



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**“EFECTIVIDAD *In Vitro* DE CEPAS NATIVAS DE
Trichoderma spp. EN AISLADOS DE *Phytophthora*
parasítica D. OBTENIDOS DE PLANTAS DE JAMAICA”**

LINDA LUZ ESPARZA LUNA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: “**EFFECTIVIDAD *In Vitro* DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. EN AISLADOS DE *Phytophthora parasítica* D. OBTENIDOS DE PLANTAS DE JAMAICA**” realizada por la alumna Linda Luz Esparza Luna, bajo la dirección del Consejo Particular indicado; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR: DR. ALEJANDRO C. MICHEL ACEVES

ASESOR: M.C. L. EMILIO CASTILLO MARQUEZ

**“EFECTIVIDAD *In Vitro* DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. EN
AISLADOS DE *Phytophthora parasitica* D. OBTENIDOS
DE PLANTAS DE JAMAICA”**

**Esparza-Luna Linda Luz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2009**

Se aislaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. y *Phytophthora parasitica* en suelos cultivados con jamaica y con alta incidencia de la enfermedad “pata prieta de la jamaica”. La toma de muestras de suelo se ubicó en los municipios de Tecoaapa, Ayutla de los Libres, San Marcos y Juan R. Escudero del estado de Guerrero. Las cepas patogénicas se aislaron de tallo y raíz enfermo con síntomas evidentes de “pata prieta”. *Trichoderma* spp. se aisló directamente de suelo mediante el método de dilución de esporas en cajas Petri con el medio de cultivo Papa dextrosa agar. Se obtuvieron tres cepas de *P. parasitica* y 15 cepas de *Trichoderma*, correspondiendo a las siguientes especies, 8 a *T. asperellum*, 3 a *T. harzianum*, 1 a *T. virens*, 1 a *T. inhamatum*, 1 a *T. gamsii* y 1 a *T. longibrachiatum*. De las 23 muestras de suelo, en el 65.2% se aislaron las especies de *Trichoderma* mencionadas. Se evaluó la capacidad antagónica mediante la técnica de cultivos duales, analizando las variables: días al primer contacto entre hifas, zona de intersección, esporulación de *Trichoderma* spp., clasificación del antagonismo e interacción antagónico-patógeno. La evaluación antibiótica, se realizó mediante el método del celofán para estimar el porcentaje de inhibición de las cepas de *P. parasitica*. En ambas pruebas se empleó un experimento factorial 3 x 15 completamente al azar, resultando 45 interacciones con tres repeticiones y sus testigos. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba Tukey ($\alpha=0.05$). En la evaluación antagónica, se observó fuerte competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis contra *P. parasitica*. En el porcentaje de inhibición se obtuvieron variaciones de 25.87 a 97.5 %; las cepas con mayor porcentaje de inhibición fueron las cepas T14, T10, T9 (*T. asperellum*), la T2 (*T. harzianum*), seguidas por la cepa T13 (*T. gamsii*), la cepa con menor porcentaje de inhibición fue la T12 (*T. inhamatum*).

Palabras clave: Antagonismo, antibiosis, *Trichoderma* spp, *Phytophthora parasitica*, jamaica.

IN VITRO EFFECTIVITY NATIVES STRAINS OF *Trichoderma* SPP. IN ISOLATES OF *Phytophthora parasitica*. D. THAT WAS OBTAINED OF PLANTS OF JAMAICA.

Esparza-Luna Linda Luz, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009

The isolates natives strains of *Trichoderma* spp. and *Phytophthora parasitica* from soils cultivated with Jamaica and elevated incidence of “pata prieta de jamaica”. The take of samples of soil, was obtained from Tecoaapa, Ayutla de los Libres, San Marcos and J.R. Escudero the state of Guerrero. Pathogenic strains were taken of shoot and root with symptoms of pata prieta. *Trichoderma* was isolated directly from the soil by the dilution method in Petro dish with potato-dextrose-agar (PDA) medium culture. Was obtained three strains of *P. parasitica* and fifteen strains of *Trichoderma* spp. corresponding to the following species; eight at *T. asperellum*, three at *T. harzianum*, one at *T. virens*, one at *T. inhamatum*, one at *T. gamsii* and *T. longibrachiatum*. Of the 23 samples of soil, of the 65.2 % was obtained the *Trichoderma* spp. The antagonistic capacity was evaluated employed the technique of dual culture, analyzing the variable of days at first contact between mycelium, intersection zone, *Trichoderma* spp. sporulation, antagonism class and pathogen-antagonic interaction. The antibiotic evaluation was realized throughout the cellophane technique from estimated the percentage of inhibition of the growth mycelium of plant pathogen. In test employed a factorial experiment completely hazard, were obtained 45 interactions, with the three repetitions and witnesses. Analyses of variance were used and mean separation was achieved using the Tukey test ($\alpha=0.05$). In the antagonic evaluation was observed strong competition for space and nutrients, micoparasitic activity and antibiosis. The percentage of inhibitions of the growth mycelium of plant pathogen for the isolates varied from 25.87 at 97.5 %; the strains with major percentage of inhibition are T14, T10, T9 (*T. asperellum*) the T2 (*T. harzianum*), follow for the strains T13 (*T. gamsii*) the strains with minor percentage of inhibitions was the T12 (*T. inhamatum*).

Key words: antagonism, antibiotic, *Trichoderma* spp., *P. parasitica*, jamaica.

AGRADECIMIENTOS

A los mexicanos que pagan impuestos, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A mi consejo particular, Dr. Javier Hernández Morales, Dr. Alejandro C. Michel Aceves y M. C. L. Emilio Castillo Márquez, por el esfuerzo, el tiempo, la dedicación y el apoyo incondicional para mi persona.

A los profesores que fueron parte de mi formación académica, así también a los laboristas.

A la Fundación Produce del estado de Guerrero, por financiar parte de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A DIOS, por su amor y las bendiciones en mi vida.

A la memoria de mi abuelita, a ti, mi Titila (Ruth 1: 16-17).

A mis hijos, Ruth y Job, con amor inmensurable.

A mi esposo Marco con amor, por ser parte de mi ser.

A mi mamá Malucha y mi hermano Paco, por llenar mi vida.

A mi abuelo Enrique, mi fuente de inspiración.

A la nueva generación, Andrel, Leila, Valentina, Ivana y Ximena.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. OBJETIVOS GENERALES.....	4
2. LITERATURA CITADA.....	5
CAPITULO I: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE <i>Trichoderma</i> spp. Y OBTENCIÓN DE <i>Phytophthora parasitica</i>. CAUSANTE DE LA PATA PRIETA DE LA JAMAICA.	
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Obtención del agente causal de la pata prieta de la jamaica	10
3.1.1 Material vegetal.....	10
3.1.2 Aislamiento, purificación e identificación del patógeno.....	10
3.1.3 Pruebas de Patogenicidad.....	10
3.2 Obtención del tamaño de muestra para estimar la proporción estratificada de <i>Trichoderma</i> spp.	11
3.3 Obtención de especies nativas de <i>Trichoderma</i> spp.....	12
3.3.1 Colecta de muestras de suelo.....	12
3.3.2 Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	14
4.1 Obtención del agente causal de la pata prieta de la Jamaica	14
4.1.1 Material vegetal.....	14
4.1.2 Aislamiento, purificación e identificación del patógeno.....	14
4.1.3 Pruebas de patogenicidad	15
4.2 Obtención del tamaño de muestra para estimar la proporción estratificada de <i>Trichoderma</i> spp.....	15
4.3 Obtención de especies nativas de <i>Trichoderma</i> spp.....	16
4.3.1 Colecta de muestras de suelo.....	16
4.3.2 Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	17
5. CONCLUSIONES.....	21
6. LITERATURA CITADA.....	22

CAPITULO 2: CAPACIDAD ANTAGÓNICA Y ANTIBIÓTICA *In Vitro* DE DIFERENTES AISLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* spp. CONTRA *Phytophthora parasitica* Dastur CAUSANTE DE LA PATA PRIETA DE LA JAMAICA

RESUMEN.....	25
ABSTRACT.....	26
1. INTRODUCCIÓN.....	26
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra cepas de <i>Phytophthora parasitica</i>	28
3.1.1 Días al primer contacto entre hifas.....	29
3.1.2 Zona de intersección.....	29
3.1.3 Capacidad de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp.....	30
3.1.4 Clasificación del antagonismo.....	31
3.1.5 Interacción de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Phytophthora parasitica</i>	31
3.2 Evaluación de la actividad antibiótica <i>in vitro</i> de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra cepas de <i>Phytophthora parasitica</i>	32
3.2.1 Porcentaje de inhibición.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
4.1 Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra cepas de <i>Phytophthora parasitica</i>	34
4.1.1 Contacto de hifas.....	34
4.1.2 Zona de intersección.....	35
4.1.3 Capacidad de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp.....	40
4.1.4 Clasificación del antagonismo.....	41
4.1.5 Interacción de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Phytophthora parasitica</i>	42
5. CONCLUSIONES.....	53
6. LITERATURA CITADA.....	54
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	
1. CONCLUSIONES.....	60
2. RECOMENDACIONES.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. obtenidos por sitio de muestreo.	16
Cuadro 2. Ubicación a nivel de especie de las 15 cepas de <i>Trichoderma</i> .	17
Cuadro 3. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la zona de intersección de las confrontaciones entre las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre los aislados de <i>P. parasitica</i> en prueba dual.	35
Cuadro 4. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la zona de intersección de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la cepa PHY6 de <i>P. parasitica</i> en confrontación dual.	39
Cuadro 5. Esporulación e interacción de distintos aislados de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>Phytophthora parasitica</i> cepa PHY6 en confrontación dual.	43
Cuadro 6. Esporulación e interacción de distintos aislados de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>Phytophthora parasitica</i> cepa PHY7 en confrontación dual.	44
Cuadro 7. Esporulación e interacción de distintos aislados de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>Phytophthora parasitica</i> cepa PHY8 en confrontación dual.	44
Cuadro 8. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de cepas de <i>Phytophthora parasitica</i> por aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	45
Cuadro 9. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa PHY6 de <i>Phytophthora parasitica</i> frente a cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	48

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Colonias de <i>Phytophthora parasitica</i> con 10 días de crecimiento en medio de cultivo V8 a 23°C.	14
Fig. 2 Colonias de <i>Trichoderma</i> spp. desarrolladas en medio de cultivo PDA con 10 días de incubación a 23°C.	18
Fig. 3 Zona de intersección de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>Phytophthora parasitica</i> en cultivos apareados con 10 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$.	40
Fig. 4 Interacciones de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Phytophthora parasitica</i> en cultivo dual con 10 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$ crecidos en medio de cultivo PDA.	42
Fig. 5 Cepa PHY6 de <i>Phytophthora parasitica</i> crecida en medio de cultivo PDA donde antes creció <i>Trichoderma</i> con 7 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$.	49

INTRODUCCIÓN GENERAL

La jamaica (*Hibiscus sabdarifa* L.) pertenece a la familia de las malváceas y se cree que es originaria de la India, en donde se le conoce como serent, aleluya y flor de jamaica. Se cultiva principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo.

En México, se cultiva en el ciclo agrícola primavera-verano, bajo condiciones de temporal, y en el ciclo otoño-invierno bajo condiciones de riego. Se ha reportado que existen 150 variedades, en nuestro país se encuentran: Jersey, Chiautla, Americana, Tempranilla, Sudan, China Negra, China Roja, Coneja, Vallarta, Colima y Guerrero (Fundación Produce Guerrero, 2004).

México se encuentra entre los 10 principales países productores de jamaica con una superficie de 18 418 ha, siendo los principales estados productores: Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Michoacán, Campeche, Colima y Sinaloa (INEGI, 2004).

Ocampo (1986), menciona que se distinguen dos tipos de esta especie, uno de ellos es muy ramificado, caracterizado por una alta producción de cálices comestibles y el otro, con muy pocas ramas o sin ellas y de gran aptitud para la producción de fibra.

La especie que produce cálices es la más importante. Los ácidos y pigmentos que contienen los cálices son utilizados en la industria gastronómica para la elaboración de té, vinos, bebidas refrescantes, coloración de embutidos y como aditivo natural para mejorar el aspecto y sabor. También pueden prepararse jaleas, jarabes, dulces, mermeladas, postres, tortas, salsas. Se emplea también en la industria textil, en la cosmetología, perfumería, medicina, artesanías e incluso como planta ornamental (Rojas, 1999).

La flor de jamaica cuenta con un amplio mercado internacional, el principal destino es Estados Unidos, Alemania, Francia, Japón y Canadá; además de que no cuenta con restricciones arancelarias tiene mayor posibilidad de acceso al mercado internacional (Fundación Produce Guerrero, 2004).

El patógeno *Phytophthora parasitica* ocasiona el ahogamiento de raíces y gomosis de los cítricos, la pudrición del tallo del tabaco, la necrosis de la vaina y de los granos de frijol, la muerte por pudrición radical del ajonjolí, de la jamaica y de la fresa, la pudrición de frutos del tomate y la berenjena (Zamora y Casin, 1986).

Desde 1943, Crane señala que *Phytophthora parasitica* Dastur es el causante de la enfermedad más importante que afecta el cultivo de jamaica, ya que demerita su calidad y rendimiento. Dada la peligrosidad del hongo para el cultivo se han realizado investigaciones sobre el control de la enfermedad, Olunloyo y Adenji (1974) concluyeron con pruebas de laboratorio que Agrosan 5 W a 79 ppm inhibió la germinación de zoosporas, y en pruebas de campo a una dosis de 0.2 g por cada 100 g de semilla, redujo los daños en raíz; Hernández y Romero (1990), reportan que Ridomil MZ a 1000 ppm y 900 ppm fue el fungicida más efectivo, con un control de 100% y 75% respectivamente.

En México, Hernández y Romero (1990) asilaron e identificaron a esta especie en plantas de jamaica procedentes del Estado de Guerrero; cuyos síntomas evidenciaron una pudrición basal negra, que gradualmente se une al tejido vivo por medio de una zona no definida, extendiéndose hacia arriba a una altura de 30 a 35 cm, síntomas típicos de pata prieta, previamente descritos por Crane (1943). También observaron una incidencia de este patógeno del 30% en campo en este mismo estado. Recientemente Gonzalez-Santin (2008) estimó una incidencia del 40% de “pata prieta” en parcelas cultivadas con jamaica.

El control químico de la enfermedad ha sido estudiado, sin embargo, un uso inadecuado de los plaguicidas, puede resultar en la selección de cepas resistentes del patógeno (Grech, 1990) así como el incremento de los costos de producción y generar una contaminación al ambiente. Por otra parte, los plaguicidas solucionan problemas de forma rápida y efectiva, pero en la actualidad, la tendencia es generar un mercado orgánico, libre de plaguicidas, para tener una agricultura sustentable y en adición que los productores perciban por lo menos el doble de ingresos en comparación con un producto convencional.

El primer investigador que introdujo al género *Trichoderma* fue Persoon en 1794, posteriormente Tulasne, en 1860 determinó algunos estados sexuales de este género. Hace mas de 200 años se estudia la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre otros microorganismos y aún se continúan descubriendo nuevas especies y por lo tanto interacciones nuevas (Druzhinina *et al.*, 2006).

El uso de organismos fungosos con capacidad antagónica se implementó primero contra fitopatógenos con origen en el suelo que causan enfermedades en las raíces de las plantas (Wilson y Backman, 1998), por lo que actualmente se considera una importante alternativa en el manejo de enfermedades. El género *Trichoderma* ha sido motivo de estudio frente a diversos organismos fungosos fitopatógenos de importancia agrícola por su gran capacidad antagónica, principalmente contra los géneros *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Fusarium* (Chet *et al.*, 1981; Papavizas, 1985).

Trichoderma spp. es de distribución cosmopolita, se presenta principalmente en zonas que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación le ha dado a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos y climas (Papavizas, 1985).

Los mecanismos de acción que presentan distintas especies del género *Trichoderma* se basan principalmente en la fuerte capacidad competitiva por espacio y nutrientes, (Papavizas *et al.*, 1985; Chet 1987; Harman, 2000), también se han reportado como parásitos de un gran número de organismos fungosos fitopatógenos. (Ghisalberti *et al.*, 1990, Bruce *et al.*, 1995). El micoparasitismo se distingue por tener cuatro fases o componentes, las cuales son: a) crecimiento, en el que un estímulo químico atrae al antagonista, b) reconocimiento específico, probablemente mediado por lectinas en las superficies celulares de patógeno-antagonista, c) enrollamiento de hifas de *Trichoderma* alrededor del patógeno y d) la secreción de enzimas pectinolíticas que degradan la pared del patógeno.

Otro mecanismo de acción es la antibiosis, caracterizada por la producción de metabolitos antibióticos ya sea de naturaleza volátil o no volátil (Dennis y Webster 1971a/b; Chet, 1987; Sid Ahmed *et al.*, 2003) a los que se les atribuyen cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Sivan y Chet, 1989). Esta antibiosis se puede dar por enzimas hidrolíticas, como las celulasas, quitinasas, glucanasas, proteasas y xylanasa (Bruce *et al.*, 1995) o por metabolitos secundarios como tricolorziaminas, trichodermina, gliotoxina, viridina, alquil pirona, isocianidas y el isonitrin, entre otros antibióticos (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991).

Por otra parte, también se conoce que el género *Trichoderma* induce resistencia a la planta, incrementando la respuesta de crecimiento y tolerancia al estrés, ocasionada por factores adversos, como la presencia de fitopatógenos (Baker, 1988; Yedidia *et al.*, 1999; Harman, 2000-2004; Howell, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2005). Al ser inducida la resistencia a la planta, se estimulan los mecanismos naturales de defensa, como la producción de hormonas, peróxidasa y compuestos fenólicos, mismos que provocan cambios bioquímicos y formación de barreras físicas (Yedidia, Benhamou and Chet, 1999).

Los mecanismos de acción anteriormente mencionados no son excluyentes uno del otro, sino que pueden actuar sinérgicamente en el control de los patógenos, aunque la importancia relativa de cada uno de ellos va a depender exclusivamente de la interacción planta-patógeno-antagonista y de las condiciones ambientales que prevalezcan (Chet and Inbar, 1994; Harman, 2000).

Por lo anterior, se requiere de un uso más extenso del control biológico y por ello es necesario la obtención de agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, agentes de control biológico nativos que sean capaces de competir con el patógeno dentro de un mismo nicho ecológico; para esto es conveniente distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y la medida en que las mismas se expresaran dentro de cada ecosistema (Andrews, 1992).

Considerando estos aspectos surge el presente trabajo de investigación, teniendo como objetivos los siguientes:

2. OBJETIVOS GENERALES

Obtener de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con capacidad antagónica contra *Phytophthora parasítica* causante de la enfermedad “pata prieta”, aisladas de parcelas de jamaica, en el estado de Guerrero.

Conocer mediante la evaluación *in Vitro*, la capacidad antagónica de especies nativas de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora parasítica*.

3. LITERATURA CITADA

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635
- Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as a plant growth regulators. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 7:97-106
- Bruce, A., Srinivasan, U., Staines, H. J and Highley, T. L. 1995. Chitinasa and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. And their role in biocontrol of wood decay fungi. *International Biodeterioration and degradation* 337-353
- Chet, I., Harman, G. E. and Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbiology Ecologica* 7:29-38
- Chet, I., and J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry Biotechnology* 48:37-43
- Crane, J. C. 1943. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a fiber crop. *Economic Plants of interest to the Americas*. USDA 47 pp
- Ezziyyani, M., Requena, M. E. y Candela, M. E.. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología* 27:143-153
- Fundación Produce. 2004. Panorama actual de la jamaica. Guerrero si produce en: Órgano informativo de la Fundación Produce 8: 4-6
- Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil biology biochemistry* 11 (23):1011-1020
- Gonzales-Santin, L. L. 2008. Etiología de la enfermedad “pata prieta de la Jamaica” (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología agrícola, Chapingo, Edo. de México 63 p
- Grech, N.M. 1990. Fungicide resistance in plant pathogenic fungi: the problems and ways to cope. *California Grow* 14(4): 36-37
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T- 22. *Plant Disease* 84:377-393
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de la “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* 50-54 p

- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10
- INEGI. 2004. Anuario Estadístico de Producción agrícola en los Estados Unidos Mexicanos. Biblioteca Digital. <http://www.inegi.gob.mx> Fecha de consulta: 10/Octubre/2006
- Ocampo, R. 1986. Cultivo y utilización de Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) en Costa Rica. Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José-Costa Rica. Mimeografiado 5 p
- Olunloyo, O. A. and Andeji M. O. 1974. Relative susceptibility of roselle and Kenaf to the three isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda De Haan) Tucker, *Nigeria Agricultural Journal* 11: (1) 66-70
- Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biological control. *Annual Review Phytopathology* 23:23-54
- Rojas, P. J. P. 1999. Perspectivas de ampliación del mercado de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), del estado de Guerrero. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. División de Ciencias Económico Administrativas. Chapingo, México 67 p
- Wilson, M. and Backman, P. A. 1998. Biological control of plant pathogens. IN: J. R. Rubozan (ed.) *Handbook of pest management*. Marcel Dekker. New York. USA 309-335
- Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied environmental microbiology* 65:1061-1070
- Zamora, V. y Casin, C. J. 1986. El género *Phytophthora* como causante de enfermedades en los cítricos. *Boletín de reseña de cítricos y frutales*. La Habana, Cuba 56 p

I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. Y OBTENCIÓN DE *Phytophthora parasítica* D.
CAUSANTE DE LA “PATA PRIETA DE LA JAMAICA”

ISOLATE AND MORPHOLOGIC AND MOLECULAR CHARACTERISTIC OF
NATIVES STRAINS OF *Trichoderma* spp. AND OBTENTION OF *Phytophthora*
parasítica D. CAUSER OF THE PATA PRIETA OF THE JAMAICA.

Linda Luz Esparza-Luna¹, Javier Hernández-Morales¹, Alejandro Casimiro Michel-Aceves², Luis Emilio Castillo Márquez³.

RESUMEN

Se identificaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cultivados con jamaica y con alta incidencia de *Phytophthora parasítica*, causante de la enfermedad “pata prieta de la jamaica”. La toma de muestras de suelo, se ubicó dentro de la zona productora de jamaica de los municipios de Tecoaapa, Ayutla de los Libres, San Marcos y Juan R. Escudero del estado de Guerrero. Las cepas patogénicas se aislaron de muestras de tallo y raíz con síntomas de pata prieta. *Trichoderma* spp. se aislaron mediante el método de dilución de esporas en placa con el medio de cultivo Papa dextrosa agar (PDA), de cada toma de suelo se pesó 1 g y se diluyó en 10 mL (proporción 1/10 p/v) de agua destilada estéril hasta obtener diluciones 1/100 y 1/1000. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días. Se obtuvieron 3 cepas de *P. parasítica* y 15 cepas de *Trichoderma*, de las cuales 8 pertenecen a la especie *T. asperellum*, 3 a *T. harzianum*, 1 a *T. virens*, 1 a *T. inhamatum*, 1 a *T. gamsii*, y 1 a *T. longibrachiatum*. De las 23 muestras de suelo, en el 65.2% se aislaron las especies de *Trichoderma* mencionadas. Dichas especies nativas representan una alternativa biológica para el manejo de la pata prieta de la jamaica.

Palabras claves: *Trichoderma* spp., *Phytophthora parasítica*, jamaica.

¹Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México; CP 56230.

²Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Dpto. Fitotecnia, Iguala, Guerrero; CP 40000.

³Universidad Autónoma Chapingo, Dpto. Parasitología Agrícola, Chapingo, Edo. de México, CP 56230.

ABSTRACT

Was identified natives strains of *Trichoderma* from soils cultivated with jamaica and elevated incidence of *Phytophthora parasitica* causer of pata prieta of the jamaica. The take of samples of soils, was obtained in the producing jamaica's zone of the localities of Tecoanapa, Ayutla de los Libres, San Marcos and Juan R. Escudero of the state Guerrero. Pathogenic strains its taken of shoot and root with symptoms of pata prieta. *Trichoderma* spp. was isolated directly from the soil by the dilution method in Petri dish with potato-dextrose-agar (PDA) medium culture, every one sample of soil was weighted one g and was diluted in 10 mL (proportion 1/10 p/v) in esteril destilated water from obtain dilutions 1/100 y 1/1000. The Petri dishes was incubated at ambient temperature in a period of 10 days. Was obtained three strains of *P. parasitica* and fifteen strains of *Trichoderma* spp. corresponding to the following species; eigth at *T. asperellum*, three at *T. harzainum*, one at *T. virens*, one at *T. inhamatum*, one at *T. gamsii* and one *T. longibrachiatum*. Of the 23 samples of soil, of the 65.2 % was obtained *Trichoderma* species isolated from soil in jamaica cultivars represent a resource for evaluation as biocontrol agents against pata prieta of the jamaica.

Key words: *Trichoderma* spp., *Phytophthora parasitica*, jamaica.

1. INTRODUCCIÓN

Desde 1943, Crane señala que *Phytophthora parasitica* Dastur es el causante de la enfermedad más importante que afecta el cultivo de jamaica, ya que demerita su calidad y rendimiento. En México, Hernández y Romero (1990) asilaron e identificaron a esta especie en plantas de jamaica procedentes del Estado de Guerrero; cuyos síntomas evidenciaron una pudrición basal negra, que gradualmente se une al tejido vivo por medio de una zona no definida, extendiéndose hacia arriba a una altura de 30 a 35 cm, síntomas típicos de pata prieta, previamente descritos por Crane (1943). También observaron una incidencia de este patógeno del 30% en campo en este mismo estado. Recientemente Gonzalez-Santin (2008) estimó una incidencia del 40% de “pata prieta” en parcelas cultivadas con jamaica.

El control químico de la enfermedad ha sido estudiado, sin embargo, un uso inadecuado de los plaguicidas, puede resultar en la selección de cepas resistentes del patógeno (Grech, 1990) así como el incremento de los costos de producción y generar una contaminación al ambiente.

Es por esta razón que el uso de organismos fúngos con capacidad antagónica se implementó primero contra fitopatógenos con origen en el suelo que causan enfermedades en las raíces de las plantas (Wilson y Backman, 1998), por lo que actualmente se considera una importante alternativa en el manejo de enfermedades. El género *Trichoderma* ha sido motivo de estudio frente a diversos organismos fúngos fitopatógenos de importancia agrícola por su gran capacidad antagónica, principalmente contra los géneros *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Fusarium* (Chet *et al.*, 1981; Papavizas, 1985).

Los mecanismos de acción que presentan distintas especies del género *Trichoderma* se basan principalmente en la fuerte capacidad competitiva por espacio y nutrientes, (Papavizas 1985; Chet 1987; Harman, 2000), también se han reportado como parásitos de un gran número de organismos fúngos fitopatógenos (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991), de igual forma se caracterizan por la producción de metabolitos antibióticos ya sea de naturaleza volátil o no volátil (Dennis y Webster 1971a/b; Chet, 1987; Sid Ahmed *et al.*, 2003). De acuerdo con Ezziyyani *et al.*, (2005) el género *Trichoderma* induce resistencia de la planta, incrementando la respuesta de crecimiento y tolerancia al estrés ocasionado por factores adversos como la presencia de fitopatógenos.

Por lo anterior se requiere de un uso más extenso del control biológico y por ello es necesario la obtención de agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, agentes nativos que sean capaces de competir con los patógenos dentro de un mismo nicho ecológico (Andrews, 1992); para esto es conveniente distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y la medida en que las mismas se expresaran dentro de cada ecosistema.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener cepas de *Phytophthora parasitica* causante de la enfermedad “pata prieta de la jamaica”.

Aislar e identificar diferentes especies nativas del género *Trichoderma* en suelos cultivados con jamaica en la franja productora del estado de Guerrero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención del agente causal de la pata prieta de la jamaica

3.1.1 Material vegetal

Se colectaron plantas enfermas de jamaica criolla que presentaban una evidente marchitez y necrosamiento basal del tallo y de las axilas de las ramas laterales inferiores. Las muestras se colectaron en los meses de Noviembre y Diciembre del 2007 de las localidades de Tecoaapa y Tlaltenango, Edo. de Guerrero. Dichas plantas se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados para su procesamiento.

3.1.2 Aislamiento, purificación e identificación del patógeno

Cada planta de jamaica se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de suelo presente en el tallo y raíz, se cortaron pequeñas porciones vegetativas de 1 cm de la zona de avance de la enfermedad, cada trozo se desinfectó previamente con hipoclorito de sodio al 1.5% por 2 min y posteriormente se hicieron pasar por agua destilada estéril para eliminar los residuos del hipoclorito de sodio; posteriormente se sembraron los trozos de tallo afectado por el patógeno, en cajas Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y en medio de cultivo jugo de tomate-agar (V8). De los aislamientos obtenidos del tallo, se reaislaron y se purificaron mediante la técnica de punta de hifa.

Las diferentes cepas obtenidas, se identificaron morfológicamente en base a lo descrito por Frezzi (1950) y Waterhouse (1959) para la especie de *Phytophthora parasitica*.

3.1.3 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en base a los postulados de Koch, cada uno de los aislados obtenidos se sembró en cajas Petri con medio de cultivo V8 para su incremento masivo, una vez que el micelio invadió por completo el medio de cultivo se tomaron 10 discos de 5 mm de diámetro y se colocaron en una caja Petri con 20 mL de agua destilada estéril para cada aislado, estos se incubaron a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) para promover la formación de esporangios y zoosporas.

Las soluciones de zoosporas para cada aislamiento no se ajustaron a una concentración específica ya que la única finalidad era la comprobación de la patogenicidad. Se inocularon 6 plantas sanas de jamaica con 2 meses de crecimiento por cada aislado de *P. parasitica* seleccionado, la inoculación se realizó por inmersión de raíz en una solución de zoosporas durante 10 minutos, se tuvieron 6 plantas testigo a las cuales solo se les sumergió la raíz en agua destilada estéril, las plantas se mantuvieron en invernadero hasta la aparición de síntomas. Se consideraron enfermas cuando se hicieron visibles los primeros síntomas de marchitez, las plantas que presentaron síntomas se llevaron al laboratorio para reaislar al patógeno.

3.2 Obtención del tamaño de muestra para estimar la proporción estratificada de *Trichoderma* spp.

Debido a que los municipios en donde se realizaron las colectas del material de estudio presentaban características y superficies de cultivo distintas y a que se deseaba estimar la proporción del organismo antagónico presente en esta región, se decidió utilizar un muestreo cualitativo estratificado para determinar el tamaño óptimo de muestra en la región, tomando como estratos a las diferentes localidades. Se realizó un muestreo preliminar para obtener el valor de los parámetros necesarios para el cálculo de n .

Analizando la información acerca de las características de los estratos se optó por calcular el tamaño de muestra mediante asignación de Neyman. En este tipo de asignación la ecuación para el cálculo del “tamaño de muestra común” y del “tamaño de muestra del i -ésimo estrato” involucra la presencia del término w_i , el cual es definido como la importancia del i -ésimo estrato en el estudio.

En la *asignación de Neyman*, existe una ecuación especial para determinar el valor de w_i esta ecuación genera los valores de w_i , en base al valor de las varianzas de las proporciones de los estratos. Entonces, estratos con varianzas de las proporciones pequeñas tendrán un tamaño de muestra menor que aquellos que presenten una mayor varianza. La fórmula para calcular el tamaño de muestra es:

$$n \geq \frac{\left(\sum_{i=1}^L \{U_i \sqrt{p_i q_i}\} \right)^2}{N^2 \left[\frac{d}{Z_{1-\alpha/2}} \right]^2 + \sum_{i=1}^L U_i p_i q_i}$$

$$n \geq \frac{U_{1-\alpha/2} \sqrt{p \cdot q_i}}{\sum_{i=1}^L (U_{1-\alpha/2} \sqrt{p \cdot q_i})} \quad n \geq n w_i$$

n = Tamaño de muestra común

N = Total de unidades de muestreo en que esta dividida la población

L = Número de estratos en que se divide la población

n_i = Tamaño de muestra para el i -ésimo estrato

U_i = Número de unidades de muestreo presentes e el i -ésimo estrato.

p_i = Proporción muestral que se presenta en el i -ésimo estrato

q_i = $1-p_i$ = porcentaje de la población que no presenta la característica deseada en el i -ésimo estrato

w_i = Importancia del i -ésimo estrato

$z_{1-\alpha/2}$ = Cuantil de la distribución normal estándar con una probabilidad menor o igual a $1-\alpha/2$

d = Máximo error o alejamiento con respecto al verdadero valor del parámetro que el investigador esta dispuesto a aceptar

3.3 Obtención de especies nativas de *Trichoderma* spp.

3.3.1 Colecta de muestras de suelo

En cada sitio de muestreo se tuvieron 5 tomas de 1 kg de suelo bajo el método de “cinco de oro”, las cuales se mezclaron y homogeneizaron. De esta mezcla se eligió 1 kg de suelo. Cada toma de suelo se realizó a una profundidad de 20 cm y se eliminó la materia orgánica superficial y los primeros 4 cm de suelo. Las tomas de suelo se transportaron en bolsas de plástico al Laboratorio Fitopatología del Colegio de Postgraduados, mismas que se mantuvieron en refrigeración a 10°C hasta el momento de su procesamiento.

3.3.4 Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.

Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron mediante el método de dilución de esporas en caja Petri, tomándose de cada muestra compuesta 1 gr de suelo diluido en 10 mL (proporción 1/10 p/v) de agua destilada estéril hasta obtener diluciones 1/100 y 1/1000. De

las diluciones 1/100 y 1/1000 se tomó una alícuota de 0.5 mL y se distribuyó homogéneamente sobre una caja Petri que contenía medio de cultivo PDA. Estas, se incubaron a temperatura ambiente por 10 días. Se utilizaron en total 10 cajas Petri por cada muestra compuesta de suelo.

Las colonias de *Trichoderma* spp. se reconocieron por su forma de crecimiento en parches verdes y formación de anillos concéntricos. De cada aislado se realizó la purificación por medio de cultivos monosporicos.

Para la caracterización morfológica de cada especie se midió el largo y ancho de 100 conidios y 50 fiálides, el diámetro de 30 clamidosporas; empleando el programa computacional Digital Image Tool versión 1.2, que realiza la función de una regla de medición, proporcionando de forma fácil y rápida mediciones en micras. También se observó la forma, color del conidio y disposición de las fiálides.

Se confirmó esta identificación, analizando los diferentes aislados mediante el uso de técnicas moleculares. Para la identificación molecular, primero se realizó la extracción de DNA con la metodología propuesta por Arhens y Seemüller (1992), utilizando el micelio del patógeno crecido en medio de cultivo PDA. Posteriormente, se amplificó un fragmento específico de los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S y 28S que son altamente conservados y se encuentran unidos internamente por las regiones ITS1 e ITS2, utilizando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, *et al.*, 1990). Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes: Buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.2 mM, Taq DNA polimersa 1U (Invitrogen), 80 ng de DNA y 20 pmol de cada iniciador. El programa de amplificación consistió de 1 ciclo a 95 °C durante 2min, 30 ciclos [95 °C por 1min; 50 °C por 30s y 72 °C por 2min] y un ciclo de extensión final durante 10 min a 72 °C. El fragmento amplificado se purificó con el KIT Quiagen® según las especificaciones del fabricante y fueron secuenciados con los mismos iniciadores ITS y con un secuenciador automático ABI 3700. Las secuencias de nucleótidos obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nih.gov)

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Obtención del agente causal de la pata prieta de la jamaica

4.1.1 Material vegetal

Del material enfermo procesado en el laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, se aislaron 3 cepas de *Phytophthora parasitica*, a las que se les denominó PHY6, PHY7 y PHY8.

4.1.2 Aislamiento, purificación e identificación del patógeno

Las 3 cepas aisladas, se hicieron crecer en medio de cultivo V8 a $\pm 23^{\circ}\text{C}$; las cuales presentaron las siguientes características macroscópicas: colonias de color blanquecino con aspecto algodonoso y mostraron el típico crecimiento “arrosetado o aborregado” (Fig. 1).

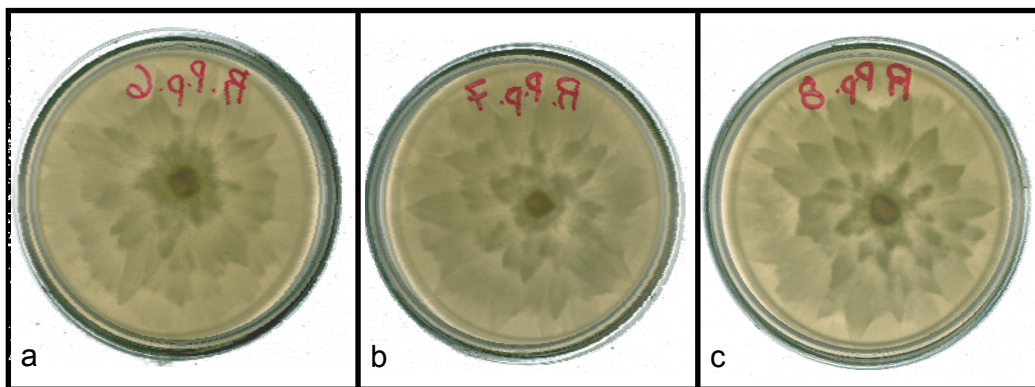


Fig. 1 Colonias de *Phytophthora parasitica* con 10 días de crecimiento en medio de cultivo V8 a $\pm 23^{\circ}\text{C}$. a) *Phytophthora parasitica* cepa PHY6 b) *Phytophthora parasitica* cepa PHY7 c) *Phytophthora parasitica* cepa PHY8.

Las características microscópicas observadas fueron: micelio cenocítico muy ramificado con aspecto rizoidal, esporangióforos simples y ramificados en simpodio con ramificaciones cortas o largas, presenta esporangios globosos, limoniformes de $41.5 \times 28 \mu$ en relación largo y ancho y con papila grande, dichas características se ajustan a lo descrito por Frezzi (1950) y Waterhouse (1956) para la especie *P. parasitica* Dastur.

Crane, (1943) menciona que este patógeno, es el de mayor importancia en el cultivo de la jamaica, ya que demerita su rendimiento y causa pérdidas hasta del 40% en campo; Hadad *et al.*, (1976) reportan que *P. parasitica* es uno de los principales patógenos del cultivo de la jamaica en Indonesia; de forma similar, en México, Hernández y Romero (1985) aislaron e identificaron a *P. parasitica* como causante de la enfermedad “pata prieta de la jamaica”, reportando que este patógeno llega a ocasionar pérdidas de hasta el 30 % en campo. Recientemente, Gonzalez-Santin (2008) estimó una incidencia del 40% de “pata prieta” en parcelas cultivadas con jamaica, en el estado de Guerrero.

4.1.3 Pruebas de patogenicidad

Las 3 cepas seleccionadas produjeron síntomas de marchitez, sin embargo la cepa PHY6 produjo los primeros síntomas al segundo día después de la inoculación (DDI), las cepas PHY7 y PHY8 produjeron síntomas al tercer DDI. Hernández (1990) probó 4 densidades de inóculo de *P. parasitica*, encontrando un mayor porcentaje de infección a mayores cantidades de inóculo, teniendo así, las concentraciones 2500 y 5000 como las de mayor porcentaje de infección.

Olunloyo y Adenji (1974) realizó observaciones del modo de infección de *P. parasitica* en raíces jóvenes de jamaica en las que el patógeno causó severos daños y un consecuente marchitamiento de plantas.

4.2 Obtención del tamaño de muestra para estimar la proporción estratificada de *Trichoderma* spp.

Cuando se empleó la asignación de Neyman para calcular el tamaño de muestra óptimo para estimar la proporción estratificada, se obtuvo un tamaño de muestra de 23 has, contenido en cuatro estratos, mismos que debido a sus características en relación de superficie de producción de jamaica, indicaron que a mayores superficies se obtuvo un mayor tamaño de muestras y viceversa. Las 23 has se asignaron entre los municipios de Tecoaapa, Ayutla de los Libres, San Marcos y Juan R. Escudero. Se muestra la distribución del Cuadro 1.

Cuadro 1. Aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos por sitio de muestreo.

ESTRATOS	NO. DE HAS MUESTREADAS	SITIO MUESTREO (LOCALIDAD/MUNICIPIO)
1	10	CBTA, Tecoaapa
		Xalpatlahuac 1, Tecoaapa
		La lagunita, Tecoaapa
		Las Animas, Tecoaapa
		Xalpatlahuac 2, Tecoaapa
		Xalpatlahuac 3, Tecoaapa
		Huamuchapa, Tecoaapa
		Cruz Quemada, Tecoaapa
		San Isidro 1, Tecoaapa
		San Isidro 2, Tecoaapa
2	5	Coltzalzin, Ayutla
		Colotepec, Ayutla
		San José la Hacienda, Ayutla
		El aserradero, Ayutla
3	1	El Cortijo, Ayutla
		Las cruces, San Marcos
		Chacalapa, J. R. Escudero
4	7	El Zapote, J. R. Escudero
		Tepehuaje, J. R. escudero
		Palo gordo, J. R. Escudero
		Tierra colorada, J. R Escudero
		Villa Guerrero, J. R. Escudero
		Tierra colorada, J. R. Escudero

4.3 Obtención de especies nativas de *Trichoderma* spp.

4.3.1 Colecta de muestras de suelo

Las muestras de suelo de donde se obtuvieron las especies nativas de *Trichoderma* se colectaron dentro del corredor productor-comercial jamaiquero más importante del estado de Guerrero. Dichas muestras fueron colectadas durante las estaciones de Verano, Otoño e Invierno 2007 en cultivares de jamaica afectados con la enfermedad “pata prieta”.

4.3.2 Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.

De las 23 muestras de suelo colectadas dentro del corredor productor-comercial jamaiquero del estado de Guerrero, se obtuvieron 15 cepas nativas de *Trichoderma* spp., lo que significó una proporción del 65.2 %.

Las 15 cepas del género *Trichoderma* se identificaron por las características morfológicas que resultaron: conidioforo hialino muy ramificado no verticilado fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides nacidos en pequeños racimos terminales (Barnett y Hunter, 1972) aunque también presenta conidios globosos o subglobosos, elipsoidal, obovoide u oblongo de color verde oscuro o verde olivo.

De las 15 cepas aisladas ocho pertenecen a la especie *Trichoderma asperellum*, tres a *Trichoderma harzianum*, una a *Trichoderma virens*, una a *Trichoderma inhamatum*, una a *Trichoderma gamsii*, y una a *Trichoderma longibrachiatum*. Las cuales se muestran en el Cuadro 2 y Fig. 2.

La identidad de las especies mencionadas, se confirmó con la identificación molecular mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas en el banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nih.gov), a excepción de la especie *T. harzianum*, a la que solo se le identificó morfológicamente.

Cuadro 2. Ubicación a nivel de especie de las 15 cepas de *Trichoderma*.

CODIGO CEPAS	ESPECIE	BUSQUEDA Y COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA CON EL GEN BANK	
T1, T4, T9, T10, T11, T14, T15, T5	<i>T. asperellum</i>	gi 169117643 gb EU280122.1 <i>Trichoderma asperellum</i> strain GJS. 1110	0.0
		gi 169117631 gb EU280110.1 <i>Trichoderma asperellum</i> strain CIB. 1110	0
T6	<i>T. virens</i>	gi 4323321 gb AF099007.1 AF099007 <i>Trichoderma virens</i> strain G. 1140	0.0
		gi 4323319 gb AF099005.1 AF099005 <i>Trichoderma virens</i> strain G. 1140	0.0
		gi 4323322 gb AF099008.1 AF099008 <i>Trichoderma virens</i> strain G. 1140	0.0
T12	<i>T. inhamatum</i>	gi 148790965 gb EF191310.1 <i>Hypocrea lixii</i> strain JB RSA122 1.. 1078	0.0
		gi 148790956 gb EF191301.1 <i>Hypocrea lixii</i> strain JB GA3804 1.. 1078	0.0
		gi 32394941 gb AY154955.1 <i>Trichoderma inhamatum</i> Ir. 286 18S .. 1078	0.0
T13	<i>T. gamsii</i>	gi 169117650 gb EU280129.1 <i>Trichoderma gamsii</i> strain DAOM 23 1100	0.0
		gi 152937921 gb EF488153.1 <i>Trichoderma gamsii</i> strain UNISS 2. 1100	0.0
		gi 152937922 gb EF488154.1 <i>Trichoderma gamsii</i> strain UNISS 2. 1098	0.0
T19	<i>T. longibrachiatum</i>	gi 189212397 gb EU744190.1 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> strain. 1124	0.0
		gi 169117620 gb EU280099.1 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> strain. 1116	0.0

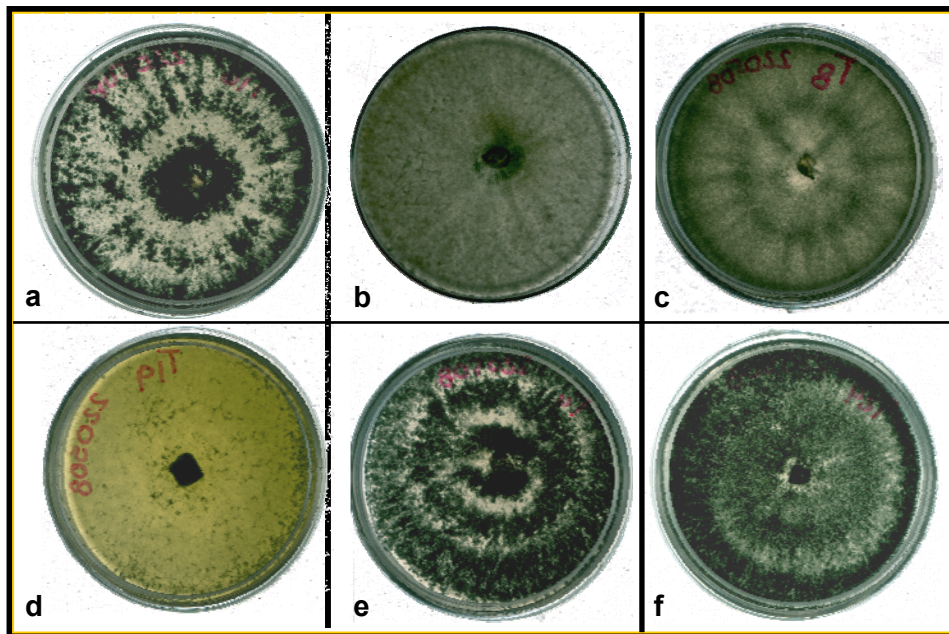


Fig. 2 Colonias de *Trichoderma* spp. desarrolladas en medio de cultivo PDA con 10 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$. a) *T. asperellum* b) *T. gamsii* c) *T. virens* d) *T. longibraquiatum* e) *T. harzianum* f) *T. inhamatum*

Las características morfológicas que presentaron los aislados que corresponden a la especie *T. asperellum* fueron: conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos cuyas medidas fueron de $4.6\text{-}6.1\mu \times 2.3\text{-}3.7\mu$ de largo por ancho, conidios de una célula, ovoides, subglobosos y elipsoidales nacidos en pequeños racimos terminales de color verde fuerte y verde olivo, el largo y ancho del conidio osciló entre los $3.69\mu \times 2.05\mu$, presentaron clamidosporas intercalares, terminales o solitarias, verdes, cuyas medidas oscilan entre $7.5\text{-}8.8\mu \times 7.4\text{-}12.8$ de largo por ancho, distancia entre septos de 15 a 21μ . Ze-Fen (2007) aisló de la rizosfera de tabaco dos nuevas especies de *Trichoderma*, una de ellas *T. yunnanense*, en la cual observó similitudes morfológicas con *T. asperellum*, sin embargo, la diferencia entre estas especies es el crecimiento rápido de las colonias de *T. asperellum* así como esporulación abundante y una fina ornamentación conidial. Estas características mencionadas anteriormente se pudieron observar para la especie aquí descrita.

Trichoderma. harzianum presentó hifas hialinas, conidioforos hialinos muy ramificados no verticilados, fialides individuales o en grupos, de $3.5\text{-}7.5\mu \times 2.5\text{-}3.8\mu$ de largo por ancho, fuertemente constreñidas en su base, conidios de una célula, subglobosas, obovoides o elipsoidales, el largo y ancho osciló entre $3.3\mu \times 2.9\mu$, el color que se observó fue verde fuerte o verde olivo; clamidosporas intercalares, terminales o solitarias de 5μ a 13μ de

diámetro, De la misma forma, Rifai (1969) y Bissett (1991) concuerdan con lo señalado anteriormente en sus descripciones morfológicas para esta especie.

La cepa de *T. virens* presentó hifas hialinas, los conidioforos ramificados con o sin ramificaciones laterales que terminan en largas porciones de micelio, grupos de fialides de 3 o 6, cuyas medidas oscilaron entre $20\mu \times 2.6-3\mu$ de largo por ancho, conidios de una célula, elipsoidales u obovoides cuyas medidas fueron $3.7\mu \times 3.3\mu$ en relación largo por ancho, presentan una coloración verde muy fuerte, clamidosporas abundantes, terminales, intercalares, principalmente solitarias y esféricas, de diámetro de 6μ , también presentó periformes cuyas medidas fueron de $11\mu \times 13\mu$. Dichas características concuerdan con lo señalado por Bissett (1991). El desarrollo de las colonias de esta especie, pigmentó el medio de cultivo PDA de color amarillo-café, a medida que la colonia crecía, la coloración en el medio se intensificó, esto se observó con mayor claridad al reverso de la caja Petri. En ninguna otra especie aquí descrita se logró ver esta característica

La morfología que presentó *T. inhamatum*, fueron: hifas hialinas, distancia entre septos de 14 a 21μ ., presentó ramificaciones cortas, conidioforos ramificados, fialides hialinas en grupos y solitarias, anchas en su base, conidios de una célula obovoides y subglobosos de color verde oscuro, midiendo $2.7\mu \times 2.4\mu$ en relación largo por ancho, clamidosporas globosas, terminales o intercalares, cuyas medidas oscilaron entre $5.9-7.7\mu \times 6.6-8.4\mu$ en relación largo por ancho. Bissett (1991), Morales-Barrera y Cristiani-Urbina (2008) en trabajos previos describen a esta especie, concordando con las características observadas en esta investigación.

Trichoderma gamsii mostró las siguientes características morfológicas: hifas hialinas, conidioforos hialinos que a menudo terminan en una larga extensión estéril, fialides comúnmente solitarias e intercalares, conidios elipsoidales u obovoides de $3.3\mu \times 2.8\mu$ en relación largo por ancho, de color verde claro o amarillo, clamidosporas abundantes intercalares, terminales y subglobosas. El crecimiento de las colonias en medio de cultivo PDA con 10 días de incubación a temperatura ambiente ($\pm 23^\circ\text{C}$), mostró un lento crecimiento; micelio aéreo blanquecino, coloración amarillo pálido y poca esporulación, dichas características macroscópicas no las mostraron ninguna de las especies aquí descritas. Jaklitsch *et al.*, (2006) mencionan las mismas características para esta especie y señalan que la especie con mayor similitud morfológica es *T. koningii*, aunque la diferencia más evidente

entre estas dos especies es la proliferación de fiálides, mayor tamaño en conidios y que los conidioforos en *T. gamsii* no son tan uniformes como en *T. koningii*.

Trichoderma logibrachiatum presentó las siguientes características morfológicas: hifas hialinas, conidioforos hialinos, ramificaciones largas con una septa conspicua y distante, fialides solitarias o en grupo, algunas fialides son largas y no constreñidas en su base, conidios de una célula, obovoides o elipsoidales de color verde olivo, cuyas medidas fueron $3.4 \mu \times 2.9 \mu$ en relación largo por ancho. Bissett (1991), concuerdan con las características señaladas en el presente trabajo. De forma similar que *T. virens*, existió una pigmentación al medio de cultivo PDA y se intensificó el color conforme crecía la colonia, a diferencia de *T. virens* se observó una tonalidad amarilla fosforescente que se notaba con mayor claridad al reverso de la caja Petri. Esta característica no la presentó ninguna otra especie descrita en este documento.

La presencia de diferentes especies de *Trichoderma* en suelos jamaqueros muestra su naturaleza cosmopolita de éste género (Jensen y Wolffhenchel, 1995) sin excluir que es un habitante natural del suelo.

Debido a la similitud entre características morfológicas dentro de las especies del género *Trichoderma*, ha sido necesaria la reclasificación de dichas especies (Bissett *et al.* 2003). Recientemente el número de especies filogenéticamente distintas a incrementado considerablemente, esto se debe principalmente a la introducción de las técnicas moleculares, a un muestreo geográfico mas amplio y por consecuencia, nuevos nichos ecológicos (Samuels *et al.*; 2006). En adición, las nuevas reclasificaciones han permitido determinar a su vez la relación con el teleomorfo, ya que algunas especies de *Trichoderma* presentan como teleomorfo al género *Hypocrea*; sin embargo existen especies que aún no se les encuentra se fase sexual (Bissett *et al.*, 2003). Por lo anterior es necesario reforzar la identificación morfológica con el empleo de técnicas moleculares, tales como: polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés), DNA polimorfo amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés), amplificación de espacios intergénicos (ITS por sus siglas en inglés). Druzhinina *et al.*, (2006) mencionan que el género *Trichoderma* descrito por Pearson en 1974, de poseer tan solo 27 especies, con el uso de las técnicas moleculares hasta el año 2006 se han registrado en GENBANK 400 especies de este genero.

De los 23 sitios muestreados en el 65.2% se logró aislar al género *Trichoderma*. Michel-Aceves, (2001) del total de sus muestras, estimó una proporción cercana al 75% para algunas localidades del estado de Guerrero, estas fluctuaciones en el porcentaje se atribuyen principalmente a la estación del año en la cual se colectaron las muestras ya que se han estimado poblaciones altas en primavera y verano, comparado con otoño e invierno (Widden y Abitbol 1980). En este estudio la mayoría de las muestras se colectaron en otoño e invierno, lo que se ve reflejado en un porcentaje menor de aislamientos en comparación con lo reportado por Michel-Aceves, (2001). Sin embargo, se obtuvo arriba del 50% con relación a la presencia de *Trichoderma* para la franja jamaiguera del estado de Guerrero, lo que indica una presencia importante de este organismo antagonico.

Las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. obtenidas en el corredor productor-comercial jamaiguero, son organismos antagonicos que se pueden utilizar en el control biológico de la enfermedad “pata prieta de la jamaica”; mismos que de acuerdo al principio de que para que un agente de control biológico tenga éxito, deben considerarse diferentes factores como las condiciones climáticas y el hábitat, los cuales deben ser adecuados para su crecimiento y para que invadan o afecten a los fitopatógenos que se desea controlar (Andrews, 1992). De la misma forma, Baker y Cook (1974) mencionan que el principal problema en la efectividad del control biológico de fitopatógenos es que los organismos empleados para este fin, no están adaptados a las condiciones ambientales locales donde serán aplicados; es decir, que las condiciones térmicas deben ser compatibles con las del patógeno de dicha región, ya que la producción enzimática está influenciada por la temperatura del ambiente (Watanabe *et al.*, 2005).

Por lo que la obtención de distintas especies nativas de *Trichoderma*, indica la adaptabilidad a las condiciones climáticas de la región. Aunado a esto, al ser seleccionadas de medio natural, han desarrollado mecanismos de lucha, mismos podrán manifestar al máximo contra el fitopatógeno más importante que afecta al cultivo de la jamaica, que es *P. parasitica*.

5. CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron 3 cepas patogénicas de *P. parasitica*, aisladas de plantas enfermas provenientes del municipio de Tecoaapa y Tlaltenango, Guerrero.

Se aislaron e identificaron 15 cepas nativas del genero *Trichoderma*; perteneciendo ocho a la especie *T. asperellum*, tres a *T. harzianum*, una a *T. virens*, una a *T. inhamatum*, una a *T. gamsii*, y una a *T. longibrachiatum*.

T. gamsii se aisló de la localidad Tierra colorada municipio de Juan. R. Escudero, Guerrero y es la primera vez que se reporta molecularmente en México.

Las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas en suelos con alta incidencia de *P. parasitica* están adaptadas a las condiciones del agroecosistema de jamaica, por lo que se considera que pueden ser una importante alternativa para incluirse en las estrategias de manejo de la pata prieta de la jamaica en el estado de Guerrero.

6. LITERATURA CITADA

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30:603-635
- Ahrens, U., and N. Seemuller. 1992. Detection of DNA plant pathogenic mycoplasma by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16SrRNA gene. Phytopathology 82:828-832
- Baker, K. F. and Cook, J. R. 1974. Biological control of plant pathogens. First edition. CRS Press. Freeman, San Francisco, CA, USA
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany 69: 2357–2372
- Bissett J, Szakacs G and Nolan CA. 2003 New species of *Trichoderma* from Asia. Canadian Journal Botanic 81:570–586
- Chet, I., Harman, G. E. and Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbiology ecologica 7:29-38
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potencial as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet (ed.) Innovative approaches to plant control disease. Willey and Sons. New York, USA 137-160
- Crane, J. C. 1943. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a fiber crop. Economic Plants of interest to the Americas. USDA 47 p

- Dennis, C. y Webster, J. 1971 A. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25-39
- Dennis, C. y Webster, J. 1971 B. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-48
- Druzhinina, S. I., Kopchinskiy, G. A and Kubicek, P. C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience 47:55–64
- Ezziyyani, M., Requena, M. E. y Candela, M. E.. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. Anales de Biología 27:143-153
- Gonzales-Santin, L. L. 2008. Etiología de la enfermedad “pata prieta de la jamaica” (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo 63 p
- Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biological Biochemistry 11 (23):1011-1020.
- Grech, N.M. 1990. Fungicide resistance in plant pathogenic fungi: the problems and ways to cope. California Grow 14(4): 36-37
- Hadad, E. A., Hasma, N. and Sitepu, D. 1976. Testing of roselle varieties for resistance to *Phytophthora*. Pemberitaan lembaga penilitian tonaman industri 22: 7-14
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T- 22. Plant Disease 84:377-393
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Revista Chapingo 50-54 p
- Jensen, D. F. and Wolffhechel, H. 1995. The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and damping off diseases. In: Benefits and Risks (series: Plant and microbial biotechnology research) Cambridge University Press. Cambridge 177-189 p
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, L. S.; Bing-Sheng, L. and Druzhinina, S. I. 2006 *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia, Studies in mycology 55: 135–177.
- Michel-Aceves, A. C., Rebolledo-Dominguez, O., Lezama-Gutierrez, R., Ochoa-Moreno, Ma. E., Mesina-Escamilla, J. C y Samuels, G. J. 2001. Especies de *Trichoderma* en

- suelos cultivados con mango afectados por Escoba de bruja y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19 (2):154-160
- Morales-Barrera, L. y Cristiani-Urbina, E. (2008). Hexavalent Chromium Removal by a *Trichoderma inhamatum* Fungal Strain Isolated from Tannery Effluent. Water Air Soil Pollut 187:327–336
- Olunloyo, O. A. and Andeji M. O. 1974. Relative susceptibility of roselle and Kenaf to the three isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda De Haan) Tucker, Nigeria Agricultural Journal 11: (1) 66-70
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biological control. Annual Review Phytopathology 23:23-54
- Rifai, M. A. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. Mycological papers 116:1-56
- Samuels G. J. 2006 b. *Trichoderma*: systematic, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195-206
- Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Pérez, S. and Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European journal of plant pathology 109:418-426
- Watanabe, S., K. Kumakura, H. Kato, H. Iyozumi, M. Togawa and K. Nagayama. 2005. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1 Journal General Plant Pathology 71: 351–356
- Waterhouse, M. G. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological papers 92:22
- Widden, P. and Abitbol, J.J. 1980. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce forest soil. Mycologia 72: 775-785
- Wilson, M. and Backman, P. A. 1998. Biological control of plant pathogens. IN: J. R. Rubozan (ed.) Handbook of pest management. Marcel Dekker. New York. USA 309-335 p
- Ze-Fen, Y., Min-Qiao, E., Ying-Zhang, E., Ke-Qin, Z. 2007. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. Antonie Van Leeuwenhoek 92:101–108

II. CAPACIDAD ANTAGÓNICA Y ANTIBIÓTICA *in vitro* DE DIFERENTES AISLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* spp. CONTRA *Phytophthora parasitica* Dastur, CAUSANTE DE LA PATA PRIETA DE LA JAMAICA.

In vitro ANTAGONIC AND ANTIBIOTIC CAPACITY OF DIFERENT NATIVES STRAINS OF *Trichoderma* spp. AGAINST *Phytophthora parasitica* Dastur CAUSER OF THE PATA PRIETA OF THE JAMAICA.

Linda Luz Esparza-Luna¹, Javier Hernández-Morales¹, Alejandro Casimiro Michel-Aceves², Luis Emilio Castillo Márquez³.

RESUMEN

Los aislados de cepas nativas de especies de *Trichoderma* y *Phytophthora parasitica* en suelos cultivados con jamaica fueron obtenidos en los municipios de Tecoaapa, Ayutla de los Libres, San Marcos y Juan R. Escudero del estado de Guerrero. Se evaluó la capacidad antagonica mediante la técnica de cultivos duales, analizando las variables de: días al primer contacto entre hifas, zona de intersección, esporulación de *Trichoderma* spp., clasificación del antagonismo e interacción antagonico-patógeno. La evaluación antibiótica, se realizó mediante el método del celofán para estimar el porcentaje de inhibición de las cepas de *P. parasitica*. En ambas pruebas se empleó un experimento factorial 3 x 15 completamente al azar, resultando 45 interacciones con tres repeticiones y sus testigos. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba Tukey ($\alpha=0.05$). En la evaluación antagonica, se observó fuerte competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis contra *P. parasitica*, siendo las cepas T2 (*T. harzianum*) y T10 (*T. asperellum*) las de mejor comportamiento antagonico. En el porcentaje de inhibición se obtuvieron variaciones de 25.87 a 97.5 %; las cepas con mayor porcentaje de inhibición fueron las cepas T14, T10, T9 (*T. asperellum*), la T2 (*T. harzianum*), seguidas por la cepa T13 (*T. gamsii*), la cepa con menor porcentaje de inhibición fue la T12 (*T. inhamatum*).

Palabras clave: antagonismo, antibiosis, *Trichoderma* spp., *Phytophthora parasitica*.

¹Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De México; CP 56230.

²Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Dpto. Fitotecnia, Iguala, Guerrero; CP 40000.

³Universidad Autónoma Chapingo, Dpto. Parasitología Agrícola, Chapingo, Edo. de México, CP 56230.

ABSTRACT

The isolates natives strains of *Trichoderma* spp. and *Phytophthora parasitica* from soils cultivated with jamaica was taken of samples of soil, was obtained from Tecoaapa, Ayutla de los Libres, San Marcos and J.R. Escudero of the state of Guerrero. The antagonistic capacity was evaluated employed the technique of dual culture, analyzing the variable of days at first contact between mycelium, intersection zone, *Trichoderma* spp. sporulation, antagonism class and pathogen-antagonic interaction. The antibiotic evaluation was realized throughout the cellophane technique from estimated the percentage of inhibition of the growth mycelium of plant pathogen. In test employed a factorial experiment completely randomized, were obtained 45 interactions, with the three repetitions and target. Analyses of variance were used and mean separation was achieved using the Tukey test ($\alpha=0.05$). In the antagonic evaluation was observed strong competition for space and nutrients, micoparasitic activity and antibiosis. The percentage of inhibitions of the growth mycelium of plant pathogen for the isolates varied from 25.87 a 97.5 %; T14, T10, T9 (*T. asperellum*) the T2 (*T. harzianum*), follow for the strains T13 (*T. gamsii*), the strains with minor percentage of inhibitions was the T12 (*T. inhamatum*).

Key words: antagonims, antibiosis, *Trichoderma* spp., *Phytophthora parasitica*.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de organismos fungosos con capacidad antagónica se implementó primero contra fitopatógenos habitantes del suelo que causan enfermedades en las raíces de las plantas (Wilson y Backman, 1998) de tal forma que la actividad antagónica del género *Trichoderma* ha sido motivo de estudio frente a diversos organismos fungosos fitopatógenos de importancia agrícola, principalmente de los géneros *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Fusarium* (Chet *et al.*, 1981; Papavizas *et al.*, 1985). También se ha evaluado el empleo de organismos fungosos antagónicos frente a fitopatógenos foliares principalmente de los géneros *Alternaria*, *Pyricularia* y *Macrophomina* (Sutton y Peng, 1993; Reyes *et al.*, 2007).

Los mecanismos de acción que presentan distintas especies del género *Trichoderma* se basan principalmente en la fuerte capacidad competitiva por espacio y nutrientes (Papavizas *et al.*, 1985; Chet 1987; Harman, 2000), también se han reportado como parásitos de un gran número de organismos fungosos fitopatógenos (Ghisalberti *et al.*, 1990); de igual forma se caracterizan por la producción de metabolitos antibióticos ya sea de naturaleza volátil o no volátil (Dennis y Webster 1971a/b; Chet, 1987; Sid Ahmed *et al.*, 2003) a los que se les atribuyen cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Sivan y Chet, 1989). Por otra parte, también se conoce que el género *Trichoderma* induce resistencia a la planta, incrementando la respuesta de crecimiento y tolerancia al estrés, ocasionada por factores adversos, como la presencia de fitopatógenos (Baker, 1988; Yedidia *et al.*, 1999-2000; Harman, 2000-2004; Howell, 2003; Ezziyani *et al.*, 2005). Los mecanismos de acción anteriormente mencionados no son excluyentes uno del otro, sino que pueden actuar sinérgicamente en el control de los patógenos, aunque la importancia relativa de cada uno de ellos va a depender exclusivamente de la interacción planta-patógeno-antagonista y de las condiciones ambientales que prevalezcan (Chet e Inbar, 1994; Harman, 2000).

Por otra parte la efectividad en controlar un organismo fungoso fitopatógeno en particular, puede variar para un aislamiento de un antagonista en la medida de su peculiaridad en términos de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas (Dennis y Webster 1971a/b). Por tal motivo, es importante el conocimiento de los tipos de antagonismo de hongos biocontroladores para implementar una buena estrategia en el desarrollo de una agricultura sostenible, ya que el uso de organismos antagónicos representa una alternativa viable en comparación con el uso tradicional de agroquímicos, mismos que se caracterizan por su elevada eficacia y rápido control, pero también por eliminar junto con los organismos patógenos a otros benéficos. Estos inconvenientes del manejo químico se han potencializado en los últimos años (James *et al.*, 1993; De Waard *et al.* 1993) además de que el uso intensivo de productos químicos puede resultar en la selección de cepas resistentes del patógeno (Grech, 1990). Por otra parte, en la actualidad; la tendencia de obtener productos orgánicos mediante el empleo de una agricultura sustentable y amistosa con el medio ambiente, ha llevado a que los productores, encuentren en el mercado agrícola orgánico una forma más remunerable de obtener ingresos.

Por lo anterior, se requiere de un uso más extenso del control biológico y por ello es necesario la obtención de agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, agentes de control biológico nativos que sean capaces de competir con el patógeno dentro de un mismo nicho ecológico; para esto es conveniente distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y la medida en que las mismas se expresaran dentro de cada ecosistema (Andrews, 1992).

2. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la capacidad antagonica *in vitro* de diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *Phytophthora parasitica* causante de la enfermedad “pata prieta” en el cultivo de la jamaica en Guerrero.

Evaluar el potencial o capacidad antibiótica *in vitro* de diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *Phytophthora parasitica* causante de la enfermedad “pata prieta” en el cultivo de la jamaica en Guerrero.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Evaluación de la actividad antagonica *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. contra cepas de *Phytophthora parasitica*

Tomando en consideración a las cepas obtenidas de las especies nativas de *Trichoderma* y de las cepas de *P. parasitica*, se empleó un experimento factorial 3 x 15 completamente al azar, resultando la confrontación de tres niveles del factor A, que correspondieron a las cepas de *P. parasitica* (PHY6, PHY7 y PHY8); con quince niveles del factor B, de los diferentes aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14 y T15), con un total de 45 interacciones cada una con tres repeticiones y sus testigos, los cuales consistieron en la confrontación de *P. parasitica*. Se tomó como unidad experimental una caja Petri. Los datos se sometieron a un análisis de varianza bajo el experimento mencionado y prueba Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico de SAS.

Para evaluar la actividad antagonica se empleó la técnica de cultivo apareado. Se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo PDA y se depositó a 2 cm de el extremo de la caja y en

condiciones asépticas, un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada cepa de *P. parasitica* con crecimiento activo. Dos días después, en forma equidistante se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada aislado de *Trichoderma* spp. con 10 días de crecimiento. En los testigos se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada cepa de *P. parasitica* con crecimiento activo y dos días después en forma equidistante se sembró a la misma cepa de *P. parasitica*.

Una vez colocados ambos organismos fungosos en las cajas Petri, se incubaron a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) y se observaron cada 24 hrs para evaluar las variables consideradas, las cuales fueron: días al primer contacto entre hifas, zona de intersección, clasificación del antagonismo, capacidad de esporulación de las diferentes especies de *Trichoderma* sobre las cepas de *P. parasitica* e interacción del organismo antagónico con el patógeno.

A continuación se describe cada una de las variables y la forma en que se tomaron los datos.

3.1.1 Días al primer contacto entre hifas

Consiste en conocer el momento en que sucede el primer contacto entre las puntas de hifas del organismo antagónico y el patógeno. Se realizaron revisiones en las 45 interacciones y sus repeticiones cada 24 hrs, a partir del momento de la siembra de ambos microorganismos, con la finalidad de observar el primer contacto de hifas y recavar el dato.

3.1.2 Zona de intersección

Después del primer contacto entre las hifas del antagónico con el patógeno, se observó si los aislados de *Trichoderma* spp. crecían o no sobre *P. parasitica*, esto se realizó en las 45 interacciones y sus respectivas repeticiones. Al observar crecimiento micelial, se realizaron mediciones con una regla de plástico, en centímetros. Se midió la zona de traslape o zona de intersección de las colonias, desde la rodaja de agar de *Trichoderma* spp. hasta la punta final del micelio; registrando las mediciones cada 24 hrs, hasta que el testigo cubrió la superficie de la caja Petri.

En la evaluación de esta variable además del diseño factorial completamente al azar se empleó también un experimento completamente al azar, confrontando a las 15 cepas nativas de *Trichoderma* spp. (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14 y T15) con la cepa de PHY6 de *P. parasitica*, la cual se selecciono por que resultó la más agresiva en

las pruebas de patogenicidad. Se tuvo nueve repeticiones y sus testigos, los cuales consistieron en la confrontación de la cepa PHY6 de *P. parasitica*. Se tomó como unidad experimental una caja Petri. Los datos se sometieron a un análisis de varianza bajo el experimento mencionado y prueba Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico de SAS.

La finalidad de establecer dos diseños experimentales para la evaluación de esta variable fue la de observar el comportamiento de las 45 interacciones en el diseño factorial completamente al azar y así determinar las mayores zonas de intersección y por lo tanto la mejor confrontación; con el diseño completamente al azar se observó de forma general el comportamiento de las cepas de *Trichoderma* spp. frente al patógeno *P. parasitica*, de esta forma se pudo determinar la mayor zona de intersección y a su vez la mejor cepa de *Trichoderma* spp.

3.1.3 Capacidad de esporulación de *Trichoderma* spp.

Michel (2001) estimó visualmente la esporulación de aislamientos de *Trichoderma* spp., ubicando tres niveles de esporulación, los cuales fueron: abundante, cuando *Trichoderma* spp. cubría más del 50% de la caja petri, media, cuando cubría menos del 50% de la caja petri y escasa, cuando se observaba una esporulación cercana o menor al 10%; por lo que, en el presente trabajo, la esporulación de las diferentes especies de *Trichoderma* se midió con una regla de plástico en centímetros, estas mediciones se realizaron en las 45 interacciones con sus repeticiones durante el experimento, hasta que el testigo cubrió la superficie de la caja Petri. El tamaño de la caja Petri utilizada en este experimento fue de 10 cm de diámetro, por lo que, se estableció una regla de tres simple, teniendo de esta forma que por cada centímetro con esporulación, correspondía a 10% y así sucesivamente para las mediciones resultantes.

La clasificación de la esporulación se designó por lo tanto en cuatro niveles, teniendo así: esporulación abundante (66 a 100%), esporulación media (33 a 65%), esporulación baja (2 a 32%) y esporulación nula (0%), según el grado de desarrollo de las colonias antagónicas.

No se realizó un conteo conidial por mL, solo se observó y midió la esporulación para cada aislamiento de *Trichoderma* spp.

3.1.4 Clasificación del antagonismo

Cada tratamiento evaluado se ubicó de acuerdo a la clasificación de antagonismo de Bell, Wells y Markham (1982). En donde:

1= *Trichoderma* spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio.

2= *Trichoderma* spp. sobrecrece dos terceras partes de la superficie del medio.

3= *Trichoderma* spp. y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro.

4= El patógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* spp.

5= El patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* spp. y cubre totalmente la superficie del medio

Este análisis se realizó de forma visual en base a la escala mencionada, en todas las interacciones y sus repeticiones. Esta variable fue registrada cuando el testigo cubrió la superficie de la caja Petri.

3.1.5 Interacción de aislados de *Trichoderma* spp. y *Phytophthora parasitica*

Al momento del contacto y durante el crecimiento de el antagonista, pueden actuar diversos mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., los cuales pueden ser: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, lisis de hifas y antibiosis. Estos mecanismos de acción no son excluyentes unos de otros.

La competencia por espacio y nutrientes y la antibiosis se determinó de manera visual en las 45 interacciones y sus repeticiones, ya que se observó la presencia de esporulación de *Trichoderma* spp., sobrecrecimiento al patógeno, detención del crecimiento del patógeno y pigmentación al medio de cultivo; esta variable fue registrada cuando el testigo cubrió la superficie de la caja Petri.

Para observar el micoparasitismo y la lisis de hifas del patógeno, en las 45 interacciones, se realizaron microcultivos en portaobjetos, se colocó bajo condiciones asépticas, 0.5 mL de medio de cultivo Papa dextrosa agar (PDA) sobre un portaobjetos estéril, posteriormente con una aguja de disección se sembró en el extremo izquierdo del medio de cultivo PDA micelio de *P. parasitica* con crecimiento activo, se incubó a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), después de un día de la siembra del patógeno, con una aguja de disección y bajo condiciones asépticas, se tomaron conidios o micelio de *Trichoderma* spp. con crecimiento activo y se sembró en el extremo derecho del medio de cultivo PDA, se incubó a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) por 2 días. Posteriormente al microcultivo se le añadió una gota de glicerol y se le colocó un cubre objetos con la finalidad de observar al microscopio compuesto (lente 40X y 100X) el mecanismo de acción presente en cada interacción.

3.2 Evaluación de la actividad antibiótica *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. contra cepas de *Phytophthora parasitica*.

Tomando en consideración a las cepas obtenidas de las especies nativas de *Trichoderma* y de las cepas de *P. parasitica*, se empleó un experimento factorial 3 x 15 completamente al azar, resultando la confrontación de tres niveles del factor A, que correspondieron a las cepas de *P. parasitica* (PHY6, PHY7 y PHY8); con quince niveles del factor B, de los diferentes aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14 y T15), con un total de 45 confrontaciones, cada una con tres repeticiones y sus testigos, en los cuales solo se sembraron discos de 5 mm de cada uno de los aislados de *P. parasitica* en cajas Petri que contenía medio de cultivo PDA que tuvieron solo el disco de celofán estéril. Se tomó como unidad experimental una caja Petri. Los datos se sometieron a un análisis de varianza bajo el experimento mencionado y prueba Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico de SAS.

En la evaluación de esta variable además del experimento factorial completamente al azar se empleó también un experimento completamente al azar, confrontando a las 15 cepas nativas de *Trichoderma* spp. (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14 y T15) con la cepa de PHY6 de *P. parasitica*, la cual se selecciono ya que resultó ser la más agresiva en las pruebas de patogenicidad. Se tuvieron nueve repeticiones y sus testigos, los cuales consistieron en la confrontación de la cepa PHY6 de *P. parasitica*. Se tomó como unidad

experimental una caja Petri. Los datos se sometieron a un análisis de varianza bajo el experimento mencionado y prueba Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico de SAS.

La finalidad de establecer dos diseños experimentales para la evaluación de esta variable fue la de observar el comportamiento de las 45 interacciones en el diseño factorial completamente al azar y así determinar el mayor porcentaje de inhibición y por lo tanto la mejor confrontación; con el diseño completamente al azar se observó de forma general el comportamiento de las cepas de *Trichoderma* spp. frente al patógeno *P. parasitica*, de esta forma se pudo determinar la mayor zona de intersección y a su vez la mejor cepa de *Trichoderma* spp.

3.2.1 Porcentaje de inhibición

Para obtener los datos que permitieron conocer el porcentaje de inhibición, de cada cepa de *P. parasitica*, se utilizó el método del celofán (Dennis y Webster, 1971 a) de la siguiente forma: se cortó papel celofán estéril al tamaño de la caja Petri, se colocó bajo condiciones asépticas sobre cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA; se inoculó cada caja Petri en la parte central y sobre el papel celofán estéril, con discos de 5 mm de diámetro, de cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp. de 10 días de edad, previamente cultivados en PDA. Se incubaron las cajas a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) con 12 h luz/oscuridad durante 2 días. Posteriormente se retiró el papel celofán con el crecimiento de cada especie de *Trichoderma* y se colocó en el centro de la misma caja, un disco de 5 mm de cada aislado de *P. parasitica*, se incubó a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). Posteriormente se midió con una regla de plástico en centímetros, el diámetro de la colonia de *P. parasitica* creciendo en cajas Petri donde solo creció *P. parasitica*. (Testigos) y el diámetro de la colonia de *P. parasitica* creciendo en cajas Petri donde antes creció *Trichoderma* spp.

La variable analizada durante esta fase experimental fue el porcentaje de inhibición que ejercieron los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre las cepas de *P. parasitica*. Por lo que cada 24 hrs se registró las mediciones, el experimento concluyó hasta que el testigo cubrió la caja Petri.

Con las mediciones obtenidas se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de los diferentes aislados de *P. parasitica*, empleando la fórmula propuesta por Worasatit *et al.*, (1994):

$$\% \text{ de inhibición} = [(D_1 - D_2) / D_1 \times 100]$$

En donde:

D₁= diámetro de la colonia de *P. parasitica* creciendo en cajas Petri donde solo creció *P. parasitica*. (Testigos)

D₂= diámetro de la colonia de *P. parasitica* creciendo en cajas Petri donde antes creció *Trichoderma* spp.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Evaluación de la actividad antagónica *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. contra cepas de *P. parasitica*

El tiempo en que los testigos cubrieron la superficie de la caja Petri fue de 10 días, durante este tiempo se realizaron las tomas de datos para las variables evaluadas.

4.1.1 Contacto de hifas

En todos los tratamientos las hifas de ambos microorganismos hicieron contacto a los 4 días después de la siembra; se observó que los aislados patogénicos detuvieron su crecimiento al momento del contacto con el antagónico, por lo que solo este último siguió creciendo y colonizando la superficie de los aislados de *P. parasitica*, a excepción de la cepa T13 que corresponde a *T. gamsii* en la que ambos microorganismos detuvieron su crecimiento al momento del contacto de las hifas.

Estos resultados concuerdan con lo observado por González *et al.*, (1999) en pruebas *in vitro* donde observaron que el crecimiento de *Alternaria solani* se detuvo al tener contacto inmediato con diferentes especies de *Trichoderma*. Resultados similares mencionan Correa *et al.*, (2007) con aislados de *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. crassum* en confrontación dual contra *Sclerotium rolfsii*, ya que el crecimiento del patógeno se detuvo por completo al momento del contacto; de la misma forma Ezziyyani *et al.*, (2007) mencionan que el crecimiento *Phytophthora capsici* se detiene al contacto con las hifas de *T. harzianum* y que

la detención del crecimiento del patógeno se debe principalmente a la activación de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. al verse confrontado con un organismo patógeno específico. Dennis y Webster (1971 a/b) mencionan que algunos aislados de *Trichoderma* producen antibióticos no-volátiles que causan la inhibición del crecimiento de colonias de patógenos después del contacto con las hifas, aseveración que se ha respaldado por Wells *et al.*, (1972); Smith *et al.*, (1990); Sivakumar *et al.*, (2000) quienes señalan que especies de *Trichoderma* producen varios metabolitos tóxicos los cuales están implicados en la detención del crecimiento patogénico.

4.1.2 Zona de intersección

En lo que respecta a los resultados de las confrontaciones del experimento factorial completamente al azar, al tomarse en cuenta la tabla de análisis de varianza, se observaron diferencias significativas entre las 45 interacciones, por lo cual se procedió a realizar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), para determinar la mejor interacción (Cuadro 3). En las zonas de intersección, se tuvieron variaciones de distancia entre 0.0 a 4.9 cm. De esta forma, las confrontaciones que presentaron la mayor zona de intersección fueron: PHY6T6 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. virens* cepa 6) PHY6T12 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. inhamatum* cepa 12) y PHY6T5 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. asperellum* cepa 5). Mientras que las interacciones PHY6T13 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. gamsii* cepa 13), PHY6T4 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. asperellum* cepa 4), PHY8T15 (*P. parasitica* cepa 8 - *T. asperellum* cepa 15), PHY7T13 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. gamsii* cepa 13) y PHY7T4 (*P. parasitica* cepa 6 - *T. asperellum* cepa 4) fueron las que resultaron con nula zona de intersección. Estos resultados están relacionados con el crecimiento de las cepas patogénicas, ya que entre éstas se encontraron diferencias significativas, permitiendo una mayor distancia de la zona de intersección para la cepa PHY6 con 3.11 cm, seguida por la cepa PHY8 con 2.82 cm y por último la cepa PHY7 con 2.21 cm.

Cuadro 3. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la zona de intersección de las confrontaciones entre las cepas de *Trichoderma* spp. sobre los aislados de *P. parasitica* en prueba dual.

INTERACCIÓN	ZONA INTERSECCIÓN (CM)	
PHY6T6 <i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. virens</i> cepa 8	4.9	A ¹
PHY6T12 <i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. inhamatum</i> cepa 12	4.9	A

Continuación Cuadro 3

PHY6T5	4.9	A
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. asperellum</i> cepa 5		
PHY8T10	4.86	A
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 10		
PHY6T3	4.83	AB
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. harzianum</i> cepa 3		
PHY6T10	4.83	AB
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. asperellum</i> cepa 10		
PHY8T12	4.83	AB
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. inhamatum</i> cepa 12		
PHY6T2	4.83	AB
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. harzianum</i> cepa 2		
PHY6T11	4.1	ABC
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. asperellum</i> cepa 11		
PHY8T11	3.83	ABCD
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 11		
PHY8T2	3.83	ABCD
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. harzianum</i> cepa 2		
PHY7T3	3.83	ABCD
<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. harzianum</i> cepa 3		
PHY8T8	3.83	ABCD
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. harzianum</i> cepa 8		
PHY8T1	3.8	ABCD
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 1		
PHY7T8	3.8	ABCD
<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. harzianum</i> cepa 8		
PHY6T8	3.67	BCD
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. harzianum</i> cepa 8		
PHY6T14	3.66	BCD
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. asperellum</i> cepa 14		
PHY8T14	3.63	CD
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 14		
PHY8T3	3.5	CD
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. harzianum</i> cepa 3		
PHY7T11	3.4	CDE
<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. asperellum</i> cepa 11		
PHY7T14	3.36	CDE
<i>P. parasitica</i> cepa - <i>T. asperellum</i> cepa 14		
PHY6T17	3.16	CDEF
<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. longibrachiatum</i> cepa 17		
PHY8T9	3.03	CDEF
<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 9		
PHY7T5	3.0	CDEF
<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. asperellum</i> cepa 5		

Continuación Cuadro 3.

PHY7T10 <i>P. parasitica cepa 7 - T. asperellum cepa 10</i>	2.96	CDEF
PHY8T4 <i>P. parasitica cepa 8 - T. asperellum cepa 4</i>	2.93	CDEF
PHY7T2 <i>P. parasitica cepa 7 - T. harzianum cepa 2</i>	2.8	DEF
PHY7T6 <i>P. parasitica cepa 7 - T. harzianum cepa 6</i>	2.66	DEFG
PHY8T5 <i>P. parasitica cepa 8 - T. asperellum cepa 5</i>	2.3	EFGH
PHY7T5 <i>P. parasitica cepa 7 - T. asperellum cepa 5</i>	2.3	EFGH
PHY7T9 <i>P. parasitica cepa 7 - T. harzianum cepa 9</i>	2.3	EFGH
PHY7T15 <i>P. parasitica cepa 7 - T. asperellum cepa 15</i>	2.13	FGH
PHY6T9 <i>P. parasitica cepa 6 - T. asperellum cepa 9</i>	1.53	FGI
PHY8T6 <i>P. parasitica cepa 8 - T. virens cepa 6</i>	1.43	HIJ
PHY6T1 <i>P. parasitica cepa 6 - T. asperellum cepa 1</i>	0.73	IJK
PHY6T15 <i>P. parasitica cepa 6 - T. asperellum cepa 15</i>	0.70	IJK
PHY7T7 <i>P. parasitica cepa 7 - T. longibraquiatum cepa 7</i>	0.43	IJK
PHY7T1 <i>P. parasitica cepa 7 - T. asperellum cepa 1</i>	0.26	JK
PHY8T13 <i>P. parasitica cepa 8 - T. gamsii cepa 13</i>	0.26	JK
PHY8T7 <i>P. parasitica cepa 8 - T. longibrachiatum cepa 7</i>	0.23	K
PHY6T13 <i>P. parasitica cepa 6 - T. gamsii cepa 13</i>	0	K
PHY6T4 <i>P. parasitica cepa 6 - T. asperellum cepa 4</i>	0	K
PHY8T15 <i>P. parasitica cepa 8 - T. asperellum cepa 15</i>	0	K
PHY7T13 <i>P. parasitica cepa 6 - T. gamsii cepa 13</i>	0	K
PHY7T4 <i>P. parasitica cepa 7 - T. asperellum cepa 4</i>	0	K

¹ Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales.

En relación a las confrontaciones que no presentaron zona de intersección, en las que solo se observaron las hifas de ambos hongos en contacto pero ninguno domino sobre el otro; existen explicaciones como las que señalan Dennis y Webster (1971 a/b), que este fenómeno se debe a que algunas especies de *Trichoderma* son selectivas, lo que significa que ante determinados patógenos no ejercen su actividad antagónica, tal es el caso de *T. harzianum*, al ser confrontadas con patógenos específicos. Un ejemplo de lo anterior, son los resultados de Wells *et al.*, (1972), quienes encontraron que *T. harzianum* no produjo ningún efecto antagónico sobre *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium myriotylum*, si no que ambos hongos crecieron sin mostrar una zona de intersección. Este fenómeno puede deberse también a lo experimentado por Robinson y Park (1966), estos autores, mencionan que existen compuestos volátiles llamados esporostáticos, como el acetaldehído, propionaldehído, n-butiraldehído, n-propanol, isobutanol, etilacetato, iso-butil acetato y la acetona. De la misma forma, Robinson y Garret (1969) señalan que principalmente el acetaldehído es un compuesto volátil producido por *Trichoderma* spp. y que tiene la capacidad de detener el crecimiento de otros hongos, a este mecanismo se le conoce como fungistasis.

En las confrontaciones que presentaron zona de interacción, se encontró que, entre mayor fue la zona de intersección, mayor fue la agresividad de los aislados antagónicos y mayor el porcentaje de esporulación sobre las diferentes cepas de *P. parasitica*. Estos resultados son similares a lo observado por Ezziyyani *et al.*; (2004-2007), mencionan que la zona de intersección de *T. harzianum* frente al patógeno *P. capsici* aumenta a medida que transcurre el tiempo y que va acompañado de la destrucción del micelio del patógeno, indican también que algunas interacciones muestran una zona de inhibición progresiva. De manera similar Kexiang *et al.*, (2002) mencionan que a medida que aumenta el tiempo de incubación aumenta la zona de intersección y el nivel de inhibición de crecimiento del patógeno.

En lo que respecta a los resultados de las confrontaciones del experimento completamente al azar, al tomarse en cuenta la tabla de análisis de varianza, se observaron diferencias significativas entre las 15 confrontaciones, por lo cual se procedió a realizar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), para determinar la mejor interacción (Cuadro 4). En las zonas de intersección, permitió distinguir 11 grupos, en los que la zona de intersección tuvo una variación de 0.0 a 4.2 cm. La mayor zona de intersección la presentó la cepa T10 que corresponde a la especie *T. asperellum* con 4.2 cm, seguida por T3 con 4.05 cm que

corresponde a la especie *T. harzianum* y T12 con 4.01 cm que corresponde a la especie *T. inhamatum*. En el Cuadro 4 se muestran los resultados para las cepas restantes. En la Fig. 3 se observa el crecimiento de las especies de *Trichoderma* spp. sobre *P. parasitica* en relación con la zona de intersección por especie antagonista.

Cuadro 4. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la zona de intersección de aislados de *Trichoderma* spp. sobre la cepa PHY6 de *P. parasitica* en confrontación dual.

CEPA	ESPECIE	ZONA INTERSECCIÓN (CM)
T10	<i>T. asperellum</i>	4.22 A ¹
T3	<i>T. harzianum</i>	4.05 BA
T12	<i>T. inhamatum</i>	4.01 BA
T2	<i>T. harzianum</i>	3.82 BAC
T11	<i>T. asperellum</i>	3.77 BAC
T8	<i>T. harzianum</i>	3.76 BAC
T14	<i>T. asperellum</i>	3.55 BDC
T5	<i>T. asperellum</i>	3.4 DC
T6	<i>T. virens</i>	3.0 D
T9	<i>T. asperellum</i>	2.28 E
T1	<i>T. asperellum</i>	1.6 F
T7	<i>T. longibrachiatum</i>	1.27 GF
T4	<i>T. asperellum</i>	0.97 G
T15	<i>T. asperellum</i>	0.94 G
T13	<i>T. gamsii</i>	0.08 H

¹ Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

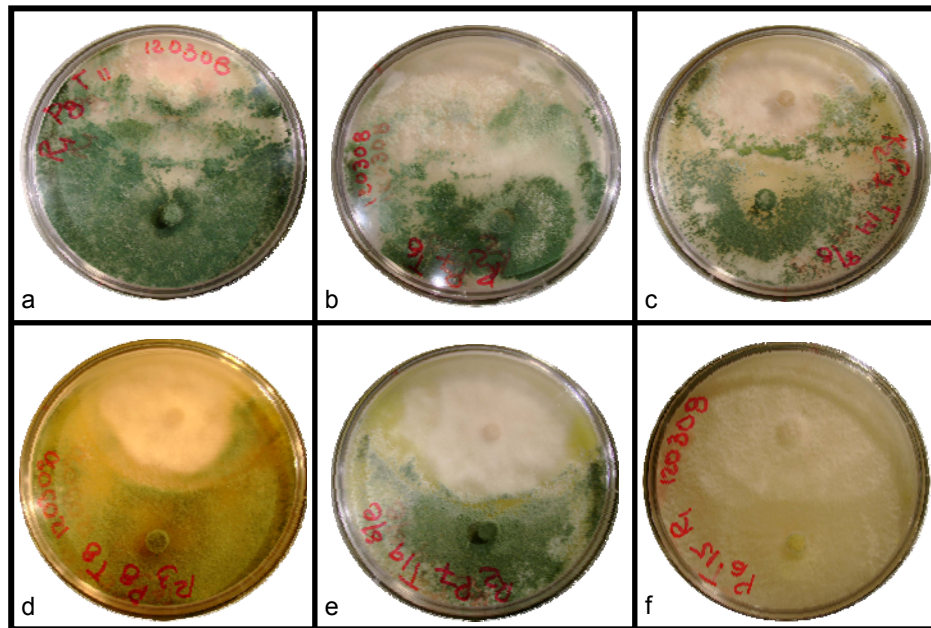


Fig. 3 Zona de intersección de aislados de *Trichoderma* spp. con *P. parasitica* en cultivos apareados con 10 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$. a) *T. asperellum* b) *T. harzianum* c) *T. inhamatum* d) *T. longibrachiatum* e) *T. virens* f) *T. gamsii*.

Autores como Papavizas y Lumsden (1980); Elad *et al.*, (1982) y Lorito *et al.*, (1993 a) señalan que las diferencias entre las zonas de intersección se deben a la producción de numerosos antibióticos de naturaleza volátil y no-volátil; mismos que se sintetizan al momento del contacto entre el antagonista y el patógeno; de forma similar, Dennis y Webster (1971a/b/c) y Taylor (1986) mencionan que dichos antibióticos se pueden producir en mayor o en menor cantidad después del contacto entre hifas y que esto puede depender también de las especies tanto patógenicas como antagonísticas que se confronten, señalan además que la producción de enzimas como las glucanasas, quitinasas, proteasas y celulasas, degradadoras de paredes celulares, juegan un papel sumamente importante en el micoparasitismo.

Esto nos indica que las 14 cepas que mostraron una mayor zona de intersección está correlacionado con una mayor actividad antagonística, por lo que, se ve reducida la colonia del patógeno y conforme transcurren los días, este queda totalmente parasitado, ya que dentro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. ocurre el fenómeno del micoparasitismo.

4.1.3 Capacidad de esporulación de *Trichoderma* spp.

Cada cepa antagonista tuvo un comportamiento diferente con relación a la cepa patogénica, los resultados se muestran en los Cuadros 5, 6 y 7.

De manera general, de las 15 cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en la confrontación dual, solo 2 no presentaron esporulación; siendo estas la T13 frente a las cepas 3 de *P. parasitica* y la T4 frente a la cepa PHY6 de *P. parasitica*, las restantes confrontaciones produjeron esporulación evidente. En la mayoría de los casos esporularon sobre el micelio de *P. parasitica*. Las diferencias en el porcentaje de esporulación indican también la agresividad de cada cepa de *Trichoderma* spp. sobre *P. parasitica*.

Ezziyyani *et al.*, (2007) señalan que en pruebas de laboratorio el comportamiento de diferentes aislados de *Trichoderma* spp. retardan el crecimiento de *Phytophthora capsici* al colonizar y esporular sobre el patógeno, es decir, la inhibición del crecimiento del patógeno es gradual pero la colonización de *Trichoderma* spp. es rápida y marcada sobre todo por el proceso micoparasítico.

4.1.4 Clasificación del antagonismo

De acuerdo a la clasificación del antagonismo propuesta por Bell, Wells y Markham (1982), se ubicó a 3 cepas de *Trichoderma* en la clase 1, siendo estas la T10 (*T. asperellum*), la T3 (*T. harzianum*) y T12 (*T. inhamatum*), la mayoría de las cepas restantes se ubicaron en la clase 2, teniendo así a las cepas T11, T14, T5, T9, T1, T4 y T15 que pertenecen a la especie *T. asperellum*, la T8 y T2 que corresponde a *T. harzianum* y la T7 que corresponde a la especie *T. longibrachiatum*. Solo la cepa T13 que pertenece a la especie *T. gamsii* se ubicó en la clase 3. No hubo cepas ubicadas en las clases 4 y 5. Lo anterior nos indicó que todas las cepas nativas de *Trichoderma* spp. a excepción de la T13, poseen una capacidad de crecimiento rápido sobre el patógeno *P. parasitica*; característica que evidencia una fuerte actividad antagónica, esto nos muestra que, mientras mayor sea la superficie colonizada por el antagonista, se tendrá mayor dominio sobre el patógeno.

Correa *et al.* (2007) mencionan que *T. harzianum* clasificó como nivel 1 de antagonismo confrontándolo con *Sclerotium rolfsii*, sin embargo, otros aislados de *T. harzianum* obtuvieron nivel 5 de antagonismo contra el mismo patógeno; esto sugiere que diferentes aislados de la misma especie de *Trichoderma* spp. pueden demostrar comportamientos distintos frente a un mismo organismo patogénico, resultados que pueden atribuirse a la selectividad de *Trichoderma* spp., en relación a la mayor o menor producción de enzimas degradadoras de paredes celulares estrechamente relacionado con la capacidad micoparasítica

y a la producción de compuestos antibióticos y compuestos fungistáticos; mecanismos de acción que ejerce este organismo antagonico al interactuar con un organismo patógeno.

4.1.5 Interacción de aislados de *Trichoderma* spp. y *P. parasitica*

En las confrontaciones duales se logró observar como principal mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. la competencia por espacio y nutrientes y el micoparasitismo. Las cepas que evidenciaron notablemente dichos eventos fueron: la T10 (*T. asperellum*), T3 y T2 (*T. harzianum*), T12 (*T. inhamatum*), mismas que también indujeron lisis de hifas del patógeno y antibiosis en la mayoría de los tratamientos, además de pigmentación del medio de cultivo al momento del contacto de las hifas de ambos microorganismos, que se observó como un halo amarillo en la periferia del crecimiento del patógeno; como en las cepas T8 (*T. harzianum*) y T4 (*T. asperellum*); hasta la coloración rojiza del medio, tal fue el caso de la cepa T5 (*T. asperellum*), estas pigmentaciones al medio de cultivo se muestran en la Fig. 4. Estas observaciones pueden indicar la presencia de antibióticos difusibles al medio, ya que también se observó una disminución del crecimiento de los 3 aislados de *P. parasitica* y además cada cepa antagonica actuó de forma diferente, debido a la posible variación genética intra-especies.

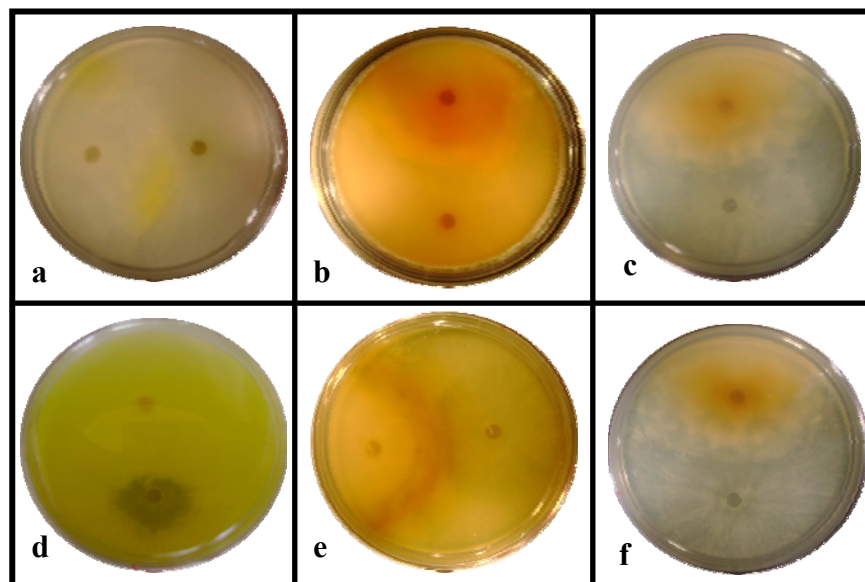


Fig. 4 Interacciones de aislados de *Trichoderma* spp. contra *P. parasitica* en cultivo dual con 10 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$ crecidos en medio de cultivo PDA. a) Formación de halo amarillo b) Formación de halo rojo c) Pigmentación amarilla al medio d) Pigmentación amarillo fosforescente al medio e) Pigmentación amarillo-café y halo rojo f) Pigmentación naranja al medio y halo amarillo.

Son pocos los autores que reportan las pigmentaciones observadas en los medios de cultivo posterior a una confrontación dual, entre ellos Vera *et al.*, (2005) mencionan que *T. harzianum* formó una banda color amarilla-crema lo que significó cierto grado de antagonismo con el patógeno *Sclerotium cepivorum* y observó en una invasión completa e inhibición de la formación de esclerocios.

Los resultados obtenidos en esta evaluación demostraron una incompatibilidad con las cepas de *P. parasitica*; por lo que se evidenció una pigmentación en la misma especie de *Trichoderma* spp. en la mayoría de las confrontaciones con *P. parasitica*. Las observaciones para cada aislado de *P. parasitica* confrontado con las cepas de *Trichoderma* spp. se muestran en los Cuadros 5, 6 y 7.

Cuadro 5. Esporulación e interacción de distintos aislados de *Trichoderma* spp. con *P. parasitica* cepa PHY6 en confrontación dual.

CEPA <i>P. parasitica</i>	CEPA <i>Trichoderma</i> (ESPECIE)	ESPORULACIÓN (%)	INTERACCIÓN
	T1 (<i>T. asperellum</i>)	Media (38%)	Competencia
	T2 (<i>T. harzianum</i>)	Abundante (66%)	Competencia-lisis-antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T3 (<i>T. harzianum</i>)	Abundante (68%)	Competencia-lisis
	T4 (<i>T. asperellum</i>)	Nula	Competencia halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T5 (<i>T. asperellum</i>)	Abundante (66%)	Competencia-lisis-antibiosis pigmentación ligera amarilla del medio
PHY6	T6 (<i>T. virens</i>)	Abundante (100%)	Competencia-antibiosis pigmentación amarilla del medio
	T7 (<i>T. longibrachiatum</i>)	Baja (32%)	Competencia- antibiosis pigmentación amarillo fosforescente al medio
	T8 (<i>T. harzianum</i>)	Media (48%)	Competencia-lisis-antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T9 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (31%)	Competencia- antibiosis pigmentación ligera amarilla del medio
	T10 (<i>T. asperellum</i>)	Media (39%)	Competencia- antibiosis halo rojo y pigmentación amarilla del medio
	T11 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (32%)	Competencia.
	T12 (<i>T. inhamatum</i>)	Media (54%)	Competencia- antibiosis pigmentación amarilla del medio y halo amarillo
	T13 (<i>T. gamsii</i>)	Nula	Competencia
	T14 (<i>T. asperellum</i>)	Media (39%)	Competencia
	T15 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (19%)	Competencia

Cuadro 6. Esporulaci3n e interacci3n de distintos aislados de *Trichoderma* spp. con *P. parasitica* cepa PHY7 en confrontaci3n dual.

CEPA <i>P. parasitica</i>	CEPAS <i>Trichoderma</i> (ESPECIE)	ESPORULACI3N (%)	INTERACCI3N
PHY7	T1 (<i>T. asperellum</i>)	Media (50 %)	Competencia
	T2 (<i>T. harzianum</i>)	Media (53%)	Competencia-lisis-antibiosis pigmentaci3n ligera del medio- halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T3 (<i>T. harzianum</i>)	Media (47%)	Competencia-lisis
	T4 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (12%).	Competencia-antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T5 (<i>T. asperellum</i>)	Media (56%)	Competencia-lisis-antibiosis halo rojizo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T6 (<i>T. virens</i>)	Abundante (89%)	Competencia-lisis-antibiosis pigmentaci3n amarilla del medio- halo amarillo y caf3 alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T7 (<i>T. longibrachiatum</i>)	Media (48%)	Competencia-antibiosis pigmentaci3n amarillo fosforescente del medio
	T8 (<i>T. harzianum</i>)	Media (56%)	Competencia-lisis-antibiosis halo amarillo ligero alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T9 (<i>T. asperellum</i>)	Media (54%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T10 (<i>T. asperellum</i>)	Media (51%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i> y pigmentaci3n rojiza del medio
	T11 (<i>T. asperellum</i>)	Media (41%)	Competencia.
	T12 (<i>T. inhamatum</i>)	Abundante (75%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T13 (<i>T. gamsii</i>)	Nula.	pigmentaci3n naranja-caf3 del medio Competencia
	T14 (<i>T. asperellum</i>)	Media (61%)	Competencia- antibiosis halo rojo alrededor de <i>P. parasitica</i> pigmentaci3n rojiza-caf3
	T15 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (28%)	Competencia

Cuadro 7. Esporulaci3n e interacci3n de distintos aislados de *Trichoderma* spp. con *P. parasitica* cepa PHY8 en confrontaci3n dual.

CEPA <i>P. parasitica</i>	CEPAS <i>Trichoderma</i> (ESPECIE)	ESPORULACI3N (%)	INTERACCI3N
PHY8	T1 (<i>T. asperellum</i>)	Media (55 %)	Competencia- antibiosis pigmentaci3n amarilla del medio
	T2 (<i>T. harzianum</i>)	Media (53%)	Competencia-antibiosis pigmentaci3n amarilla en <i>P. parasitica</i>
	T3 (<i>T. harzianum</i>)	Media (47%)	Competencia-antibiosis pigmentaci3n amarilla-anaranjada en <i>P. parasitica</i>
	T4 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (12%).	Competencia-antibiosis halo amarillo-rojizo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T5 (<i>T. asperellum</i>)	Abundante (79%)	Competencia-antibiosis pigmentaci3n rojiza del medio-halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T6 (<i>T. virens</i>)	Abundante (81%)	Competencia-antibiosis pigmentaci3n amarilla de medio-halo amarillo-caf3 alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T7 (<i>T. longibrachiatum</i>)	Media (55%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i> - pigmentaci3n anaranjado-rojizo del medio
	T8 (<i>T. asperellum</i>)	Media (60%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T9 (<i>T. asperellum</i>)	Media (38%)	Competencia- antibiosis halo ligero amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T10 (<i>T. asperellum</i>)	Abundante (89%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i> .
	T11 (<i>T. asperellum</i>)	Abundante (85%)	Competencia.-antibiosis pigmentaci3n ligera amarilla del medio
	T12 (<i>T. inhamatum</i>)	Media (55%)	Competencia- antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i> y pigmentaci3n anaranjado rojizo
	T13 (<i>T. gamsii</i>)	Nula	Competencia
	T14 (<i>T. asperellum</i>)	Abundante (77%)	Competencia-antibiosis halo amarillo alrededor de <i>P. parasitica</i>
	T15 (<i>T. asperellum</i>)	Baja (28%)	Competencia

4.2 Evaluación de la actividad antibiótica *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. contra cepas de *P. parasitica*

El tiempo en que los testigos cubrieron la superficie de la caja Petri fue de 10 días, durante este tiempo se realizaron cada 24 hrs tomas de datos para la variable evaluada.

4.2.1 Porcentaje de inhibición

De los resultados del experimento factorial completamente al azar, se tomó en cuenta la tabla de análisis de varianza y se observaron diferencias significativas entre las 45 confrontaciones, por lo cual se procedió a realizar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), para determinar la mejor interacción (Cuadro 8). En el porcentaje de inhibición se tuvieron variaciones de 21.62 a 100 %; las interacciones con mayor porcentaje de inhibición fueron la PHY7T2 (*P.parasitica* cepa 7- *T.harzianum* cepa 2), PHY6T10 (*P. parasitica* cepa 6- *T. asperellum*), PHY7T14 (*P. parasitica* cepa 7- *T. asperellum* cepa 14) que con 100% de inhibición. Las interacciones con menor porcentaje de inhibición fueron la PHY6T12 (*P. parasitica* cepa 6- *T. inhamatum* cepa 12), PHY8T12 (*P. parasitica* cepa 8- *T. inhamatum* cepa 12) y PHY7T2 (*P. parasitica* cepa 7- *T. harzianum* cepa 2), con 29.54 %, 26.47 % y 21.62 % respectivamente.

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. parasitica* por aislados de *Trichoderma* spp.

INTERACCIÓN	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
PHY7T2 (<i>P.parasitica</i> cepa 7- <i>T. harzianum</i> cepa 2)	100.00	A ¹
PHY6T10 (<i>P. parasitica</i> cepa 6- <i>T.asperellum</i> cepa 10)	100.00	A
PHY7T14 (<i>P. parasitica</i> cepa 7- <i>T. asperellum</i> cepa 14)	100.00	A
PHY8T10 (<i>P. parasitica</i> cepa 8- <i>T. asperellum</i> cepa 2)	98.64	A
PHY6T11 (<i>P.parasitica</i> cepa 6- <i>T. asperellum</i> cepa 11)	98.52	A
PHY6T2 (<i>P. parasitica</i> cepa 6- <i>T. harzianum</i> cepa 2)	97.72	A

Continuación Cuadro 8.

PHY8T14 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. asperellum</i> cepa 14)	97.72	A
PHY6T13 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. gamsii</i> cepa 13)	97.05	A
PHY8T9 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. asperellum</i> cepa 9)	96.59	A
PHY6T9 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. asperellum</i> cepa 9)	95.58	A
PHY6T14 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. asperellum</i> cepa 14)	95.45	A
PHY6T5 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. asperellum</i> cepa 5)	95.45	A
PHY8T8 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. harzianum</i> cepa 8)	95.45	A
PHY8T3 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. asperellum</i> cepa 3)	94.11	A
PHY8T2 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. harzianum</i> cepa 2)	94.11	A
PHY6T1 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. asperellum</i> cepa 1)	92.64	A
PHY6T3 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. inhamatum</i> cepa 3)	92.04	A
PHY7PT5 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. asperellum</i> cepa 5)	91.89	A
PHY6T8 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. harzianum</i> cepa 5)	89.77	A
PHY8T1 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. asperellum</i> cepa 1)	89.7	A
PHY8T7 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. longibrachiatum</i> cepa 7)	89.7	A
PHY7T1 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. asperellum</i> cepa 1)	89.18	A
PHY7T7 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. longibrachiatum</i> cepa 5)	89.83	BA
PHY7T9 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. asperellum</i> cepa 9)	87.83	BA
PHY6T7 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 – <i>T. longibrachiatum</i> cepa 7)	87.5	BA
PHY7T10 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. asperellum</i> cepa 10)	86.48	BA
PHY8T5 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 – <i>T. asperellum</i> cepa 5)	85.29	BA
PHY7T3 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 – <i>T. harzianum</i> cepa 3)	85.13	BA

Continuación Cuadro 8.

PHY8T11 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 11)	83.82	BA
PHY7T8 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. harzianum</i> cepa 8)	83.78	BA
PHY8T15 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 15)	82.35	BAC
PHY7T1 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. asperellum</i> cepa 1)	79.73	BACD
PHY8T13 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. gamsii</i> cepa 13)	79.41	BACD
PHY6T15 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. harzianum</i> cepa 15)	77.27	BACD
PHY7T15 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. asperellum</i> cepa 15)	77.02	BACD
PHY6T6 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. virens</i> cepa 6)	76.13	EBACD
PHY7T4 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. asperellum</i> cepa 4)	62.16	EBCD
PHY8T4 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. asperellum</i> cepa 4)	55.88	EFCD
PHY8T6 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. virens</i> cepa 6)	55.88	EFCD
PHY6T4 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. asperellum</i> cepa 4)	54.54	EFD
PHY7T6 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. virens</i> cepa 6)	50	EGF
PHY6T12 (<i>P. parasitica</i> cepa 6 - <i>T. inhamatum</i> cepa 12)	29.54	GFH
PHY8T12 (<i>P. parasitica</i> cepa 8 - <i>T. inhamatum</i> cepa 12)	26.47	GH
PHY7T2 (<i>P. parasitica</i> cepa 7 - <i>T. harzianum</i> cepa 2)	21.62	H

¹ Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

En los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de las cepas patogénicas, se observó de manera general que algunas cepas de *P. parasitica* crecieron más que otras al ser confrontadas con las cepas de *Trichoderma* spp. lo que significó que el antagonista ejerció su capacidad antibiótica; teniendo así que los aislados de *Trichoderma* spp. mostraron el mayor porcentaje de inhibición para la cepa PHY6 con un 85.15%, seguida por la cepa PHY7 con un 81.37% y por último la PHY8 con un 80.09%.

En el experimento completamente al azar, el análisis de varianza mostró diferencias significativas, por lo que se realizó la prueba de separación de medias Tukey, misma que permitió distinguir 5 grupos en base a su capacidad de inhibición del crecimiento de la cepa PHY6 de *P. parasitica*. El porcentaje de inhibición tuvo variaciones de 25.87 a 97.5 %; las cepas T14, T10, T9 que corresponden a la especie *T. asperellum*, la T2 que pertenece a la especie *T. harzianum*, seguidas por la cepa T13 que corresponde a la especie *T. gamsii*, mostraron un mayor porcentaje de inhibición, sin embargo; la cepa T12 que pertenece a la especie *T. inhamatum* ejerció el menor porcentaje de inhibición. En el cuadro 9 se muestran los resultados para el resto de las cepas. En la Fig. 5, se observa la inhibición del crecimiento de la cepa PHY6 con las diferentes especies de *Trichoderma* spp.

Cuadro 9. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa PHY6 de *P. parasitica* frente a cepas de *Trichoderma* spp.

CEPA	ESPECIE	PORCENTAJE INHIBICIÓN	
T14	<i>T. asperellum</i>	97.50	A ¹
T2	<i>T. harzianum</i>	96.79	A
T10	<i>T. asperellum</i>	95.00	A
T9	<i>T. asperellum</i>	92.96	A
T13	<i>T. gamsii</i>	91.55	BA
T5	<i>T. asperellum</i>	90.88	BA
T3	<i>T. harzianum</i>	90.43	BA
T11	<i>T. asperellum</i>	90.24	BA
T8	<i>T. harzianum</i>	89.22	BA
T7	<i>T. longibrachiatum</i>	88.34	BA
T1	<i>T. asperellum</i>	87.16	BA
T15	<i>T. asperellum</i>	78.88	B
T6	<i>T. virens</i>	60.67	C
T4	<i>T. asperellum</i>	57.53	C
T12	<i>T. inhamatum</i>	25.87	D

¹ Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

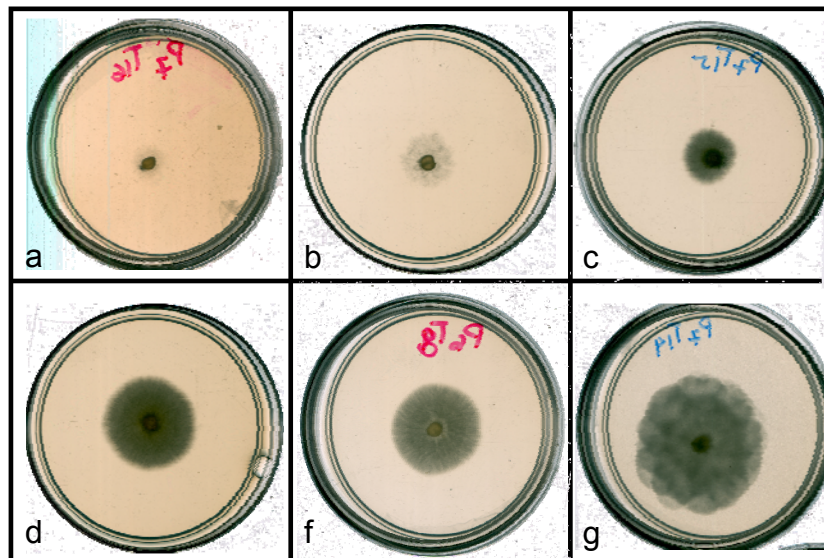


Fig. 5 Cepa PHY6 de *P. parasitica* crecida en medio de cultivo PDA donde antes creció *Trichoderma* con 7 días de incubación a $\pm 23^{\circ}\text{C}$. a) *T. asperellum* b) *T. harzianum* c) *T. gamsii* d) *T. longibrachiatum* e) *T. virens* f) *T. inhamatum*.

Los diferentes resultados de los porcentajes de inhibición para las 15 especies de *Trichoderma* coinciden con lo observado por Dennis y Webster (1971 a/b), estos autores, fueron los primeros en describir las propiedades antagonicas de *Trichoderma* en términos de producción de antibióticos; ya sea de naturaleza volátiles y no-volátiles, capaces de inhibir el crecimiento micelial de varias especies de hongos; en adición Ghisalberti y Sivasithamparam (1991) mencionan que especies de *Trichoderma* producen sustancias antifúngicas que actúan inhibiendo el crecimiento de algunos microorganismos.

Bruce (1984, 2000) reporta que las especies de *Trichoderma*, producen compuestos orgánicos volátiles; mismos que inducen fungistasis y efectos fungicidas contra diversos microorganismos; señala que algunos compuestos volátiles pueden identificarse como: 2 propanona, 2-metyl-1-butanol, heptanol, octanol y decanol.

La mayoría de los estudios muestran que especies de *Trichoderma* poseen un gran potencial antagonico contra diversos hongos, debido a la producción de varios compuestos químicos; en el presente trabajo, en la evaluación de la actividad antibiótica por medio de la prueba del celofán; se encontró que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. tienen efectos antibióticos; ya que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno; sin embargo, se puede observar que entre mismas especies existen diferencias en el porcentaje de inhibición de crecimiento de las cepas patogénicas, lo que refleja una interacción

antagonista-patógeno, aseveración que se respaldada por lo encontrado por Bettucci *et al.*, (1988) y Bruce, (1984), los cuales mencionan que las especies de *Trichoderma* pueden generar diferentes porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de otros microorganismos, inclusive dentro de su mismo genero.

En relación a la especie de *T. harzianum*, en los porcentajes de inhibición de las 3 cepas, se tuvieron variaciones, lo que significó que en mismas especies existen diferentes porcentajes de inhibición. Teniendo así, la cepa T2 que generó un 96.79% de inhibición del crecimiento patogénico, seguida por T3 con un 90.43% y por ultimo la T8 con un 89.22%. Ghisalberti y Sivasithamparam (1991) reportan que existen 14 metabolitos que produce *T. harzianum* que funcionan como compuestos con fuerte poder antagónico como el dióxido de carbono, etanol, trichorzianinas, alquil pirona, 6-(Pent-1-enil)- α -pirona, 6-pentil- α -pirona, entre otros; aunque estos últimos son los más estudiados debido a su potente actividad antifúngica que muestran sobre diferentes especies de hongos, tales como *Aspergillus niger*, *Pestalotia rhododendri*, *Ceratocystis* spp., *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y para los oomycetos *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.

Con respecto a lo anterior Arias *et al.*, (2006) mencionan que las diferencias en el porcentaje de inhibición entre cepas de la misma especie de *Trichoderma*, se debe entre otras características, a su mayor o menor capacidad de producir enzimas específicas que degradan la pared celular del organismo patógeno. De esta misma forma Lorito *et al.*, (1994) y Haran *et al.*, (1995) mencionan que las principales enzimas que se producen son quitinasas, glucanasas y enzimas hidrolíticas, mismas que degradan la pared celular de hongos fitopatógenos y que, entre mayor es la cantidad producida, mayor es la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio del patógeno. De la misma forma, Dennis y Webster (1971 a/b) mencionan que en mismas especies de *Trichoderma* demuestran diferente potencial antagónico; lo que significa que difieren en la producción de metabolitos difusibles al medio de cultivo y que poseen la capacidad de producir distintos compuestos que ejerzan un papel antagónico con determinado patógeno.

Barakat *et al.*, (2007) señalan que en la interacción *T. harzianum* y *Rhizoctonia solani* existen diferencias significativas en la inhibición del crecimiento miceliar del patógeno entre mismas especies, y que este evento puede ocurrir a las variaciones de la temperatura y su habilidad

antagonista puede ser altamente variable; ya que solo el 11.5% de 39 aislados de *Trichoderma* spp. fueron efectivos en el control de *R. solani*.

Arias *et al.*, (2006) realizaron pruebas de confrontación entre el patógeno *Phytophthora nicotianae* y el antagonico *T. harzianum*, mismas que mostraron un 8.3 % de inhibición del patógeno, sin embargo en pruebas de producción de metabolitos difusibles al medio, esta misma interacción resultó en un 95% de inhibición del patógeno.

Kundu y Chatterjee (2003) publicaron que en pruebas de producción de metabolitos volátiles, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum* inhibieron el crecimiento del patógeno *Polyporus sanguineus* en 67.7, 61.1 y 64.4% respectivamente y que en pruebas de producción de metabolitos no-volátiles se obtuvo un 100% en la inhibición del crecimiento.

Por otro lado Michel *et al.*, (2001) mencionan que *T. virens* y *T. harzianum* mostraron, en pruebas *in vitro*, una inhibición del crecimiento contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinans* arriba del 60% y que dichas cepas se consideraron como agentes potenciales de control biológico de los causantes de la escoba de bruja en mango.

Los resultados obtenidos para la especie *T. gamsii* que corresponde a la cepa T13, mostró un 91.55% de inhibición del crecimiento sobre *P. parasitica*, considerado como un alto porcentaje, que esta relacionado con una importante producción de compuestos antifúngicos, mismos que están reportados para esta especie enzimas como las quitinasas que funcionan como degradadoras de paredes celulares (Haran *et al.*, 1995)

La especie *T. longibrachiatum* que corresponde a la cepa T7, mostró un 88.34% de inhibición del crecimiento sobre los aislados de *P. parasitica*. Ghisalberti y Sivasithamparam (1991) mencionan que esta especie antagonica produce compuestos como el trichodermin, trichodermol, paracelsin a-d, trichobrachim y T-2 toxin, entre otros metabolitos volátiles con actividad antifúngica a los cuales se les atribuye los resultados observados en esta interacción.

Michel *et al.* (2008); obtuvieron 20 aislados de *Trichoderma* spp., de los cuales se identificaron tres especies: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. koningii*, todos los aislados de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* y

Phytophthora infestans, los valores fluctuaron significativamente entre 38.8% a 81.3% y 16.3% a 85.5%, respectivamente; y en este caso, de los 20 aislados evaluados, al menos 10 inhibieron el crecimiento de ambos hongos en un 65%.

La especie *T. virens* que corresponde a la cepa T6, generó un 60.67 % de inhibición del crecimiento del patógeno *P. parasitica*. En relación a lo anterior Howell y Stipanovic (1983) y Taylor (1986) mencionan que *T. virens* produce antibióticos como la gliotoxina y el glioviridin mismos que inhiben el crecimiento del hongo patógeno en pruebas de celofán.

La especie *T. inhamatum*, cepa T12, mostró el porcentaje de inhibición más bajo con un 25.87% sobre cepas de *P. parasitica*. Ghisalberti y Sivasithamparam (1991) mencionan que existe una relación filogenética entre metabolitos producidos por especies de *Trichoderma* spp. en este caso con la especie *T. hamatum* por lo que no se descarta la posibilidad de que la poca inhibición del patógeno se debió a la baja producción de antibióticos. Algunos de los antibióticos reportados para esta especie son el trichoviridin, las isocianidas y el isonitrin.

Los resultados de las evaluaciones de la actividad antagónica y antibiótica, al ser comparadas, muestran que mismas especies tiene la capacidad de respuesta diferente, lo que significa que no existe una correlación entre antibiosis y antagonismo. La especie *T. harzianum* (cepa T2) y *T. asperellum* (cepa T10) en ambas pruebas mostraron un mismo potencial biocontrolador, sin embargo, la especie *T. gamsii* (cepa T13) mostró una fuerte actividad antibiótica pero ocupó el último sitio en las pruebas de actividad antagónica, lo que sugiere una baja actividad micoparasítica. Lo contrario se observó en *T. inhamatum* (cepa T14) que mostró la menor actividad antibiótica y sin embargo, fue de las más sobresalientes en las pruebas de antagonismo. Cepas como la T11 y T5 que corresponden a la especie *T. asperellum* tuvieron comportamiento similares en ambas pruebas, ubicándose dentro de los niveles medios aceptables dentro del control biológico.

Esto nos indica que para que un agente de control biológico sea eficaz y efectivo debe conjuntar características esenciales, tales como un alto nivel de competencia por espacio y nutrientes, alto micoparasitismo, lo cual está estrechamente relacionado con la producción de enzimas degradadoras de paredes celulares, una fuerte actividad antibiótica, así como producción de sustancias que induzcan fungistasis; de esta forma Papavizas, (1985); Lorito *et al.*, (1993 b-1994) Y Monte (2001) mencionan que la combinación de enzimas hidrolíticas

y de antibióticos resulta en una reacción sinérgica, lo que resulta en un alto nivel de antagonismo comparado con el obtenido por separado. Asimismo, existe una gran diversidad genética de cepas de *Trichoderma* spp. con diferentes mecanismos de acción que actuando sinérgicamente incrementan el control del patógeno (Howell, 2003).

Con base en los resultados obtenidos en ambas pruebas, se identificaron 8 cepas como potenciales organismos biocontroladores del agente causal de la pata prieta de la jamaica, las cuales corresponden a T14, T9, T10, T11, (*T. asperellum*), T2 y T3 (*T. harzianum*), T12 (*T. inhamatum*) y T13 (*T. gamsii*); considerando el principio que menciona que, para que un agente de control biológico tenga éxito, deben considerarse diferentes factores, tales como, las condiciones climáticas y el hábitat, los cuales deben ser adecuados para su crecimiento y para que invadan o afecten a los fitopatógenos que se desea controlar (Andrews, 1992). De la misma forma Baker y Cook (1974) mencionan que el principal problema en la efectividad del control biológico de fitopatógenos es que los organismos empleados, no están adaptados a las condiciones ambientales locales donde serán aplicados; es decir, que las condiciones térmicas deben ser compatibles con las del patógeno de dicha región, ya que la producción enzimática está influenciada por la temperatura del ambiente (Watanabe *et al.*, 2005); por lo tanto, los organismos nativos que poseen esta ventaja, junto con otros caracteres fisiológicos, podrán manifestar al máximo su potencial antagónico contra los fitopatógenos más comunes en determinadas regiones.

Sin embargo; Hutchinson, (1971) menciona que la selección previa del antagonista en medio de cultivo duales y pruebas de metabolitos no volátiles es útil pero no garantiza el buen comportamiento de estas cepas en el invernadero y campo; por lo tanto, es necesario distinguir entre los metabolitos volátiles obtenidos en condiciones controladas de laboratorio y aquellos producidos en campo, los resultados *in vitro* solo indican capacidades potenciales, y la medida en que las mismas se expresaran dentro de cada ecosistema estará en función del balance entre la producción y la pérdida de los metabolitos, así como de la sensibilidad de los microorganismos.

5. CONCLUSIONES

Las cepas T2 (*T. harzianum*) y la T10 (*T. asperellum*) mostraron un comportamiento similar en ambas pruebas, por lo que se consideran como las de mayor potencial biocontrolador contra el causante de la pata prieta de la jamaica.

Las cepas T11 y T5 (*T. asperellum*) tuvieron comportamiento similar en ambas pruebas ubicándose dentro de los niveles medios aceptables dentro del control biológico.

La capacidad antagónica y porcentaje de inhibición en las especies de *Trichoderma* son variables que no están correlacionadas.

Las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. presentan variación específica; dado que cepas de la misma especie, muestran diferentes grados de inhibición del crecimiento y actividad antagónica al confrontarse con las cepas de *P. parasitica*.

6. LITERATURA CITADA

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30:603-635
- Arias, M., Herrera, R., Besoain, X., Pérez, L. M. y Montealegre, J. 2006. Evaluación *in vitro* de mutantes de cepas de *Trichoderma* para el control de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae* en tomate. Boletín Micológico 21: 71-75
- Baker, K. F. and Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. First edition. CRS Press. Freeman, San Francisco, CA, USA
- Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as a plant growth regulators. CRC Critical Reviews in Biotechnology 7:97-106
- Barakat, R. M., Al-Mahareeq, F.; Ali-Shtayeh M. S. and Al-Masril, M. 2007. Biological control of *Rhizoctonia solani* by indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. Hebron university research journal. 1 (3): 1-15
- 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
- Bettucci, L. S., Lupos and S. Silvas. (1998). Growth control of wood rotting fungi by non volatile metabolites from *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. Cryptogamic Mycological 9 (2): 157-165
- Bruce, A., Austin, W. J. and King, B. (1984). Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma* spp. Transactions of the British Mycological Society, 82:423-428
- Bruce, A., Wheatley, R. E., Humphris, S. N., Huckelt, C. A. and Florence M. E. J. 2000. Production on volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing

- different amino acids and their effects on selected wood decay fungi. *Holzforschung* 54: 481-486
- Chet, I., Harman, G. E. and Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology* 7:29-38
- Chet, I. 1987. Trichoderma-application, mode of action, and potencial as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet (ed.) *Innovative approaches to plant control disease*. Willey and Sons. New York, USA 137-160 p
- Chet, I., and J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry Biotechnology* 48:37-43
- Corréa S., M. Melio, Z. R. Avila, L. M. Braúna, R. R. Papua y D. Gomes. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11 (1): 3-9
- De Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, I., Leroux, P.; Ragsdale, N. N and Schwinn, F. J. 1993. Chemical Control of plant disease: Problems and prospects. *Annual Review Phytopathology* 31:403-421
- Dennis, C. y Webster, J. (1971 a) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 25-39
- Dennis, C. y Webster, J. (1971 b) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 41-48
- Dennis, C. y Webster, J. (1971 c) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society* 57(3): 363-369
- Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology* 28: 719-725
- Ezziyyani, M. Pérez-Sanchez, C., Requena, M. E., Sid Ahmed, A. and Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) *Anales de Biología* 26: 35-45
- Ezziyyani, M., Requena, M. E. y Candela, M. E.. 2005. producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*. 27:143-153

- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C. y Candela, M. E. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology* 155: 342-349
- Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Dewan, M.M, and Sivasithamparam, K. 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant Soil* 121:287-291
- Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology Biochemistry* 11 (23):1011-1020
- Grech, N.M. 1990. Fungicide resistance in plant pathogenic fungi: the problems and ways to cope. *California Grow* 14(4): 36-37
- González S., A. Puertas A., M. Fonseca F, E. Suárez S. y R. Blaya G. 1999. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. aislada de un suelo de la provincia de Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* 16: 167-173
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A and Chet, I. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research* 99:441-446
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T- 22. *Plant Disease* 84:377-393
- Harman, G. E., Howell, C. R. Viterbo, A.; Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2:43-56
- 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* 87:4-10.
- Hutchinson, S.A. 1971. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Transactions of the British Mycological Society* 57:185-200
- James, J. R.; Tweedy, B. G. and Newby, L. C.1993. Efforts by industry to improve the environmental safety of pesticides. *Annual Review Phytopathology* 31:423-439
- Kexiang, G. I., Xiaoguang, C. Ri., Yonghong, L. and Suuliang, W. 2002. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. Piricola, the cause of apple ring rot. *Phytopathology* 150:271-276
- Lorito, M., Harman G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Transmo, A., Woo S. L., DiPietro, A. 1993 (a). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitiobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307

- Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes, C. K., Woo, S. L. y Harman, G. E. 1993 (b). Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83:721-728
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K. and Harman, G. E. 1994. (b) Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140:623-629
- Michel-Aceves, A. C., Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (EUASCOMYCETES:HYPOCREALES), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (HYPHOMYCETES:HYPHALES). 2001. Tesis Doctorado. Universidad de Colima, Area de Biotecnología. Tecomán, Colima. México 160 p
- Michel-Aceves, A. C., Rebolledo-Dominguez, O., Lezama-Gutierrez, R., Ochoa-Moreno, Ma. E., Mesina-Escamilla, J. C y Samuels, G. J. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por Escoba de bruja y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista mexicana de fitopatología* 19 (2):154-160
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D.; Ariza-Flores, R. Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. 2008. Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances en investigación agropecuaria* 12(3): 55-68
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma* between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 14:1-4
- Papavizas, G.C and Lumsden, R.D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413
- Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biological control. *Annual. Review. Phytopathology* 23:23-54
- Reyes, R. T., Rodriguez, G. G., Pupo, Z. A. D.; Alarcón, P. L. y Limonta, C. Y. 2007. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai para el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Pyricularia grisea* Sacc. aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad* 11 (1):29-33
- Robinson, P. M. and Garret, M. K. 1969. Identification of volatile sporostatic factors from cultures of *Fusarium oxysporum*. *Transactions of the British Mycological Society* 52:293-299

- Robinson, P. M. and Park, D. 1966 Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 49:639-649
- Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Pérez, S. and Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109:418-426
- Smith, V. L., W. F. Wilcox and G. E. Harman. 1990. Potential for Biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80:880-885
- Sutton, J. C. and Peng, G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping system. *Annual review of phytopathology* 31:473-493
- Sivan, A. and Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum* *Journal. General Microbioly* 135 (3):675-682
- Sivakumar, D., Wilson W., R. L. C. Wijesundera, F. M. T. Marikar y Abeyesekere, M. 2000. Antagonistic Effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica* 28 (3): 240-247
- Taylor, A. 1986. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Protection Nova Scotia Inst Science* 36:27-58
- Watanabe, S., K. Kumakura, H. Kato, H. Iyozumi, M. Togawa and K. Nagayama. 2005. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1 *Journal General Plant Pathology* 71 351–356
- Wells, D. H., D. K. Bell y C. A. Jaworski. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-447
- Wilson, M. and Backman, P. A. 1998. Biological control of plant pathogens. IN: J. R. Rubozan (ed.) *Handbook of pest management*. Marcel Dekker. New York. USA. Pp 309-335
- Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., and Rowland, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98: 1357-1363

- Vera, R., Moreno, B., Acevedo, R. y Trujillo, E. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. *Fitopatología Venezolana* 18 (1): 2-8
- Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied. Environmental. Microbiology* 65:1061-1070
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2000. Induction and accumulation of proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology Biochemistry* 38:863-873

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

1. CONCLUSIONES

Los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. ratifican la capacidad cosmopolita de este organismos y su diversidad, debido a que de 15 cepas aisladas se tuvieron 6 especies diferentes.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. mostraron un gran potencial antagónico y antibiótico; por lo que se les considera como una alternativa de biocontrol.

Las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas en suelos con alta incidencia de *P. parasitica* están adaptadas a las condiciones del agroecosistema de jamaica.

2. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar pruebas en invernadero y campo para evaluar el verdadero potencial antagónico e inhibidor de las mejores cepas determinadas en este estudio, para que se constituya en una alternativa viable y ecológica para los productores de jamaica.