

## Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile

Petra Andrade-Hoyos<sup>1</sup>  
Alfonso Luna-Cruz<sup>2§</sup>  
Eduardo Osorio-Hernández<sup>3</sup>  
Eduardo Molina-Gayosso<sup>4</sup>  
Nadia Landero-Valenzuela<sup>5</sup>  
Hebert Jair Barrales-Cureño<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Procesos Naturales-Universidad Intercultural del Estado de Puebla. Calle principal a Lipuntahuaca s/n, Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla. CP. 73475. (andrahoy@gmail.com; hebert.jair@uiep.edu.mx). <sup>2</sup>CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Mújica s/n, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán. CP. 58030. <sup>3</sup>División de Estudios de Posgrado-Universidad Autónoma de Tamaulipas. Matamoros s/n, Zona Centro, Ciudad Victoria, Tamaulipas. CP. 87000. (eosorio@docentes.uat.edu.mx). <sup>4</sup>Ingeniería en Biotecnología-Universidad Politécnica de Puebla. Tercer carril del ejido Serrano s/n, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, Puebla. CP. 72640. (eduardo.molina@uppuebla.edu.mx). <sup>5</sup>Universidad Politécnica Francisco I. Madero-Ingeniería en Agrotecnología. Tepatepec s/n, Francisco I. Madero, Hidalgo. CP. 42660. (nlanderova@conacyt.mx).

§Autor para correspondencia: alunacr@conacyt.mx.

### Resumen

En México se siembran más de 100 variedades de chile (*Capsicum annuum* L.), es un cultivo altamente redituable y representa una actividad económica de importancia nacional. Actualmente, enfrenta graves problemas fitosanitarios por la presencia de enfermedades como la marchitez del chile, causada por un complejo de patógenos de suelo. Para el control de estas enfermedades, se utilizan fungicidas tóxicos y residuales, que contaminan el ambiente e inducen resistencia genética en los fitopatógenos. Por ello, es necesario buscar alternativas de control para solucionar este problema, por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma* spp., contra los agentes causales de marchitez en confrontaciones *in vitro* mediante cultivos duales. El estudio se llevó a cabo en 2016, en la Universidad Intercultural de Estado de Puebla, Huehuetla, Puebla, México. Se evaluaron tres aislamientos de *Trichoderma* provenientes de la rizósferas de árboles de aguacate, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. asperellum* y tres aislamientos de los fitopatógenos *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* obtenidos de las raíces de plantas de chile con síntomas de la marchitez. Los aislamientos se caracterizaron morfológicamente para su identificación. Los tres hongos antagonistas presentaron alto porcentaje de inhibición, *T. asperellum* mostró el 88.25%, *T. viride* 87.22% y *T. harzianum* con 87.8%. En las condiciones del estudio, *T. asperellum*, *T. viride* y *T. harzianum*, resultaron microorganismos antagónicos eficientes contra los fitopatógenos. Se sugiere realizar evaluaciones de biocontrol con estos aislamientos en invernadero y a campo abierto.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma* spp.

Recibido: mayo de 2019  
Aceptado: agosto de 2019

## Introducción

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en México, enfrenta graves problemas fitosanitarios que limitan su producción a causa de enfermedades como la marchitez del chile, inducida por un complejo de fitopatógenos de suelo, entre ellos *Phytophthora capsici* Leo (Hernández-Castillo *et al.*, 2014), *Rhizoctonia solani* Kühn y *Fusarium oxysporum* (Vásquez *et al.*, 2009). Los principales síntomas que provoca esta enfermedad son la muerte prematura de las plantas al causar la obstrucción y desequilibrio del funcionamiento de los haces vasculares, defoliación, cambios de color, rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, maduración adelantada e irregular, pudrición de la raíz, necrosis del tallo y ocurrencia de rebrotes (Granke *et al.*, 2012, Rivera *et al.*, 2018).

Para controlar la incidencia y severidad de estos patógenos, se utilizan fungicidas altamente tóxicos y residuales que provocan un impacto ambiental negativo, contaminando el suelo, el aire y los mantos acuíferos, además intoxican al ser humano, crean resistencia genética en los fitopatógenos a los ingredientes activos (Matar *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2016; Hernández-Hernández *et al.*, 2018) e incrementan los costos de producción. Otra consecuencia es la reducción del área de siembra debido a la infestación del suelo es el aumento en la severidad e incidencia de la enfermedad y reducción de los rendimientos obtenidos por superficie sembrada (García, 2010).

La relevancia del género *Trichoderma* radica en la eficiencia que posee para combatir enfermedades, se ha reportado en múltiples estudios el impacto que tiene sobre las pudriciones de raíz, problemática que se encuentra entre las enfermedades que causan pérdidas económicas significativas en diferentes cultivos agrícolas. Aunque los productos químicos son aún la principal herramienta de control para estas enfermedades, los agentes biológicos son una manera efectiva para proporcionar un control más rápido y más seguro (Verma *et al.*, 2007).

Se ha investigado durante más de 70 años los mecanismos de control biológico de las especies de *Trichoderma* spp. (Martínez *et al.*, 2013), su capacidad antagónica está ampliamente documentada como agentes de biocontrol de diversos patógenos que afectan cultivos de importancia agrícola y económica (Infante *et al.*, 2009; Mayo *et al.*, 2015). Las cepas de *Trichoderma* producen enzimas extracelulares (Osorio-Hernández *et al.*, 2016), compiten con los hongos patógenos por espacio y nutrientes al reducir o detener completamente el desarrollo del fitopatógeno (Sánchez-García *et al.*, 2017), promueven el crecimiento de las plantas e inducen resistencia sistémica, micoparasitismo y antibiosis mediante acción restrictiva directa a los hongos fitopatógenos.

Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera de las plantas. (Leandro *et al.*, 2007; Woo y Lorito, 2007; Guédez *et al.*, 2012). Las diferentes especies de *Trichoderma* son una alternativa para el biocontrol contra diversos fitopatógenos de suelo (Singh *et al.*, 2011) entre ellos *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*, además de estimular el incremento de la biomasa radicular y el área foliar (Ezziyyani *et al.*, 2005; Ezziyyani *et al.*, 2007). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antagónico de *Trichoderma* spp., como método de biocontrol para el complejo de fitopatógenos que causan marchitez del chile en evaluaciones *in vitro* mediante cultivos duales.

## Materiales y métodos

### Ubicación del estudio

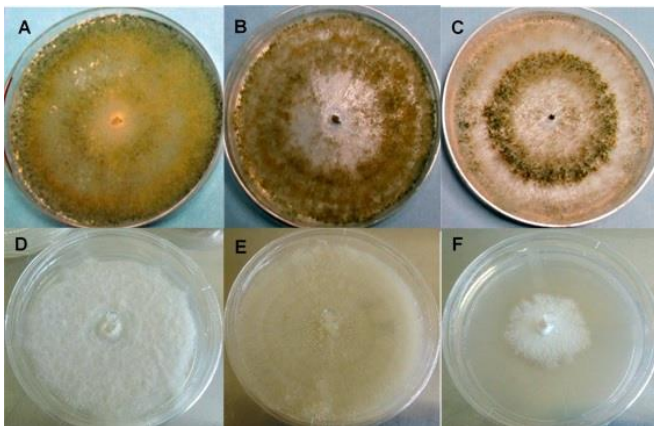
El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Huehuetla, Puebla, México. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 20° 01' 48" y 20° 09' 12" de latitud norte y los meridianos 97° 35' 00" y 97° 40' 24" de longitud oeste.

### Material fúngico

Se aislaron de suelo tres especies de *Trichoderma* en medio papa dextrosa-agar (PDA). Se dispersó 1 g de suelo húmedo en cajas con medio PDA y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad durante dos días, después se retiraron de la incubadora y se mantuvieron bajo lámpara de luz blanca por dos días para inducir esporulación de *Trichoderma* sp., del desarrollo de *Trichoderma*, se tomó una porción para transferir a medio de cultivo PDA e incubar a  $25 \pm 2$  °C, esto se realizó hasta obtener crecimientos axénicos y puros, libres de otros hongos o bacterias. Después de la última esporulación en este medio, se conservaron en agua estéril y aceite mineral.

Los patógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora capsici* se aislaron de raíces de chile, las raíces se lavaron con agua corriente; posteriormente, la porción de tejido se desinfectó por inmersión durante 1 min en solución 1.5% de hipoclorito de sodio y se enjuagó con agua destilada estéril, las raíces se escurrieron sobre sanitas estériles, finalmente se sembraron fragmentos de 1 cm en medio PDA para el aislamiento y purificación de *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.

En el caso del oomicete *Phytophthora capsici* se sembraron raíces de chile de 1.5 cm de longitud en medio agar-agar® con jugo-V8® (jugo de 8 verduras) y se adicionaron antibióticos (Pimaricina  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , Ampicilina  $292 \mu\text{g L}^{-1}$ , Rifampicina  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , Pentacloronitrobenzeno  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  e Himexazol  $0-25 \mu\text{g L}^{-1}$ ), posteriormente se incubaron a  $28 \pm 2$  °C durante tres días (Andrade *et al.*, 2012), previamente purificados los patógenos de la raíz del chile se mantuvieron bajo conservación en agua estéril con el fin de preservación (Molina-Gayosso *et al.*, 2016). Previó a la confrontación dual los microorganismos se activaron en medio de cultivo PDA más ácido láctico (Figura 1).



**Figura 1.** Crecimiento en medio de cultivo PDA de antagonistas y patógenos de la marchitez del chile. A= *T. viride*; B= *T. harzianum*; C= *T. asperellum* (C2); D= *Rhizoctonia* sp.; E= *P. capsici*; y F= *Fusarium* sp.

## Caracterización morfológica

Para estudiar las características morfológicas, tanto los aislamientos de los patógenos como de *Trichoderma*, se cultivaron en medio PDA y se incubaron a  $24 \pm 2$  °C durante 12 h bajo luz blanca (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018). En la identificación del género *Fusarium* sp. se utilizó como referencia la descripción de Burgess *et al.* (1994) y la identificación de la especie se realizó mediante las claves de Seifert (1996). La identificación de la especie de *Rhizoctonia* se realizó con base en Sneh *et al.* (1991) y la del oomicete *Phytophthora* sp. se caracterizó mediante las claves de Erwin y Ribeiro (1996); de Gallegly y Hong (2008).

Por último, en la caracterización morfológica de los aislamientos de *Trichoderma* spp. se utilizaron las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972). Para los aislamientos de *Trichoderma* se utilizaron cultivos monoconidiales en combinación con la técnica de cámara húmeda (Harris, 1986). Un disco de PDA de 5 mm de diámetro se inoculó con la espora de *Trichoderma* y se colocó entre un porta y cubreobjetos y esta preparación sobre un triángulo de varilla estéril dentro de una caja petri y se incubó a  $25 \pm 2$  °C durante 24 h.

Las características macro y microscópicas a considerar fueron textura de la colonia, presencia de micelio, anillos concéntricos, tinción de la colonia al reverso, forma y tamaño de conidios y fiálides (Chaverri *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 2018; Nawaz *et al.*, 2018; Du Plessis *et al.*, 2018), se observaron las estructuras de los aislamientos de *Trichoderma* spp. a 40X en un microscopio óptico (Zeiss Axioskop plus).

## Tasa de crecimiento

En la determinación de la tasa de crecimiento de micelio en antagonistas y patógenos, crecidos en PDA, se realizaron mediciones cada ocho horas.

## Actividad antagonica de *Trichoderma* sobre patógenos

La técnica de cultivos duales se empleó para determinar la actividad antagonica de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *P. capsici* (Sonnenbichler *et al.*, 1983). Se empleó un diseño completamente aleatorizado (con dos factores: *Trichoderma* y los patógenos), con ocho repeticiones.

Los ensayos se realizaron evaluando cultivos duales de *Trichoderma* spp., contrapuestos con tres fitopatógenos, tres aislamientos de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *P. capsici*. En la prueba de cultivos duales se utilizaron cajas petri con PDA libre de antibióticos, se depositó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo del fitopatógeno (previamente crecido en PDA por cinco días) y en el extremo equidistante se colocó un disco de micelio (previamente crecido en PDA por cinco días) de 5 mm de diámetro con *Trichoderma* spp., las cajas se incubaron a  $28 \pm 2$  °C y se observaron cada 8 h para registrar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el fitopatógeno, se midió el crecimiento de ambas colonias (cm) y se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial, basándose en la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2007), calculando de la siguiente manera:

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

Donde: PICR= porcentaje de inhibición de crecimiento radial; R1= crecimiento radial (mm) del patógeno sin *Trichoderma* spp., R2= crecimiento radial (mm) del patógeno con *Trichoderma* spp.

### Micoparasitismo de *Trichoderma* sobre patógenos

Para conocer la presencia de parasitismo de las cepas de *Trichoderma* hacia *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *P. capsici* se empleó la técnica de microcultivos de Riddel descrita por Paul (1999). Esta técnica consiste en colocar dentro de una caja de petri una varilla de vidrio en forma de V y sobre ella, un portaobjetos estéril, sobre el cual se dispuso un disco de PDA de 10 mm de diámetro. La disposición de cada hongo se realizó en dos puntos cardinales, después de colocar el micelio de ambos hongos sobre el PDA, con una diferencia de 24 h, primero se colocaron los patógenos con ayuda de una aguja estéril, los cuales tienen un crecimiento lento comparado con *Trichoderma* y se colocó un cubreobjetos estéril, se incubó a  $25 \pm 2$  °C.

Cuando el disco de agar fue cubierto con el crecimiento de ambos hongos, el portaobjetos fue retirado de la caja de petri para preparar los frotis. El cubreobjetos fue colocado en otro portaobjeto limpio y provisto de una gota de colorante conocido como azul de algodón. Por otro lado, se retiró el disco de agar del portaobjetos original, se colocó una gota del colorante y un cubreobjetos. Una vez eliminado el exceso de colorante, las preparaciones fueron selladas y evaluadas microscópicamente, es decir se observaron 10 muestras para determinar si hubo o no parasitismo por las cepas de *Trichoderma* sp., se observó a 40X en un microscopio óptico (Zeiss Axioscop plus).

### Análisis estadístico

Los datos del PICR, expresados en porcentaje, se transformaron con el angular arcoseno  $\sqrt{x+1}$  (Steel *et al.*, 1986) y en el crecimiento micelial en la prueba de biocontrol, se utilizó un diseño completamente aleatorizado (tres cepas de *Trichoderma* sp. y tres fitopatógenos) con ocho repeticiones. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Dichos datos se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.0 para Windows (SAS, 2002).

## Resultados y discusión

### Caracterización morfológica

Los patógenos causantes de la marchitez del chile correspondieron con lo reportado por Rivera-Jiménez *et al.* (2018). Se encontró similitud con *F. oxysporum*, las colonias de crecimiento en PDA tenían abundante micelio aéreo y de color rosa pálido a morado intenso a color magenta con una textura algodonosa. Los macro-conidios presentaron de uno a cinco septos, los conidios midieron  $23-54 \times 3-4.5$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. En la identificación de *Rhizoctonia solani* correspondió con lo reportado por Sneh *et al.* (1991) y Lozano *et al.* (2015), *R. solani* se caracterizó por formar micelio aéreo, color marrón, en medio de cultivo PDA formo micelio hialino.



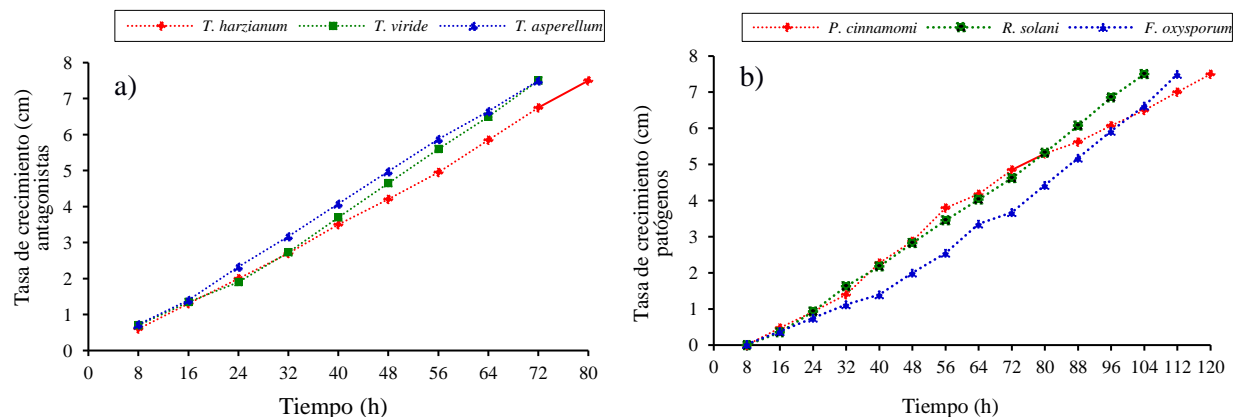
Las hifas generalmente mostraron un ángulo recto y después de este se formó un septo, los diámetros de las hifas presentaron de 4.1 a 8.9  $\mu\text{m}$ , lo que corresponde con Barnett y Hunter (1998). El aislamiento de *Phytophthora capsici* se caracterizó por formar esporangios ovoides, elongados, elipsoides con una o dos papilas, el tamaño de los esporangios fue de 35.8 a 64.7 x 19.6 a 25.2  $\mu\text{m}$ ., finalmente e grosor apical fue de 1.85 a 4.3  $\mu\text{m}$  (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008).

De acuerdo con los criterios de identificación taxonómica de Barnett y Hunter (1972), las especies de *Trichoderma* se compararon con claves taxonómicas e identificadas por sus características morfológicas. Las especies de *T. harzianum* presentaron colonias color verde claro a oscuro con textura polvosa a algodonosa, con micelio, conidióforo y conidios de aspecto de color verde (Figura 2, Cuadro 1) muestran diversas ramificaciones en forma piramidal, en algunos casos se observa la formación de dos a tres ramas laterales y presenta micelio aéreo. En *T. asperellum* y *T. viride* se aprecia una coloración ausente al reverso de la placa petri.

**Cuadro 1. Caracterización morfológica de *Trichoderma* spp.**

<i>Trichoderma</i> spp.	Color de colonia	Textura de colonia	Micelio aéreo	Anillos	Color al reverso	Forma de conidios	Tamaño conidios ( $\mu\text{m}$ )	Forma fiálides	Tamaño fiálides ( $\mu\text{m}$ )
<i>T. harzianum</i>	Verde oscuro a color grisáceo	Algodonosa	Abundante	Sin presencia	Incoloro	Subgloboso	3.8-4 x 3.1-3.7	Globosa	6.3-15.6 x 2.7-3.4
<i>T. asperellum</i>	Verde claro a verde oscuro	Polvoso	Sin presencia	de 3 a 4 anillos	Incoloro	Ovoide a elisoipde	4-4.4 x 3-3.5	Ligeramente globoso	2.3-2.8 x 10.2-11.8
<i>T. viride</i>	Verde oscuro	Algodonosa	Abundante	Sin presencia	Incoloro	Globoso Elipsoidal	4-4.8 x 3.5-4	Lageniformes	8-14 x 2.4-3

Las esporas y fiálides, estructuras características corresponden a especies de *Trichoderma*, presentaron formas y tañamos característicos de las especies de *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. viride* correspondiente a lo reportado por diferentes autores (Barnett *et al.*, 1972; de Hoog, 2000; Romero-Arenas *et al.*, 2009; Chaverri *et al.*, 2015; Jaklitsch *et al.*, 2015).



**Figura 2. Tasa de crecimiento, a) *T. harzianum*, *T. viride* y *T. asperellum*; y b) *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum*.**

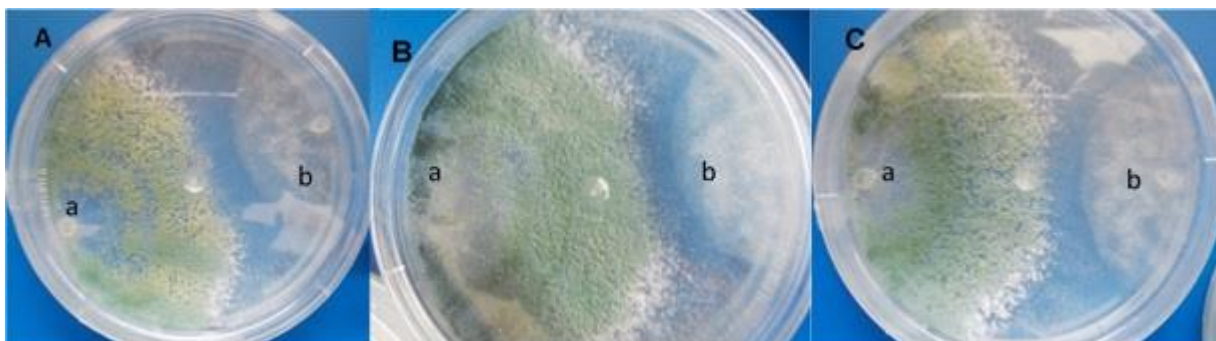
## Tasa de crecimiento

La evaluación de la tasa de crecimiento inicial de los antagonistas y patógenos resultaron estar completamente relacionadas al iniciar crecimiento del micelio a las 8 h; sin embargo, las tres especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de antagonismo por completar el llenado de la caja petri en 80 h. Estos resultados indican la importancia de conocer la velocidad de crecimiento de los patógenos, así como de los antagonistas de *T. harzianum*, *T. viride* y *T. asperellum*.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., mostraron un crecimiento más rápido que los patógenos, este comportamiento es promisorio en el control de patógenos de la raíz, además permitió este ensayo permitirlo para las pruebas de PICR y dar ventaja de dos días a *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*.

## Actividad antagónica de *Trichoderma* sobre patógenos

La actividad antagónica de *T. viride* contra *P. capsici* mostró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), debido a que *T. viride* presentó 0.516 mm en comparación de *P. capsici* que obtuvo 0.241 mm de crecimiento en caja petri con medio de cultivo; es decir, *T. viride* puede utilizarse como agente de control biológico, por ser eficaz contra *P. capsici*, ya que también se observó hiperparasitismo por parte del patógeno (Figura 3). Lo anterior, concuerda con lo reportado por Bouziane *et al.* (2016), al evaluar a *T. viride* contra *P. infestans* en pruebas *in vitro*, encontraron que el hongo benéfico mostró capacidad inhibitoria entre 58 y 68%, resultados similares fueron al evaluar en plantas.



**Figura 3.** Crecimiento dual, confrontamientos *in vitro* con *Trichoderma* en contra de los patógenos, A) *Trichoderma viride* vs *P. capsici*; B) *Trichoderma asperellum* vs *Fusarium oxysporum*; y C) *Trichoderma harzianum* vs *Rhizoctonia solani*.

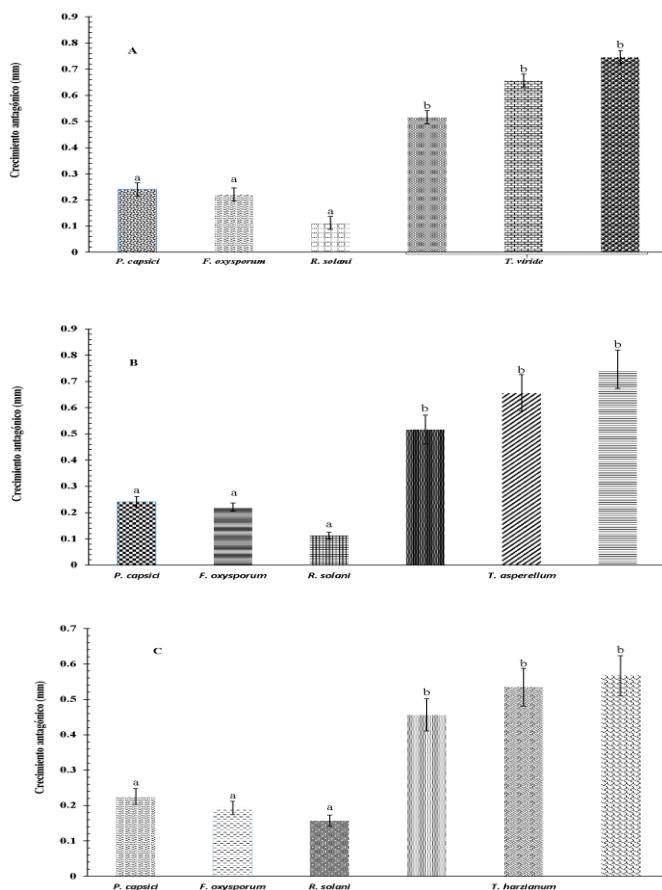
De igual forma, Zegeye *et al.* (2011), encontraron que *T. viride* mostró una inhibición completa en el crecimiento radial de *P. infestans* en pruebas *in vitro*. Además, mencionaron que la aplicación foliar de *T. viride* tiene un buen potencial para controlar a *P. infestans* en condiciones de invernadero. Por otra parte, la evaluación de antagonismo dual de *T. viride* contra *F. oxysporum* presentaron crecimiento de 0.656 mm del antagonista y 0.221 mm por parte del patógeno, esto evidencia como *T. viride* es apto para la utilización en el control de *F. oxysporum*.

En la confrontación dual *T. viride* contra *R. solani* obtuvieron un crecimiento del antagonista de 0.746 mm y del patógeno 0.112 mm, los resultados de crecimiento por parte del antagonista fueron mayor en comparación con el patógeno (Figura 3). En ambos casos se han encontrado resultados

similares donde los dos hongos son micoparasitados o destruidos por *T. viride* (Figura 3) ya que tiene un efecto antifúngico con este patógeno (Jhon *et al.*, 2010; Perveen, 2012; Sánchez-García *et al.*, 2017).

Es importante mencionar, que en las primeras 8 h el crecimiento de los antagonistas mostraron un crecimiento acelerado que propicia el encuentro con el patógeno en menor tiempo, indicativo que el antagonista creció o cubrió más superficie en cultivo *in vitro*.

Resultados similares mencionaron diversos autores donde demostraron que *Trichoderma* spp y *T. viride* son utilizados para el control biológico de *R. solani* (Sánchez-García *et al.*, 2017). Se observó un efecto antifúngico, en el que inhibe el crecimiento y causa lisis a este patógeno. En las confrontaciones de *T. viride* contra los agentes causantes de la marchitez del chile. La evaluación del antagonismo de *T. harzianum* contra *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* (Figura 4) presentó mayor crecimiento por parte del antagonista en comparación con el patógeno, denotando hiperparasitismo al invadir completamente al patógeno, resultado similar obtuvo Osorio-Hernández *et al.* (2011) en el que observó que *Trichoderma* spp., es un antagonista eficaz para el control de *P. capsici*, inhibiendo este patógeno hasta 48%.



**Figura 4. Crecimiento micelial (mm) en la prueba de biocontrol de A) *T. viride* vs *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*; B) *T. asperellum*. Vs *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*; y C) *T. harzianum* vs *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*.**



Asimismo, en la confrontación de *T. viride* en contra de *F. oxysporum* y *R. solani*, se encontró la misma tendencia. Se encontró un valor significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la evaluación de susceptibilidad con base al PICR de los tres patógenos responsables de la marchitez del chile; sin embargo, la mayor susceptibilidad la presentó *Fusarium oxysporum* con 92.68%, seguido de *Rizoctonia solani* y *P. capsici* (Cuadro 2), resultados que prueban la eficacia de los antagonistas (Osorio *et al.*, 2016) ante patógenos que afectan la raíz del chile desde plántulas y plantas en producción (Romero *et al.*, 2017).

En la valoración del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de los patógenos causantes de la marchitez del chile no hubo diferencias significativas entre los antagonistas *T. asperellum*, *T. viride* y *T. harzianum*; por lo que se sugiere utilizar como agente de control biológico cualquiera de los tres *Trichoderma*; es decir, son efectivo por inhibir más de 85% a los patógenos causantes de la marchitez del chile (Cuadro 2), la respuesta de inhibición del crecimiento de fitopatógenos es debido a la síntesis de metabolitos secundarios y a los diferentes mecanismos de acción de micoparasitismo (Harman, 2006; Infante, 2009).

El comportamiento similar de inhibición de los tres tratamientos son favorables resultados encontrados por quienes reportan que por arriba de 80% de inhibición es aceptable en el biocontrol de patógenos que se transmiten por el suelo y por la eficacia de combatir enfermedades de la raíz (Hermosa *et al.*, 2012; Sabbagh *et al.*, 2017).

**Cuadro 2. Evaluación de la susceptibilidad de los patógenos ante *Trichoderma* y porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. contra los patógenos causantes de la marchitez del chile.**

Patógenos	Susceptibilidad de patógenos ante <i>Trichoderma</i> PICR (%)	<i>Trichoderma</i>	Actividad antagónica <i>Trichoderma</i> PICR (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	92.68 a	<i>T. asperellum</i>	88.25 a
<i>Rhizoctonia solani</i>	87.86 b	<i>T. viride</i>	87.22 a
<i>Phytophthora capsici</i>	83.33 c	<i>T. harzianum</i>	87.8 a

a, b, c= denota los tratamientos medios que son significativamente iguales o diferentes según la prueba de Tukey en  $p < 0.05$ . PICR = porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

Los resultados de micoparasitismo de los antagonistas con frecuencia tuvo un crecimiento más favorable, cabe mencionar que las primeras 8 h fueron significativas ( $p \leq 0.05$ ) mostrando que el antagonista tuvo un crecimiento acelerado que propicia que el encuentro se pueda tener en un tiempo corto. Asimismo, se pudo observar que no solo presentó la inhibición del crecimiento de estos patógenos, sino que también presentó una invasión (hiperparasitismo) total del antagonista hacia el patógeno inclusive esporulando sobre el patógeno. En un estudio con selecciones de 25 cepas de *Trichoderma* entre ellas *T. harzianum*, de las cuales presentaron inhibición en *F. oxysporum* sobre el crecimiento de micelio en 33 y 35%.

De igual manera, Sinuco *et al.* (2017) indican que los compuestos orgánicos volátiles de *T. viride* afectaron los halos de crecimiento de *Fusarium* spp. El crecimiento de *T. asperellum* mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) al confrontarse con los diferentes patógenos causantes de la marchitez del chile causados por los patógenos de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* ( $p \leq 0.001$ ) ya que al hacer el análisis de los datos se pudo observar que la tasa de crecimiento del patógeno se redujo prácticamente a la mitad al confrontarse con *T. asperellum*.

Además, de que este antagonista sobrecreció sobre los patógenos hasta 100%, cubriendo la caja completamente y causando así un hiperparasitismo, mostrando así una capacidad antagónica muy eficiente ante cada uno de los patógenos.

Estos resultados coinciden con otros autores quienes mencionaron que *Trichoderma* spp. sobrecrece a *Phytophthora* causando un hiperparasitismo (Bae *et al.*, 2016). De igual forma, *Trichoderma* spp. se desarrolla contra *R. solani*, causando la inhibición del crecimiento *in vitro* de *R. solani* de 58 a 86%. *Trichoderma* spp., tiene la capacidad de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa de las plantas y producir un mayor nivel de ergosterol, lo que indica su capacidad de crecer a un ritmo mayor en el suelo, esto explica sus efectos positivos sobre el crecimiento y la defensa de la planta en presencia del patógeno (Mayo *et al.*, 2015).

Los aislamientos de *Trichoderma* confrontados con *P. capsici* ejercieron un efecto antagónico altamente significativo ( $p \leq 0.001$ ), causando la inhibición en el crecimiento del oomiceto en condiciones duales. *T. harzianum*, *T. viride* y *T. asperellum*, también tuvieron un comportamiento similar contra *F. Oxysporum* y *R. solani* (Figura 4). Los antagonistas continuaron creciendo hasta seis días después, mostrando hiperparasitismo al invadir o crecer completamente sobre el patógeno. Al respecto, Segarra *et al.* (2013), mencionaron que *T. asperellum* cepa T34, es capaz de reducir a *P. capsici* hasta 71%, al aplicarse en plantas de pimienta en diferentes etapas de crecimiento.

### Micoparasitismo

En los ensayos *in vitro* se evaluó la inhibición de las tres especies de *Trichoderma*, los resultados mostraron la eficacia en la competencia por espacio y nutrientes, además de apreciar la habilidad parasítica contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *P. capsici*. Además, se observó mediante microscopía de luz y corroborar en los microcultivos y cultivos de doble confrontación en el punto de cruce entre los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. y patógenos causantes de la marchitez del chile los diferentes tipos de micoparasitismo (Figura 5).



**Figura 5. Micoparasitismo de *Trichoderma* sp. a) *T. harzianum* rodeando al micelio de *Rhizoctonia solani*; b) *T. viride* y *T. asperellum* rodeando el micelio de *P. capsici*; y c) enrollamiento masivo de *T. asperellum* cubriendo a *Fusarium oxysporum*.**

En algunas primeras investigaciones se han observado mico-parasitismo, antibiosis, además de que *Trichoderma* tiene un comportamiento de crecimiento paralelo al patógeno hasta enrollarlo evitando los diferentes mecanismos de supervivencia del patógeno (Chet *et al.*, 1981; Harman, 2006; Infante, 2009).

## Conclusiones

*T. asperellum*, *T. viride* y *T. harzianum* son antagonistas eficientes de los fitopatógenos que causan la marchitez del chile. Las pruebas con estos microorganismos antagonistas han demostrado la existencia de alternativas biológicas para el control de fitopatógenos de la raíz de chile en condiciones de laboratorio, por ello, se sugiere realizar evaluaciones de biocontrol con estos aislamientos y cultivo de chile en invernadero y a campo abierto. Esto coadyuvará para conocer el comportamiento en condiciones de competencia con una diversidad mayor de microorganismos y factores ambientales diferentes a los estudiados.

## Literatura citada

- Andrade, H. P.; De León, C.; Espíndola, B. M. C., Alvarado, R.D.; López, J. A. y García, E. R. 2012. Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinamomo* Rands. Usando temperaturas controladas. Spanish J. Rural Development. 3(4):23-30.
- Bae, S. J.; Mohanta, T. K.; Chung, J. Y.; Ryu, M.; Park, G.; Shim, S.; Hong, S. B.; Seo, H.; Bae, D. W.; Bae, I., Kim, J. J. and Bae, H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. Biological Control. 92:128-138. Doi:10.1016/j.biocontrol.2015.10.005.
- Barnett, H. and Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. EE. UU. Burgess Publ. Co., 241p. Doi:10.2307/3757954.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>a</sup>. Ed. American Phytopathology Society, MN. 217 p.
- Bouziane, Z.; Dehimet, L. and Kacem, C. N. 2016. Inhibitory activity of *Trichoderma viride* against *Phytophthora infestans* that affects the Spunta potato (*Solanum tuberosum* L.) variety. Afr. J. Microbiol. Res. 29(10):1121-1127.
- Burgess, L. W.; Summerell, B. A.; Bullock, S.; Gott, K. P. and Backhouse, D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3<sup>rd</sup> (Ed.). University of Sydney, Sydney, Australia. 132 p.
- Chaverri, P.; Branco, R. F.; Jaklitsch, W.; Gazis, R.; Degenkolb, T. and Samuels, G. J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia. 107(3):558-590.
- Chet, I.; Harman, G. E. and Bake, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its Hyphal Interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbial Ecol. 7(1):29-38.
- de Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene, J. and Figueras, M. J. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd edition. entraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. Mycological research. 106(4):507-511. Doi:10.1017/S0953756202226167.
- Du Plessis, I. L.; Druzhinina, I. S.; Atanasova, L.; Yarden, O. and Jacobs, K. 2018. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. Mycologia. 110(3):559-583.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, USA. American Phytopathol. Society. 562 p.
- Ezziyyani, M.; Requena M. E.; Egea-Gilbert C. and Candela M. E. 2007. Biological Control of Phytophthora Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. Journal of Phytopathology. 155(6):342-349. Doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x.

- Ezziyyani, M.; Requena, M. A. y Candela, M. A. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *P. capsici* en plantas de pimiento. *Anales de Biología*. 27:143-154.
- Gallegly, M. E. and Hong, M. C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathol. Society. St. Paul, M. N. 158 p.
- García, E. R. 2010. Agroecología y enfermedades de la raíz en cultivos agrícolas. Colegio de Postgraduados, estado de México, México. 130 p.
- Granke, L. L.; Quezada, O. L.; Lamour, K. and Hausbeck, M. K. 2012. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant disease*. 11(96):1588-1600.
- Guédez, C.; Cañizalez, L. M.; Castillo, C. y Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 3(32):44-49.
- Harman, G. E. 2006. Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96(2):190-194. Doi: 10.1094/PHYTO-96-0190.
- Harris, I. J. 1986. Modified method for fungal slide culture. *J. Clinical Microbiol.* 24(3):460-461.
- Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I. and Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158(1):17-25. Doi: 10.1099/mic.0.052274-0.
- Hernández, C. F. D.; Lira, S. R. H.; Gallegos, M. G.; Hernández, S. M. and Solis, G. S. 2014. Biocontrol of pepper wilt with three *Bacillus* species and its effect on growth and yield. *Phyton*. 83(1):49-55.
- Hernández, H. E. J.; Hernández, R. I.; Almaraz, S. J. J.; López, L. A.; Torres, A. M. y Morales, F. F. J. 2018. Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en Chile. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9(3):525-537.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 1(24):14-21.
- Jaklitsch, W.M. and Voglmayr, H. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*. 80:1-87. Doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001.
- Jang, S.; Kwon, S. L.; Lee, H.; Jang, Y.; Park, M. S.; Lim, Y. W.; Kim C. and Kim, J. J. 2018. New report of three unrecorded species in *Trichoderma harzianum* species complex in Korea. *Micology*. 46(3):177-184.
- Jhon, R. P.; Tyagi, R. D.; Prévost, D.; Brar, S. K.; Pouleur, S. and Surampalli, R. Y. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*. 12(29):1452-1459.
- Leandro, L. F. S.; Guzman, T.; Ferguson, L. M.; Fernandez G. E. and Louws F. J. 2007. Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compostamended soil and on strawberry roots. *Appl. Soil Ecol.* 1(35):237-246.
- Lozano, A. N.; Guzmán, P. R.; Zavaleta, M. E.; Aguilar, R. H.; Ayala, V. V. 2015. Etiology and evaluation of control alternatives for wilt in Chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) in La Vega, Metztitlán, Hidalgo, México. 33(1):31-53.
- Martínez, B.; Infante, D. y Reyes, R. Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. 1(28):1-11.
- Matar, S. M.; El-Kazzaz, S. A.; Wagih, E. E.; El-Diwan, A. I.; Moustafa, H. E.; Abo-Zaid, G. A.; Abd-Elsalam, H. E. and Hafez, E. E. 2009. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi, I. *Biotechnology*. 8(1):53-61.

- Mayo, S.; Gutiérrez S.; Malmierca M. G.; Lorenzana A.; Campelo M. P.; Hermosa R. and Casquero P. A. 2015. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. In growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers Plant Science*. 6(685):1-11. Doi: 10.3389/fpls.2015.00685.
- Molina, G. E.; Andrade, H. P.; García, E. R. y Sosa, H. C. M. 2016. Capacidad de sobrevivencia de tres especies de *Phytophthora* y dos de *Pythium* preservados en dos sustratos a corto y largo plazo. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(7):1759-1764.
- Nawaz, K.; Shahid, A. A.; Bengyell, L.; Subhani, M. N.; Alia, M.; Anwar, W.; Iftikhar, S. and Ali, S.W. 2018. Diversity of *Trichoderma* species in chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*. 239:242-252. Doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.048.
- Osorio, H. E.; Hernández, C. F. D.; Gallegos, M. G.; Rodríguez, H. R. and Castillo, R. F. 2011. *In vitro* behavior of *Trichoderma* spp. Against *Phytophthora capsici* Leonian. *Afr. J. Agric. Res.* 19(6):4594-4600.
- Osorio, H. E.; Hernández, F. D. C.; Rodríguez, R. H.; Varela, S. D. F.; Estrada, B. D. y López, J. A. S. 2016. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. *Investigación y Ciencia*. 67(24):5-11.
- Osorio, H. E.; Hernández, M. J.; Conde, M. V.; Michel, A. A. C.; López, S. J. A. and Torres, C. J. A. 2016. *In vitro* activities of *Trichoderma* species against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 15(10):521-527.
- Paul, B. 1999. *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Lett.* 181(2):277-80. Doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08855.x.
- Perveen, K. and Bokhari, N. A. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. *African J. Microbiol. Res.* 13(6):3348-3353.
- Rivera-Jiménez, M. N.; Zavaleta-Mancera, H. A.; Rebollar-Alviter, A.; Aguilar-Rincón, V. H.; García de los Santos, G.; Vaquera-Huerta, H.; Silva-Rojas, H. V. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of ‘Poblano’ pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress*. 17(11):1237-1249. Doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2.
- Romero-Arenas, O.; Amaro, J. L.; Damián, M. A.; Valencia de Ita, M. A.; Rivera, A. y Huerta, M. 2017. Biopreparados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *Información Técnica Económica Agraria*. 113(4):313-324. Doi.org/10.12706/itea.2017.019.
- Romero, A. O.; Huerta, L. M.; Damián, H. M. A.; Domínguez, H. F. y Arellano, V. D. A. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11(2):143-151.
- Sabbagh, S. K.; Roudini, M. and Panjehkeh, N. 2017. Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mossea* on cucumber damping-off disease caused by *Phytophthora melonis*. *Arch Phytopathol. Plant Protec.* 50(5-8):375-3788.
- Sánchez, G. B. M.; Espinosa, H. E.; Villordo, P. E.; Rodríguez, G. R. y Mora, A. 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*. 1(51):63-79.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS/STAT User guide. Release 9.0. North Carolina, USA. 1289.



- Segarra, G.; Avilés, M.; Casanova, E.; Borrero, C. and Trillas, I. 2013. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T-34. *Phytopathol. Mediterránea*. 1(52):77-83.
- Seifert, K. 1996. *Fusarium* interactive key. Agric. Agri-Food. Canada. 65 p.
- Singh, B. N.; Singh, A.; Singh, S. P. and Singh, H. B. 2011. *Trichoderma harzianum*-mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *European Journal Plant Pathology*. 1(131):121-134.
- Sinuco, D. C.; Pérez, A. C.; Moreno, N. 2017. Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1(19):63-70.
- Sneh B.; Burpee L. and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathology Society, MN. 133 p.
- Sonnenbichler, J.; Lamm, V.; Gieren, A.; Holdenrieder, O, and Lotter, H. 1983. A Cyclopentabenzopyranone produced by the fungus *Heterobasidion annosum* in dual cultures. *Phytochemistry*. 22(6):489-1491. Doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84043-1.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1986. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª (Ed.). México: McGraw-Hill. 228 p.
- Vásquez, L. A.; Tlapal, B. B.; Yáñez, M. M.; Pérez, R. P. y Quintos, M. E. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 2(32):127-134.
- Verma, M.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D.; Sahai, V.; Prévost, D.; Valéro, J. R. and Surapalli, R. Y. 2007. Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 41(6):764-771.
- Woo, S. L. and Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. *In: ovel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*. Vurro, M; Gressel, J. N. (Eds.). Springer, Dordrecht. 107-130 pp.
- Zegeye, D. E.; Santhanam A.; Gorfú, D.; Tessera, M. and Kassa, B. 2011. Biocontrol activity of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* under greenhouse conditions. *Inter. J. Agric. Technol.* 6(7):1589-1602.