M. (2011). Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Licopersucum esculentum* L.). Nota técnica. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ), 28:1-10

Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., and Bhat, M. A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. International Journal of Modern Plant and Animal Sciences,1(2), 39-57. ISSN: 2327-3364. Journal homepage: www.ModernScientificPress.com/Journals/IJPlant.aspx

Khan, M. F.R. and Bolton, M. (2010). Management of *Rhizoctonia* root and crown rot of sugarbeet. Plant Disease Management. NDSU extension service. North Dakota State University.

Khangura, R.K., Barbertti, M. J. y Sweetingham, M.W. (1999). Caracterización y patogenicidad de especies de *Rhizoctonia* en canola. Plant Disease. 83(1), 714-721.

Katarina, H. y Verma, P. (1992). *Rhizoctonia solani*. Humedecimiento y pudrición de la raíz en colza y canola. Revista: Protección de Cultivos. 11(1),8-13.

Keijer, J. (1996). The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*. In:Sheh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijist G. (eds) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology and disease control. Kluwer Academyc Publisher, Dordecht, pp.149-162.

Koike, S. T., Gladders, P. and Paulus, A. O. (2009). Vegetable diseases. A color hanbook. Academic Press. Elsevier. 448 p.

Kumar, V. D. (2019). Microbiology for sustantainable agricultura,soil health and enviromental protection. Apple Academic Press. Inc. En: Chapter 5: Trichoderma spp.Identification and characterization for phatogenic control and its potential application. Pag 225.En Part 2: Microbiology for crop disease management and pathogenic control in sustainable environments 391 p.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, *23*(21), 2947-2948.

Latifian, M., Hamidi, E. Z., and Barzegar, M. (2007). Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma* reesei mutants under solid-state fermentation conditions. Bioresource Technology 98: 3634-3637.

López, R., Bernal, A., Ros, M., Tittarelli, F., Canali, S., Intrigioli, Pascual, J.A. (2010). Utilisation of citrus compost based growing media amended with *Trichoderma Harzianum* T-78 in *Cucumis melo* L. seedling production. Bioresource Tecnology.

101(37),18-23.
López, L. N., Segarra G., Vergara, O., López, F. A. and Trillas, M. I. (2015). Compost from forest cleaning green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. Biol. Control. 95: 31-39.
López, M. L. M. (2016). Manual técnico del cultivo del tomate (Solanum lycopersicum). San José, C.R.: INTA. 121 p. ISBN 978-9968-586-27-6. Disponible en: https://repositorio.iica.int/handle/11324/3143
Madriz, O. K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo integrado de plagas (Costa Rica). No. 63: 22-32 p.
Marques, S., Matos, C.T., Gírio, F.M., Rosendo, J. C. and Santos, J. A. L. (2017). Lactic acid production from recycled paper sludge; Process intensification by running fed-batch into a membrane-recycle biorreactor. Biochemical Engineering Journal, 120: 63-72.
Martínez, B.I., 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, S., Marcia, M. (2016). Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* sp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo en tomate. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias,*3*(6), 32-42.
Martínez, D. Y., Marquetti, I. G., Ramírez, S. G., Delgado-Oramas, B. P., and Coca, B. M. (2022). *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg como estimulante del crecimiento de *Solanum lycopersicum* (L.). Revista de Protección Vegetal,37(1), 1-8. CU-ID: 2247/v37n1e09
Martínez, R. F. E., Cervantes, D. L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández, M. L. G., Sánchez, C. L. D. T., y Rueda, P. E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la Zona Árida del noroeste De México: la importancia de su diagnóstico. European Scientific Journal, 12(18).
Mathivanan, N., K. Srinivasan y S. Chelliah. (2000). Biological control of soil-borne diseases of cotton, eggplant, okra and sunflower by *Trichoderma viride.* Z. Pflanzenk. Pflanzen. 107: 235-244.
Medeiros A. C., Melo D. R. M. D., Ambrósio, M. M. D. Q., Nunes G. H. D. S. and Costa J. M. D. (2015). Methods of inoculation of *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* in melon (Cucumis melo). Summa Phytopathologica. 41(4): 281-286.
Medellín, M.M.F. (2015). Inducción de algunos mecanismos de resistencia en tomate por la aplicación de *Trichoderma asperellum* Tc74 para el manejo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* raza 3. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. 84 p.
Méndez, V. A. (2010). A review on contributions presented at the BioMicroWorld (2009) Conference. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 5 (4), 486-487.
Mendoza, C. (1996). Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo Edo. De México. 85 pp.
Misawa, T., and Kuninaga, S. (2010). The first report of tomato foot rot caused by

Rhizoctonia solani AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. Journal of General Plant Pathology, 76(5), 310-319.

Montealegre, J., Reyes, R., Besoain, X., Pérez, L., y Herrera, R. (2003). Identificación de grupos de anastomosis de cepas de *Rhizoctonia solani* Kühn aisladas de tomates en la V Región de Chile. Boletín Micológico,18.

Nicole, B. and Chet, L. (1993). Hiphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure ang gold citochemistry of the mycoparasitic Process. The American Phytopathological Society. 83(10),1062-1071.

OEC (The observatory of Economic Complexity). (2020) Consulta: 14 de septiembre de 2022. Disponible en: https://oec.world/es/profile/hs/tomatoes

Orona. C. I., Del Toro, Sánchez. C. L., Fortis, H. M., Preciado, R. P., Espinoza, A. J. J., Rueda, P. E., y Cano, R. P. (2022). Indicadores técnico-económicos de la producción del cultivo de tomate bajo agricultura protegida en la Comarca Lagunera, México.Biotecnia, 24(3), 70-76.https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i3.1721

Ortíz, G. C. F. Bautista, M. C., Ramírez, P. J. A., Ávalos, C. N., Capello, G. S. y De la Cruz, P. D. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 86(4), 947-961.

Osorio, H. E., Hernández, C.F.D., Rodríguez, H.R., Varela, F. S. E., Estrada, D. B. y López, S.J.A. (2016). Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani in vitro*. Revista Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Número, 67:5-11.

Osuna, C.F.J., Ramírez, R.S. y Varela, L. V. (2012). Cultivo del jitomate en invernadero con sistemas hidropónicos abiertos y cerrados en el estado de Morelos. Campo Experimental Zacatepec. INIFAP. Folleto para productor no. 59. Zacatepec, Mor., México. 59 p.

Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and potential for Biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23(1), 23-54. Doi:10.1146/annurev.py.23.090185

Parveen, G., Urooj, F., Moin, S., Farhat, H., Fahim, M. F., and Ehteshamul, H. S. (2020). Estimation of losses caused by root rotting fungi and root knot nematodes infecting some important crops in lower sindh and hub, balochistan of Pakistan.Pak. J. Bot,52(2), 673-678. DOI: http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2(15)

Peralta, I. E. and Spooner, M.D. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). p 33. In Genetic Improvement of solanaceus crops, volumen 2. Tomato 33. 1ª. Edición. Edenbridge. Ltd. India. 699 p.

Pérez, M, L.; Durán, Or., L. J.; Ramírez, M., R.; Sánchez, P., J. R. y Olalde. P., V. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Rev. Mex. Fitopatol. 21:19-25.

Pérez, T.E.J., Bernal, C.A., Milanés, V.P., Leiva, M. M., Sierra, R. y Cupull, S. R. (2017). Actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia orizae* Sacc). Revista Centro Agrícola. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. ISSN on line: 2072-2001. Vol. 44, Num. 3, 13-

19.
Persley, D., T. Cooke, S. House. (2010). Diseases of Vegetable Crops in Australia. CSIRO. 304 p.
Quiroga, M. R., Rosales, E. M., Rincón, E.P., Hernández, G. E. (2007). Enfermedades causadas por hongos y nematodos en el cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), en el municipio de Villa Flores, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 25 (2), 114-120.
Quiróz, C.S. (2022). Cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) Guía técnica. INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia) Costa Rica. Sector Agroalimentario.43 p. Disponible en: https://platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/2021/Tomate_Edit.pdf
Ramos, E.Y.A., Navarro, R.I.Z., Zumaqué, L.E. O. y Violeth, J.L.B. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichodema* sp. Revista Colombiana de Biotecnología, 10(2), 23-34.
Rey, M., Delgado, J.J., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Benítez, T. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología. 17: 31-36.
Reyes, D. Y., Infante, M. D. y Martínez, C. B. (2016). Eficacia de *Trichoderma asperellum* Samuels, Liecfeld y Nirenberg para control de *Rhizoctonia solani* Kühn en condiciones de campo. Revista de Protección Vegetal, 31(2), 107-113. Recuperado en 27 de noviembre de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000200005&lng=es&tlng=es.
Rivera, C., y Wright, E.R. (2020). Apuntes de patología vegetal: Fundamentos y prácticas para la salud de las plantas. 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Facultad de Agronomía, libro digital, PDF. Consulta: 22 de diciembre de 2022.Disponible en https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/apuntes_de_patologia_vegetal_0.pdf
Rodríguez, G. D. y Wang, W. A. (2020). Efectividad a nivel in vitro de *Trichoderma* spp Nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. Agronomía costarricense. 44, (2), 109-125.
Romero, C. S. (1988). Hongos fitopatógenos. Primera Edición. Editorial: Universidad Autónoma Chapingo. Dirección del Patronato Universitario A.C. 347 p.
Romero, Cortes, T., López, P. P. A., Ramírez, L., M. y Cuervo, P, J. A. (2016). Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporoides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma caca*o). Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro. Ciencia, 31(3), 32.45.
SAGARPA. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (2017). Planeación Agrícola Nacional (2017-2030). Jitomate mexicano. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257077/Potencial-Jitomate.pdf Consulta: 19 de agosto de 2022.
Sharma, V., R. Salwan, and P.N. Sharma. (2017). The comparative mechanistic aspects

of *Trichoderma* and probiotics: scope for future research. Physiological and Molecular Plant Pathology 100:84-96.
Samaniego, F. L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón, C. A. J., y Placeres, E. I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. Revista de Protección Vegetal,33(3).
Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96(2):195-206. Disponible en: https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/phyto-96-0195
Sánchez, G. B. M., Espinoza, H. E., Villordo, P. E., Rodríguez, G. R., Mora, A. M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Tricoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) c v Montcalm. Agrociencia. 51(1), 63-79.
Sandle, T. (2014). Trichoderma. P. 644-646. En C.A. Batt y M. L. Tortorello (eds.) Encyclopedia of Food Microbiology, London, UK.
Schulze, S., Koch, H.J., Märländer, B., Varrelman, M. 2016. Effect of suggar beet variety and nonhost plant on *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB soil inoculum potential measured in soil DNA extracts. Phytopathology. 106(9),1047-1054.
Segarra, G. Vander. Ent. S, Trillas, I. Pieterse, M. J. Y. B 72. (2009). A node of convergence in induced systemic resistence triggered by fungal and bacterial beneficial microbe Plant Biology.11: 90-96.
SIAP. (2020). Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Agricultura protegida. Disponible en: https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430fecha=30/06/2021.
SIAP. (2020). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural y Pesca. México. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/ Consulta: agosto, 2022).
SIAP. (2021). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural y Pesca. México. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/ Consulta: agosto, 2022).
SIAP. (2024). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural y Pesca. México. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/ Consulta: agosto, 2024).
Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. 3 Biotech, *7*, 1-10.
Sivasithamparam, K. Ghisalberti. L. (1998) Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En Harman G.E., Kubicek, C.P. (Eds) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volumen I. Taylor and Francis Ltd., London. pp.139-191.
Srinivasachary, S., Willocquet, L. and Savary, S. (2010). Resistence to rice sheath blinght (*Rhizoctonia solani* Kuhn) [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk.] disease: current status and perspectives. Euphytica, 178(1),1-22. doi:10.1007/s10681-010-0296-7
Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., and Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo.

Revista Facultad de Agronomía,16, 509-516.
Troya, C., y Vaca, G. L. (2014). Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp en laboratorios artesanales. Proyecto de innovación Tecnológica Participativa y Productividad agrícola PITPPA. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Ecuador. 42 p.
Valencia, G. B., Vargas, V. H., Soto, J. N. U., Jiménez, N. N. y Corral, J. H. (2011). *Trichoderma* sp. native from chili región of Poanas, Durango, México antagonist against phytopathogen fungi. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 6 (2), 185-188.
Vargas, H. H. A. y Gilchrist, R. E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Revista Mexicana de Micología. Vol. 42:9-16.
Vázquez A., J. M. P. y S. G. Ramírez R. (2020). Producción orgánica de plántulas de jitomate. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos, México. Folleto técnico No. 113. 17 p.
Vincent, H., Wiersema, J., Kell, S., Fielder, H., Dobbie, S., Castañeda, A. N. P. and Maxted, N. (2013). A priorized crop wild relative inventory to help undepin global food security. Biological conservation. 167: 265-275. http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2013.08.011
Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant– pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40: 1-10.
Vivanco, M. J., Cosio, E., Loyola, V. V.M y Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y ciencia. Febrero. 68-75.
White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego, EE. UU. Academic Press 315 – 322 p.
Woo S L, Scala F, Ruocco M, Lorito M. (2006). The molecular biology of the interaction between*Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants, Phytopathology, 6:181 85.
Yedidia, I., Shoresh, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, and Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology 69, 7343-7353.
Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. and Mukherjee, P.K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*. Chemistry meets genomics. Fungal Biology reviews, 30(2),74-90.
Zhang, C.-L., Liu, S.-P., Lin, F.-C., Kubicek, C. P. and Druzhinina, I.S. (2007). *Trichoderma taxi* sp. nov., an endophytic fungus from Chinese yew Taxus mairei. FEMS Microbiology Letters 270: 90-96
Zhang, S., Xu, B., Zhang, J. and Ghan, Y. (2018). Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessmen of bioactive substances in controllig phytopathgens. Pesticide Biochemistry and Physiology, 147:59-66 doi:

10.1016/j.pestbp.2018.02.006