



**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE
CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. SOBRE HONGOS
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL MANCHADO DEL CÁLIZ EN
JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) †**

**[IDENTIFICATION AND *IN VITRO* ANTAGONISM EVALUATION OF
NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* spp. ON PHYTOPATHOGENIC
FUNGI ASSOCIATED WITH CHALICE SPOT IN JAMAICA (*Hibiscus
sabdariffa* L.)]**

**Teolincacihuatl Romero-Rosales¹, Jesús Acuña-Soto^{2*}, Ausencio Azuara-
Domínguez³, Martha Olivia Lázaro-Dzul⁴, Abraham Monteon-Ojeda¹,
Haidel Vargas-Madriz⁵ and Yulissa Secundino-Eusebio¹**

¹ Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Javier Méndez Aponte 1, Fraccionamiento Servidor Agrario, Chilpancingo, Guerrero, C. Postal 39070, México. Emails: teolinc@hotmail.com, abraham.monteon@gmail.com, yulisecondino.1822@gmail.com.

² Instituto Tecnológico Superior de Tlatlauquitepec, Carretera Federal Amozoc-Nautla Km. 122+600 Almoloni Tlatlauquitepec, Pue., Teziutlán-Acajete, 73907 Puebla, México. Email: acunas@colpos.mx.

³ Instituto Tecnológico de Altamira, Carr. Tampico-Mante Km. 24.5. CP: 89600, Altamira, Tamaulipas. Email: azuarad@gmail.com.

⁴ Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, km 35.5, Carr. México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C. P. 56230, México. Email: dzulmartha@gmail.com.

⁵ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Departamento de Producción Agrícola, Avenida Independencia Nacional 151, Colonia Centro, Autlán de Navarro, Jalisco, C.P. 48900, México. Email: haidel_vargas@hotmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background: Mexico is the seventh largest producer of jamaica in the world, Guerrero represents the entity with the largest area planted and produces >60% of the country's jamaica. The crop has numerous phytosanitary limitations, among which the chalice staining associated with a fungal complex stands out. The main damage occurs in flowering, reporting losses of 50 to 100% in areas without adequate phytosanitary management. The use of strains of *Trichoderma* spp. with antagonistic capacity, it represents a viable ecological alternative for the ecological management of the disease. **Objective:** to identify native strains of *Trichoderma* spp. and to evaluate its antagonistic capacity in vitro on important phytopathogenic fungi in the cultivation of hibiscus. **Methodology:** the research was developed in the 2018-2019 cycle in the Microbiology Laboratory of the Faculty of Agricultural and Environmental Sciences of University of Guerrero, Iguala, Guerrero. Systematic soil samplings were carried out in jamaica producing areas in Tecoaapa, Guerrero. The isolates were obtained by serial decimal dilutions and consecutive re-isolates until obtaining pure monospore colonies. The isolates generated were identified morphologically and molecularly. The antagonistic capacity in vitro of each *Trichoderma* isolate was evaluated against purified monospore strains of *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassicola* and *Coniella diplodiella*. A completely randomized design was established with four repetitions per interaction, an analysis of variances and multiple comparison of means (Tukey, $p < 0.05$) of the variables was performed: percentage of radial growth inhibition (PICR), days until first contact between hyphae (DCH) and area of intersection. Four isolates of *Trichoderma* spp. with particular morphological and growth characteristics. **Results:** with the help of the keys of Barnett and Hunter (1998) and Samuels (2006), and the sequences resulting from the molecular tests, it was possible to identify with 99% similarity to *T. virens* and *T. longibrachiatum* as *Trichoderma* species dominant in soils of jamaica producing areas of Guerrero. The results indicated that all the isolates significantly reduced the size of the colonies of the phytopathogens; the T14 isolates consistently presented the highest PICRs (75-95%); *Phytophthora parasitica* was the organism for the most part, and *Coniella diplodiella* presented the greatest resistance to invasion by antagonist agents. Isolate T14 was identified as the one that most inhibited the development of all pathogenic agents (89.25%). In dual confrontations, the hyphae of both

† Submitted October 25, 2020 – Accepted December 7, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462.

microorganismos made contact at 3.25 days after sowing on average. Isolate T14 (*T. longibrachiatum*) was identified as the one with the highest levels of interaction zone and based on the linear regression analysis and Pearson's correlation coefficient, a wide relationship between the zone area of interaction and the percentage of inhibition of the control agents. **Implications:** It is proposed to continue the study in the field phase, incorporating what was obtained in an integrated pest management (IPM) system. **Conclusions:** these results contribute to the agronomic management of jamaica in the region as a precedent in the search for alternatives for managing diseases with low environmental impact, also contributing to the determination of the etiology of the disease.

Key words: isolate; biological control; dual culture; disease; *Hibiscus sabdariffa*; *Trichoderma* spp.

RESUMEN

Antecedentes: México es el séptimo productor de jamaica en el mundo, Guerrero representa a la entidad con la mayor superficie sembrada y produce más del 60 % de la jamaica del país. El cultivo presenta numerosas limitantes fitosanitarias, entre las que destaca el manchado de cáliz asociado a un complejo de hongos. El principal daño se presenta en floración reportándose pérdidas del 50 a 100% en áreas sin manejo fitosanitario adecuado. El uso de cepas de *Trichoderma* spp. con capacidad antagonista, representa una alternativa ecológica viable de manejo ecológico de la enfermedad. **Objetivo:** identificar cepas nativas de *Trichoderma* spp. y evaluar su capacidad antagonista *in vitro* sobre hongos fitopatógenos de importancia en el cultivo de jamaica. **Metodología:** la investigación se desarrolló en el ciclo 2018-2019 en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Iguala, Guerrero. Se realizaron muestreos sistemáticos de suelo en áreas productoras de jamaica en Tecoaapa, Guerrero. Los aislados se obtuvieron por diluciones decimales seriadas y re-aislamientos consecutivos hasta obtener colonias monospóricas puras. Los aislados generados se identificaron morfológicamente y molecularmente. Se evaluó la capacidad antagonista *in vitro* de cada aislado de *Trichoderma* contra cepas monospóricas purificadas de *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassicola* y *Coniella diplodiella*. Se estableció un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por interacción, se realizó un análisis de varianzas y comparación múltiple de medias (Tukey, $p < 0.05$) de las variables: porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), días hasta primer contacto entre hifas (DCH) y zona de intersección. Se obtuvieron cuatro aislados de *Trichoderma* spp. con características morfológicas y de crecimiento particulares. **Resultados:** con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1998) y Samuels (2006), y las secuencias resultantes de las pruebas moleculares se pudo identificar con 99 % de similitud a *T. virens* y *T. longibrachiatum* como las especies de *Trichoderma* dominantes en suelos de zonas productoras de jamaica en Guerrero. Los resultados indicaron que todos los aislados redujeron significativamente el tamaño de las colonias de los agentes fitopatógenos; de manera consistente el aislamiento T14 presentó los PICR más altos (75 – 95%); *Phytophthora parasitica* fue el organismo mayormente inhibido y *Coniella diplodiella* presentó la mayor resistencia a la invasión de los agentes antagonistas. Se identificó al aislamiento T14 como aquel que inhibió mayormente el desarrollo de todos los agentes patógenos (89.25%). En confrontaciones duales las hifas de ambos microorganismos hicieron contacto a los 3.25 días después de la siembra en promedio. Se identificó al aislamiento T14 como aquel con los niveles de zona de interacción más altos y en base en el análisis de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson, pudo determinarse una amplia relación entre el área de zona de interacción y el porcentaje de inhibición de los agentes de control. **Implicaciones:** Se plantea continuar el estudio en fase de campo incorporando lo obtenido en un sistema de manejo integrado de plagas (MIP). **Conclusiones:** estos resultados contribuyen al manejo agronómico de la jamaica en la región como precedente en la búsqueda de alternativas de manejo de enfermedades con bajo impacto ambiental, aportando también a la determinación de la etiología de la enfermedad.

Palabras clave: aislado; control biológico; cultivo dual; enfermedad; *Hibiscus sabdariffa*; *Trichoderma* spp.

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de India y zonas aledañas en el continente asiático (Morton, 1987). México es el séptimo productor del cultivo con un 6 % de la producción mundial (98,000 ton/año) (FAO, 2015). En el estado de Guerrero, se cultivan alrededor de 14 mil ha de jamaica, la entidad representa al principal productor a nivel nacional con más del 60 % de la producción (SIAP, 2017). En la entidad, la principal zona productora se ubica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa (SIAP, 2017). En estas regiones, el cultivo de jamaica es una actividad agrícola importante por ser una fuente de empleos e ingresos económicos de cientos de familias.

El cultivo presenta numerosas limitantes fitosanitarias entre las que destaca el manchado de cáliz, asociado a un complejo de hongos y oomicetos, principalmente *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassicola* y *Coniella diplodiella*. Los síntomas típicos de la enfermedad son la necrosis basal, marchitez generalizada, clorosis en hojas, manchado y pudrición de cáliz y muerte de la planta (Amrutha *et al.*, 2014; Mohiddin *et al.*, 2010). En años recientes la enfermedad ha tomado importancia económica, presenta una amplia distribución y se considera el principal problema fitosanitario del cultivo. El principal daño se presenta en floración ocasionando pérdidas significativas en la producción de cálices de calidad (Ortega-Acosta, 2015). Se calcula que la enfermedad puede ocasionar pérdidas del 50 a 100%

en áreas sin manejo fitosanitario adecuado (Ortega-Acosta, 2015; Michel-Aceves *et al.*, 2019).

En las zonas productoras de la entidad, el manejo fitosanitario es limitado. Además, no se realizan aplicaciones de fungicidas debido a la naturaleza del producto final (consumo en fresco o infusión de cálices). En base a lo anterior, es necesario generar alternativas inocuas de manejo de la enfermedad. El control biológico de la enfermedad mediante el uso de antagonistas naturales, es una alternativa viable con características ecológicas y sustentables. *Trichoderma* spp., es una especie ampliamente utilizada para el control de plagas y enfermedades disminuyendo la dependencia al uso de medios químicos (Ezziyyani *et al.*, 2004).

El género de *Trichoderma* spp., cuenta con más de 200 especies ampliamente distribuidas en diversas regiones geográficas y zonas climáticas en el mundo (Michel-Aceves *et al.*, 2019); la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. en hongos fitopatógenos se basan en la asociación de múltiples mecanismos como la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo, antibiosis e inducción de respuestas de defensa (De Aguiar *et al.*, 2014; Gilchrist-Ramelli, 2015; Vargas-Hoyos, 2015). Durante el proceso de micoparasitismo, *Trichoderma* spp. sintetiza enzimas como proteasas, quitinasas y glucanasas, que hidrolizan las paredes celulares de otros hongos y oomicetos inhibiendo la germinación de esporas, elongación del tubo germinativo y, por lo tanto, la invasión a la planta (Marcello *et al.*, 2010; Romero-Cortes *et al.*, 2016). Además del conocido mecanismo de antagonismo con otros microorganismos, *Trichoderma* spp., está asociada con la rizósfera de plantas promoviendo la solubilización de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso; así como la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento (García-Espejo *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017; Torres-De la Cruz *et al.*, 2015). En base a lo anterior, en la presente investigación se planteó el objetivo de identificar y caracterizar morfológica y molecularmente cepas nativas de *Trichoderma* spp. y evaluar su capacidad antagonista *in vitro* sobre hongos fitopatógenos de importancia en el cultivo de jamaica como una alternativa de manejo fitosanitario inocua, sustentable y redituable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

La investigación se desarrolló durante el ciclo 2018-2019 en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Iguala, Guerrero.

Muestreo

Se realizaron muestreos sistemáticos de suelo en áreas productoras de jamaica (*H. sabdariffa*) de la localidad de Villa Hermosa municipio de Tecoaapa, Guerrero. Se utilizó un muestreo en cinco de oros, se tomaron muestras de suelo a 20 cm de profundidad, eliminando los primeros 4 cm. Se obtuvo una muestra compuesta de 4 kg, se homogeneizó y se tomó 1 kg. La muestra se almacenó, etiquetó y mantuvo a 10 °C hasta su procesamiento en laboratorio.

Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Los aislamientos se realizaron en base a la metodología propuesta por Sandoval y Stefanova (2000). Se realizaron diluciones decimales seriadas para esto, se pesó 1 g de suelo por muestra y se diluyó en 9 mL (1:10 p/v) de agua destilada estéril para preparar una solución madre. A partir de esta, se realizaron tres diluciones decimales seriadas sucesivas hasta 1×10^{-3} . Se tomaron 0.1 mL de dichas diluciones para realizar la siembra en cajas Petri con medio de cultivo PDA (23 g L^{-1}) a pH 5.6 ± 0.2 . Se utilizaron tres repeticiones por disolución por muestra de suelo. Las cajas Petri fueron mantenidas por 10 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en donde se realizaron observaciones diarias. En condiciones de asepsia, se tomaron porciones superficiales de las colonias con mayor crecimiento y presencia de micelio con características morfológicas y de crecimiento típicas de *Trichoderma* spp. (crecimiento con áreas verdes y formación de anillos concéntricos). A partir de estas, se preparó una suspensión de 1×10^{-4} esporas por mL y se realizó una re-siembra en medio agua agar (25 g L^{-1}). Del crecimiento micelial de estas cepas, se obtuvo de cada caja y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, una sola espора germinada que fue re-sembrada en una nueva caja Petri con medio PDA con el objetivo de generar aislados monospóricos que garanticen la pureza genética y reduzcan el riesgo de contaminación. La caracterización de los especímenes obtenidos se realizó en base a las claves de Barnett y Hunter (1998) y Samuels (2006), con la ayuda de un microscopio compuesto, se identificaron características típicas del género, como el desarrollo de conidióforos hialinos muy ramificados, no verticilados, con fiálides individuales o en grupos, con fialeconidios hialinos unicelulares, ovóides formados en pequeños racimos terminales. Las colonias puras fueron conservadas en tubos de ensayo con aceite mineral para su uso posterior.

Caracterización molecular

Los aislados purificados se sembraron nuevamente en cajas Petri con medio PDA que se mantuvieron por siete días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. La extracción de DNA para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de productos se realizó de acuerdo

con la metodología propuesta por Rojas-Martínez *et al.* (2016). La PCR se realizó usando los iniciadores universales (ITS), ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Las PCR's se llevaron a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad, EE.UU.), las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, por último, la extensión final a 72 °C por 10 min. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software BioEdit y mediante la herramienta Blast del National Center Biotechnology Information (NCBI) se determinó su identidad comparando con secuencias reportadas.

Evaluación del antagonismo *in vitro* por técnica de cultivo dual

Se utilizaron cepas monospóricas purificadas de *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassicola* identificadas y obtenidas en el Instituto de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, México con números de depósito en el GenBank: KM519189, KM519188 y KM207768 respectivamente (Ortega-Acosta, 2015); y de *Coniella diplodiella* de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UAGro con ID Bankit: 2169900. Las pruebas de cultivo dual se realizaron en base a la propuesta de Morton y Stroube (1955); se obtuvieron colonias puras del oomyceto y hongos fitopatógenos antes mencionados, desarrollados en cajas Petri de 8 cm de diámetro con medio de cultivo PDA (25 g L⁻¹) en condiciones de luz: oscuridad de 8:16 horas a 25°C. Una vez obtenidas las colonias puras, se colocó un disco (fragmento de micelio 0.5 mm de diámetro) de un agente fitopatógeno a 2 cm de la periferia de la caja Petri (8 cm de diámetro) con medio de cultivo; inmediato a lo anterior, se colocaron en dichas cajas Petri, fragmentos similares con micelio de cada uno de los antagonistas (Tv1, Tv2, Tl3, Tl4) según su interacción respectivamente (Tabla 1) con el objetivo de observar el enfrentamiento en colonias desarrolladas (pruebas de enfrentamiento dual) entre los cuatro agentes patógenos y cuatro cepas de *Trichoderma* spp. caracterizadas como: Tv1, Tv2, Tl3, Tl4; lo anterior, generó 16 interacciones diferentes (Tabla 1). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz: oscuridad de 8:16 horas a 25°C durante 10 días. Para el caso de los testigos (solo crecimiento de agentes fitopatógenos), se incubaron colonias de cada uno de los agentes patógenos respectivamente en cajas Petri con medio de cultivo PDA por diez días en condiciones de luz: oscuridad de 8:16 horas a 25°C, cada 12 horas se registró el crecimiento (invasión) de la colonia con la finalidad de realizar las comparaciones y análisis respectivos.

A los 10 días después de la siembra (dds) de las cepas de *Trichoderma* spp. se evaluó la capacidad antagónica de los aislados mediante la obtención del

porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Este porcentaje se calculó aplicando la fórmula de Meza *et al.* (2008):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde R1 es el radio de colonias de hongos fitopatógenos creciendo libre de antagonistas y R2 es el radio de colonias de hongos fitopatógenos creciendo en enfrentamiento con cepas antagonistas.

Tabla 1. Interacciones entre organismos fitopatógenos y aislados de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de zonas productoras de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México.

Interacciones en pruebas de enfrentamiento dual		
Interacción	Aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	Fitopatógeno
1	Tv1	<i>Phytophthora parasitica</i>
2		<i>Fusarium oxysporum</i>
3		<i>Corynespora cassicola</i>
4		<i>Coniella diplodiella</i>
5	Tv2	<i>Phytophthora parasitica</i>
6		<i>Fusarium oxysporum</i>
7		<i>Corynespora cassicola</i>
8		<i>Coniella diplodiella</i>
9	Tl3	<i>Phytophthora parasitica</i>
10		<i>Fusarium oxysporum</i>
11		<i>Corynespora cassicola</i>
12		<i>Coniella diplodiella</i>
13	Tl4	<i>Phytophthora parasitica</i>
14		<i>Fusarium oxysporum</i>
15		<i>Corynespora cassicola</i>
16		<i>Coniella diplodiella</i>

Además, mediante lecturas cada 12 h a partir de la siembra, se obtuvo el número de días al primer contacto entre hifas (DCH); se determinó el área de la zona de intersección (cm) entre colonias mediante

mediciones diarias del diámetro de intersección entre colonias con la ayuda de un vernier digital.

Diseño experimental

Se estableció un diseño completamente al azar, se utilizaron cuatro repeticiones por interacción incluyendo al testigo sin confrontación. Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) y comparación múltiple de medias de las variables: PICR, DCH y zona de intersección utilizando la prueba estadística Tukey ($p < 0.05$) con la ayuda del software estadístico SAS system 12.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica y molecular

Se obtuvieron cuatro aislados (Tv1, Tv2, Tl3 y Tl4), quienes presentaron características morfológicas y culturales tipológicas del género *Trichoderma* (Barnett y Hunter, 1998; Samuels, 2006), y se identificaron como *T. virens* para los aislados Tv1 y Tv2 y *T. longibrachiatum* para los aislados Tl3 y Tl4. Similar a lo anterior, la amplificación del DNA ribosomal con cebadores específicos ITS 4 y 5 del DNA obtenido de los aislados de *Trichoderma* spp., produjeron secuencias de la región 5.8S del RNA ribosomal de aproximadamente 525 pb, las secuencias resultantes se enviaron al NCBI GenBank para su secuenciación; se analizaron con la herramienta BLASTn del NACBI y se encontró 99 % de similitud con *T. virens* para los aislados Tv1 (ID de acceso: MK628996) y Tv2 (ID de acceso: MN197600); y similitud del 99 % con *T. longibrachiatum* para los aislados Tl3 (ID de acceso: MN202266) y Tl4 (MN197598). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Sánchez-García *et al.* (2017) quienes, obtuvieron muestras provenientes de suelo de zonas productoras de frijol en Celaya, Guanajuato; realizaron aislamientos sistemáticos de donde obtuvieron siete diferentes aislados de *Trichoderma* spp. y que, mediante técnicas moleculares, identificaron dentro de dos especies, *T. harzianum* y *T. asperellum*.

Capacidad antagonica

Se obtuvieron los porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR) de las colonias de los aislados de *Trichoderma* spp. (Tabla 2), los resultados indicaron que todos los aislados redujeron significativamente el tamaño de las colonias de los agentes fitopatógenos, inhibiendo e invadiendo su área de crecimiento y desarrollo; de manera consistente el aislamiento Tl4 presentó los PICR más altos (75 – 95%); *Phytophthora parasitica* fue el organismo mayormente inhibido por todos los aislados, por otro lado, *Coniella diplodiella* presentó la mayor resistencia a la invasión de los agentes antagonistas (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de comparación de medias de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR), días hasta primer contacto entre hifas (DCH) y zona de intersección de múltiples interacciones entre agentes fitopatógenos y aislados de *Trichoderma* spp. nativos provenientes de zonas productoras de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México.

Interacción de aislados y fitopatógenos	PICR (%) ³	DCH	Zona de intersección (cm)
Tl4 ¹ vs P.p. ²	95 a ⁴	4	4.8 a
Tv1 vs P.p.	92 b	3	4.6 b
Tv2 vs P.p.	85 c	3	3.8 c
Tl3 vs P.p.	85 c	3	3.3 d
Tl4 vs F.o.	75 e	5	3.8 a
Tv1 vs F.o.	75 e	5	3.6 b
Tv2 vs F.o.	72 f	5	3.2 c
Tl3 vs F.o.	65 g	3	2.9 d
Tl4 vs C.c.	95 a	4	4.7 a
Tv1 vs C.c.	85 c	3	3.9 b
Tv2 vs C.c.	82 d	3	3.5 c
Tl3 vs C.c.	75 e	3	2.9 d
Tl4 vs C.d.	92 b	2	4.6 a
Tv1 vs C.d.	75 e	2	3.5 b
Tv2 vs C.d.	65 g	2	3.2 c
Tl3 vs C.d.	65 g	2	2.5 d

¹Tl4: *Trichoderma longibrachiatum* (aislado 4), Tl3: *Trichoderma longibrachiatum* (aislado 3), Tv1: *Trichoderma virens* (aislado 1) y Tv2: *Trichoderma virens* (aislado 2).

²P.p.: *Phytophthora parasitica*, F.o.: *Fusarium oxysporum*, C.c.: *Corynespora cassicola*, C.d.: *Coniella diplodiella*

³PICR: porcentaje de inhibición de crecimiento radial; DCH: días hasta primer contacto entre hifas (DCH).

⁴Medias con letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El análisis de varianzas y la comparación de medias pudieron identificar diferencias significativas en PICR de los aislamientos, y ubicó a Tl4 como aquel que de manera constante inhibió mayormente el desarrollo de todos los agentes patógenos (89.25%), seguido por Tv1, Tv2 y Tl3 con 81.75, 76.00 y 72.50 % respectivamente (Tabla 3). Similar a lo reportado en este estudio, Michel-Aceves *et al.* (2013), evaluaron aislados de *T. virens* y *T. harzianum* en pruebas *in vitro* contra *F. oxysporum* y *F. subglutinans* aislados de tejido vegetal con síntomas de escoba de bruja o proliferación vegetativa y floral del mango, reportando inhibiciones de crecimiento superiores al 60 %, consideraron a estos aislados como agentes potenciales de control biológico de la enfermedad. Del mismo modo, Espinoza-Ahumada *et al.* (2018), reportaron porcentajes de inhibición del 54.9 a 74.1

% en aislados de *Trichoderma asperellum* y de 54.9 a 64.7 % en aislados de *T. harzianum* contra cepas de *Fusarium* sp. provenientes de tejido de raíz y tallo con síntomas de pudrición en melón (*Cucurbita melon*). Similar a nuestros resultados, Sánchez-García *et al.* (2017) pudieron determinar el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* spp. en hongos fitopatógenos mediante pruebas *in vitro*, obtuvieron siete aislados que identificaron molecularmente dentro de dos especies *T. harzianum* y *T. asperellum*; los aislados inhibieron más de 70 % el crecimiento micelial de *Fusarium* spp. y *R. solani* afectando raíces en frijol. Ruocco *et al.* (2009) y Corrêa *et al.*,

(2007), mencionan que los contrastes en el porcentaje de inhibición entre aislados de la misma especie de *Trichoderma* spp., se debe entre otras características, a una diferencia en la actividad enzimática (p.e. quitinasas y glucanasas) que actúan sobre la hidrólisis de paredes celulares que limitan el crecimiento micelial. En el mismo sentido, Badar y Qureshi, (2012), sugieren que las diferencias en el potencial inhibitorio de aislados de *Trichoderma* spp. puede estar relacionado con diferencias en la tasa de síntesis de metabolitos difusibles al medio de cultivo que ejercen un efecto antagónico contra los agentes patógenos en particular.

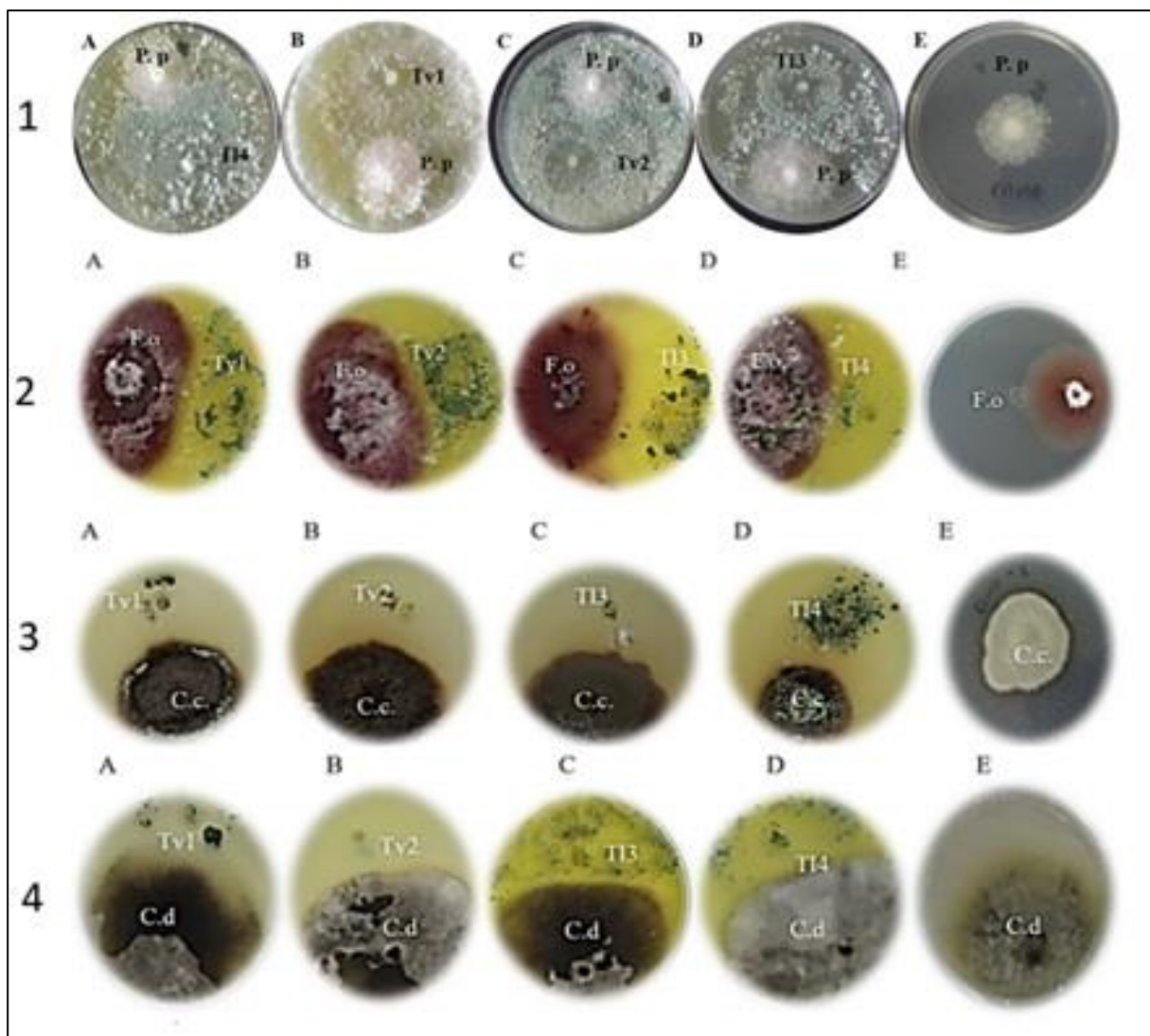


Figura 1. Zona de interacciones de aislados de *Trichoderma* spp. nativos de zonas productoras de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. **1.** *Trichoderma* spp. vs *Phytophthora parasitica*, A. TI41- P.p. B. Tv1-P.p. C. Tv2-P.p. D. TI3-P.p. E. Testigo; **2.** *Trichoderma* spp. vs *Fusarium oxysporum*, A. Tv1- F.o. B. Tv2- F.o. C. TI3- F.o. D. TI4- F.o. E. Testigo; **3.** *Trichoderma* spp. vs *Corynespora cassicola*, A. Tv1- C.c. B. Tv2- C.c. C. TI3- C.c. D. TI4- C.c. E. Testigo; **4.** *Trichoderma* spp. vs *Coniella diplodiella*; A. Tv1- C.d. B. Tv2- C.d. C. TI3- C.d. D. TI4- C.d. E. Testigo.

Tabla 3. Análisis de comparación de medias del promedio de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR) por cuatro aislados de *Trichoderma* spp. nativos provenientes de zonas productoras de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México.

Aislados	PICR (%) ¹
Tl4 ¹	89.25 a ²
Tv1	81.75 ab
Tv2	76.00 bc
Tl3	72.50 d

¹Tl4: *Trichoderma longibrachiatum* (aislado 4), Tl3: *Trichoderma longibrachiatum* (aislado 3), Tv1: *Trichoderma virens* (aislado 1) y Tv2: *Trichoderma virens* (aislado 2).

²Medias con letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Contacto entre hifas

En general, los testigos (cajas con crecimiento únicamente del fitopatógeno), cubrieron la superficie de la caja Petri en ocho días. En confrontaciones duales las hifas de ambos microorganismos hicieron contacto en promedio a los 3.25 días después de la siembra. Los aislados de *P. parasitica*, *F. oxysporum*, *C. cassicola* y *Coniella diplodiella*, detuvieron su crecimiento al momento del contacto con el agente antagonístico. Similar a lo reportado en este estudio, Martínez-Coca *et al.* (2018), mencionaron que cepas de *T. virens* presentaron un crecimiento acelerado en comparación con los aislados del patógeno, cubriendo completamente la colonia del patógeno a los 4 días después de la siembra (dds), lo que las ubicó en la clase 1 de la

escala de Bell *et al.* (1982); además, las cepas de *T. virens*, esporularon sobre la colonia del patógeno afectando su textura y desarrollo, frenando el crecimiento de los aislados de *Fusarium oxysporum*. Similar a esto, Pérez-Torres *et al.* (2017) encontraron que aislados de *T. harzianum* presentaron un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) del 93.1% a los 4 dds, después de 5 dds el PICR aumentó a 100%. Así también, Ríos-Velazco *et al.* (2016) observaron el contacto entre hifas al sexto día de la siembra de *T. asperellum* en pruebas duales con *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum* y *A. Alternata*.

Zona de intersección

En la Figura 1, se muestra el crecimiento en la confrontación dual de las especies de *Trichoderma* spp, contra los fitopatógenos *P. parasitica*, y *C. cassicola*, *F. oxysporum* y *Coniella diplodiella* en donde se aprecian diferencias morfológicas evidentes. En la zona de intersección, pudieron observarse variaciones de distancia de 2.5 a 4.8 cm, el análisis estadístico permitió identificar al aislamiento Tl4 como aquel que de manera consistente presentó los niveles de zona de interacción más altos para todos los agentes fitopatógenos; por otra parte, la cepa Tl3 obtuvo los valores de zona de interacción más bajos, esto evidencia características de patogenicidad, competencia y desarrollo diferentes aun entre la misma especie (Tabla 2). Los cuatro aislados mostraron una coloración amarilla en el medio de cultivo PDA, esto está relacionado con una mayor producción de metabolitos volátiles y no volátiles con características antimicrobiales que se sintetizan

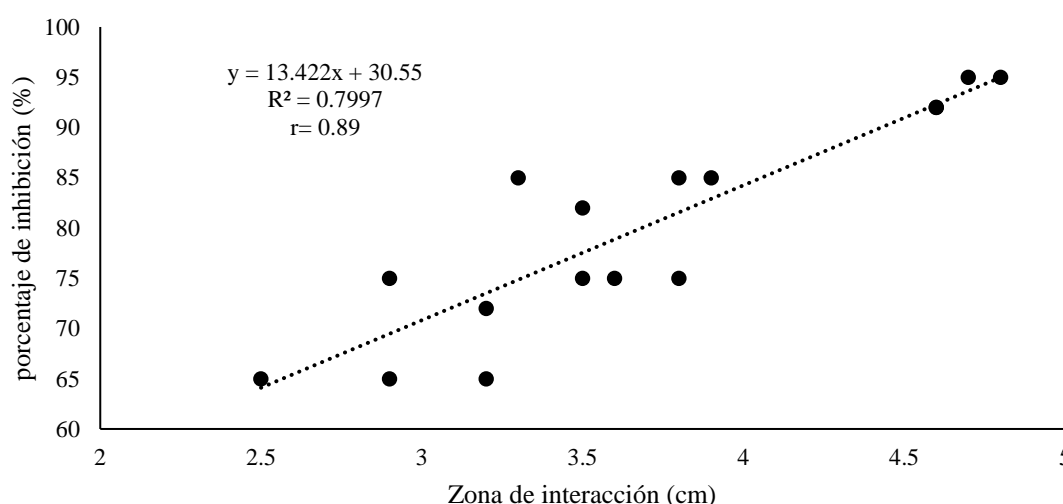


Figura 2. Análisis de regresión lineal simple, coeficiente de correlación de Pearson (r) y coeficiente de determinación (R^2) del porcentaje de inhibición y la zona de interacción entre agentes fitopatógenos y aislados de *Trichoderma* spp. nativos provenientes de zonas productoras de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México.

al momento del contacto y está asociado a niveles de antagonismo (González *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2016, Martínez *et al.*, 2018). Similar a lo reportado en este estudio, Hernández (2016), mencionan que la zona de interacción de 31 cepas de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* y fluctuó de 6 a 2.97 cm. En base al análisis de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 2), pudo determinarse una amplia relación entre el área de zona de interacción con el porcentaje de inhibición de los agentes de control; lo que indica que este factor (zona de interacción) es un elemento asociado a la agresividad y habilidad competitiva de un aislamiento antagónico. La reducción en la tasa de crecimiento del patógeno en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. y puede visualizarse en un aumento en la zona de intersección y reducción del diámetro de las colonias patogénicas (Guigón-López *et al.*, 2010). Es importante complementar la investigación en fase de campo, sin embargo, basados en los resultados reportados, se recomienda el uso de la cepa T14 para su formulación de productos de control biológico que se incorporen en un sistema de manejo integrado y ecológico fitosanitario en el cultivo de jamaica (*H. Sabdariffa*) en Guerrero.

CONCLUSIONES

Se identificaron cuatro aislados de *Trichoderma* spp. con características morfológicas y de crecimiento particulares (T14, Tv1, Tv2 y T13) las cuales se caracterizaron molecularmente dentro de dos especies: *T. virens* y *T. longibrachiatum*. La cepa T14 mostró las mejores características inhibitorias, sin embargo, todos los aislados presentaron en promedio porcentajes de inhibición de crecimiento radial superiores al 70%. Se plantea utilizar a T14 como cepa base para la formulación de productos de control biológico que se incluyan dentro de una estrategia ecológica de manejo integrado de plagas en el cultivo de jamaica para la región productora del estado de Guerrero, México y como antecedente para su implementación en otras regiones.

Declaraciones

Conflicto de interés. No existe conflicto de intereses por la publicación de esta investigación.

Financiamiento. No hubo fuente de financiamiento para realizar el estudio.

Cumplimiento de estándares de ética. Debido a la naturaleza del estudio, no se aplican estándares éticos y bioéticos nacionales o internacionales.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles en abraham.monteon@gmail.com con el Dr. Abraham Monteón Ojeda, previa solicitud razonable.

REFERENCIAS

- Badar, R. y Qureshi, S. A. 2012. Use of *Trichoderma hamatum* alone and in combination with rhizobial isolates as bio-fertilizer for improving the growth and strength of sunflower. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 2, 6307-6314.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. (4th Ed). The American Phytopathological Society. 1998; St. Paul, Minnesota, USA. pp. 218. <https://doi.org/10.2307/3757954>
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R. y Gomes, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1), 3-9. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144001.pdf>
- De Aguiar, R. A., da Cunha, M. G. y Junior, M. L. 2014. Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. y chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control*, 74, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.03.009>
- Espinoza-Ahumada, C. A., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Ochoa-Fuentes y. M., Cepeda-Siller, M. y Castillo-Reyes, F. 2019. Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(16), 45-55. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843>
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). In *Anales de biología*, No. 26, pp. 35-45. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30441/29631>
- González, I., Infante, D., Martínez, B., Arias y., González, N., Miranda, I. y Peteira, B. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biotechnología Aplicada*, 29(1), 12-16. <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v29n1/bta02112.pdf>
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L. y Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra

- hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 87-96. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a2.pdf>
- Hernández, E. O., Castillo, F. D. H., Herrera, R. R., Fuentes, S. E. V., Drouaillet, B. E. y Santillán, J. A. L. 2016. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación y Ciencia*, 24(67), 5-11. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67446178001.pdf>
- Marcello, C. M., Steindorff, A. S., da Silva, S. P., do Nascimento Silva, R., Bataus, L. A. M. y Ulhoa, C. J. 2010. Expression analysis of the exo- β -1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, 165(1), 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.002>
- Martínez-Coca, B., Infante, D., Caraballo, W., Duarte-Leal y Echevarría-Hernández, A. 2018. Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt and Nirenberg frente a aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2). <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n2/2224-4697-rpv-33-02-e07.pdf>
- Meza, C. L. S., Barbosa, R. J. F., Valero, N. V., Carrillo, R. M. G. y Redondo, A. R. P. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 35-43. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2868712.pdf>
- Michel-Aceves, A. C., Hernández-Morales, J., Toledo-Aguilar, R., López, J. E. S. y Romero-Rosales, T. 2019. Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. nativa contra *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de jamaica. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 42(3), 235-241. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.235-241>
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Alarcón-Cruz, N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(3), 89-107. <https://www.redalyc.org/pdf/837/83728497008.pdf>
- Mohiddin, F. A., Khan, M. R., Khan, S. M. y Bhat, B. H. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 9(3), 92-102. <https://doi.org/10.3923/ppj.2010.92.102>
- Morton, D. J. y Stroube, W. H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 45(8), 417-420.
- Morton, J. 1987. Roselle. In: Fruits of Warm Climates. Web Publications Purdue University, Miami, FL, pp. 281-286, ISBN: 0-9610184-1-0. <https://ag.purdue.edu/hla/Pages/default.aspx>
- Ortega-Acosta, S. Á., Hernández-Morales, J., Sandoval-Islas, J. S., Ayala-Escobar, V., Soto-Rojas, L. y Alejo-Jaimes, A. 2015. Distribución y frecuencia de organismos asociados a la enfermedad "pata prieta" de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2), 173-194. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00173-en.pdf>
- Osorio, H. E. F. D C Hernández, R. H. Rodríguez S. F. S. Varela. B. D Estrada J. A S. López. 2016. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. Sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Revista de Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 67: 5-11. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67446178001.pdf>
- Pérez-Torres, E. J., Bernal-Cabrera, A., Milanés-Virelles, P., Leiva-Mora, M., Sierra-Reyes y. y Cupull-Santana, R. 2017. Actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Centro Agrícola*, 44(3), 13-19. <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v44n3/cag02317.pdf>
- Ríos-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. M., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Salas-Marina, M. Á. y Guerrero Prieto, V. M. 2016. Identificación y actividad antagónica in vitro de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 85-99. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v34n1/2007-8080-rmfi-34-01-00085.pdf>

- Rojas-Martínez, R. I., Camacho-Tapia, M., Zavaleta-Mejía, E. y Levy, J. 2016. First report of the presence of haplotypes A and B of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in chili (*Capsicum annuum* L.) in the Central Region of Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 111-115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01482.x>
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Ramírez-Lepe, M. y Cuervo-Parra, J. A. 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean journal of agricultural and animal sciences*, 32(1), 32-45. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902016000100004>
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L. y Lorito, M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(3), 291-301. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-3-0291>
- Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0195>
- Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R. y Mora-Avilés, M. A. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia*, 51(1), 63-79. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063-en.pdf>
- Sandoval, I., & Stefanova, M. (2000). Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de los hongos fitopatógenos del suelo. *Boletín Técnico*, (2).
- SAS Institute. 2004. SAS/STAT User's guide, software Version 9.0. Cary, N. C., USA. 442 p.
- Sharma, V., Salwan, R. y Sharma, P. N. 2017. The comparative mechanistic aspects of *Trichoderma* and probiotics: scope for future research. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100, 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.07.005>
- SIAP-SADER (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Obtenido de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado el 29 – 05 – 2020).
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S. y De la Cruz-Pérez, A. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(4), 947-961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Vargas-Hoyos, H. A. y Gilchrist-Ramelli, E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista mexicana de micología*, 42, 9-16. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v42/v42a3.pdf>
- Veena, G. A. y Reddy, N. E. 2014. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia bataticola*, the causal agent of dry root rot of chickpea. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3657>