

Identificación y evaluación antagónica *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. nativas contra patógenos del duraznero

Ángel Rosario CEBALLOS-CHÁVEZ¹, Blanca Elvira LÓPEZ-VALENZUELA^{1*}, Fernando Alberto VALENZUELA-ESCOBOZA¹, Quintín Armando AYALA-ARMENTA¹, Ramiro LUJAN-HOLGUIN² & Héctor Alejandro MÁRQUEZ LUJAN³

¹Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte. Av. Japaraqui y Calle 16 S/N, CP 81110, Juan José Ríos, Sinaloa México. ²Universidad Tecnológica de la Tarahumara. Carretera Guachochi-Yoquivo, km 1,5, Turuseachi, CP 33180, Guachochi, Chihuahua, México. ³Universidad Tecnológica de la Babicora-Departamento de Agricultura Sustentable y Protegida. Carretera Soto Máynez-Gómez Farias, Col. Oscar Soto Máynez, C.P. 31963, Namiquipa, Chihuahua, México.

*Autor de correspondencia: blancalopezvzla@favf.mx

Abstract: Identification and antagonistic evaluation *in vitro* of strains of native *Trichoderma* spp. against peach pathogens. Interest in the biological control of phytopathogens has increased considerably due to the need to introduce effective environmentally friendly alternatives and put aside the massive use of agrochemicals. *Trichoderma* is an antagonistic agent used as a natural means against phytopathogens. The aim of the present investigation was to isolate and identify morphologically and molecularly native strains of *Trichoderma* sp. from the south of the state of Chihuahua, Mexico, testing its antagonistic capacity against phytopathogens. Four strains of *Trichoderma* sp. were isolated associated with plants such as *Prunus persica*, *Pinnus sylvestris* and *Arbutus unedo*. In the *in vitro* antagonism tests, strains 1, 3, 5 and 8 were evaluated against the phytopathogens *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Monilinia* sp. and *Collectotrichum* sp. subjecting the data to an Aligned Rank Transformation ANOVA test with 10 treatments and seven repetitions plus a control. The morphological identification of the antagonists was carried out according to the characteristics of the strain, physical growth and structural development of resistance, sequencing the TEF genes EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y TEF1LLErev (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3'), and the primers ITS1 and ITS4 (ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') to identify the species present. All were identified as *Trichoderma asperelloides* and presented acceptable control over the control of phytopathogens. The post hoc test detected significant differences in strain 1, presenting 81.2% *in vitro* biological control. It is suggested to carry out evaluations in peach plants at field level.

Key words: *in vitro* antagonism, biological control, peach tree, molecular, morphological

Resumen: El interés en el control biológico de fitopatógenos ha aumentado de manera considerable, debido a la necesidad de introducir alternativas eficaces amigables con el medio ambiente, y dejar a un lado el uso masivo de agroquímicos. *Trichoderma* es un agente antagónico utilizado como medio natural contra fitopatógenos. El objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar morfológica y molecularmente cepas nativas de *Trichoderma* sp. del sur del estado de Chihuahua, México, probando su capacidad antagónica contra fitopatógenos. Se aislaron cuatro cepas de *Trichoderma* sp asociadas a plantas como *Prunus persica*, *Pinnus sylvestris* y *Arbutus unedo*. En las pruebas de antagonismo *in vitro* se evaluaron las cepas 1, 3, 5 y 8 contra los fitopatógenos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Monilinia* sp. y *Collectotrichum* sp. sometiendo los datos a la prueba ANOVA de Aligned Rank Transformation con 10 tratamientos y siete repeticiones más un testigo. La identificación morfológica de los antagonistas se llevó a cabo de acuerdo con las características de la cepa, crecimiento físico y desarrollo estructural de resistencia, secuenciado los genes EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y TEF1LLErev (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3') y los cebadores ITS1 e ITS4 (ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para identificar las especies presentes. Todas fueron identificadas como *Trichoderma asperelloides* y presentaron un aceptable control sobre el control de fitopatógenos. La prueba post hoc detectó diferencias significativas en la cepa 1 presentando 81.2% de control biológico *in vitro*. Se sugiere realizar evaluaciones en planta de durazno a nivel campo.

Palabras clave: Antagonismo *in vitro*, control biológico, duraznero, molecular, morfológica

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el duraznero (*Prunus persica* L.) ocupa el segundo lugar entre los cultivos de frutales con hueso, después de la nectarina, y el 12^{vo} lugar de frutales (FAOSTAT, 2022). En México se producen 94.836,71 t (SIAP, 2022), de las cuales el 9.33% se produce en el estado de Chihuahua (SIAP, 2022). No obstante, en el cultivo se presentan diversas enfermedades que ocasionan pérdidas significativas de rendimiento, lo que lleva a serios problemas económicos en el sector productivo y social. Los hongos fitopatógenos del durazno han recibido especial atención, ya que pueden ser muy destructivos (Udayanga *et al.*, 2020). Entre ellos podemos mencionar a diferentes especies del género *Monilinia* sp. causantes de la podredumbre parda del melocotón; *Fusarium* sp. como agente causal de la fusariosis o enfermedad del marchitamiento; *Epicoccum* sp. causante de manchas en la hojas, frutos o semillas; *Alternaria* sp. causante de la podredumbre de los frutos y *Collectotrichum* sp., ocasionando la antracnosis del durazno, entre otras no menos importantes (Hu *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019).

El control biológico de fitopatógenos ha aumentado en los últimos años debido a la necesidad de introducir alternativas más respetuosas con el medio ambiente y disminuir el uso excesivo de fitosanitarios (Corke, 1975; Fira *et al.*, 2018; Mazrou *et al.*, 2020). Los organismos para control biológico actúan contra los fitopatógenos de varias maneras, como ser: micoparasitismo, supresión mediada por antibióticos, producción de enzimas líticas y otros subproductos, competencia por nutrientes o inducción de mecanismos de resistencia del hospedante (Mazrou *et al.*, 2020; Garrido *et al.*, 2021). El manejo de enfermedades utilizando organismos antagonicos ha sido considerado como una estrategia eficaz y prometedora para reducir la pérdida postcosecha de frutos (Zhang *et al.*, 2020).

Trichoderma ha sido ampliamente utilizado en el control biológico debido a su plasticidad ecológica, fácil producción a gran escala y eficiencia contra muchos fitopatógenos (Cai & Druzhinina, 2021; Inglis *et al.*, 2020). *Trichoderma* ha mostrado tener éxito en el control biológico mejorando el crecimiento y el vigor de las plantas, induciendo resistencia sistémica en la planta y permitiendo una mejor defensa contra fitopatógenos (Nawaz *et al.*, 2018). Su acción se basa principalmente en la activación de diversos mecanismos, ejerciendo un biocontrol de fitopatógenos que pueden estar

indirectamente compitiendo (nutrientes y espacio), modificando las condiciones ambientales presentes, o produciendo antibióticos directamente mediante micoparasitismo (Imran *et al.*, 2020; Zhan *et al.*, 2020). Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar morfológica y molecularmente las cepas de *Trichoderma* spp. nativas del sur del estado de Chihuahua, probando su capacidad antagonica contra diversos fitopatógenos de durazno que afectan el cultivo de la región antes mencionada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras vegetales para el aislamiento de *Trichoderma* spp. Se seleccionaron plantas de tres especies: pino silvestre (*Pinus sylvestris*), duraznero (*Prunus persica*) variedad amarilla y blanco, y madroño (*Arbutus unedo*) al azar, todos presentes en el sur del estado de Chihuahua (Fig. 1). Se establecieron cuatro puntos de muestreo, de los cuales dos corresponden a la planta de durazno, uno a pino y uno a madroño (Tabla 1). De las especies vegetales antes mencionadas, se tomaron pequeños cortes de raíz, utilizadas como material de origen para el aislamiento de hongos del género *Trichoderma* spp. Las muestras se tomaron a 15 cm de distancia de la base del tallo y 10 cm de profundidad. La medición se llevó a cabo con una cinta métrica y con la ayuda de unas tijeras previamente desinfectadas. Los especímenes se almacenaron posteriormente en bolsas de papel estraza y una hielera para ser trasladados al laboratorio de microbiología de la Universidad Tecnológica de la Tarahumara, donde se mantuvieron en refrigeración a 4 °C por 10 horas.

Aislamiento de *Trichoderma* spp. Los aislamientos se llevaron a cabo de acuerdo con Sánchez *et al.* (2021). El tejido radicular de cada planta se cortó en fragmentos de 5,0 cm². Posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,25% durante 60 s, seguido de cuatro enjuagues utilizando agua destilada previamente estéril. Para el secado se utilizó papel estéril absorbente. Se utilizaron cajas Petri con el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se sembraron los fragmentos de tejidos desinfectados y se incubaron durante cuatro días a 27 °C ± 2. Los cultivos se monitorearon diariamente hasta observar el crecimiento típico de *Trichoderma* spp.: colonias con alta tasa crecimiento que mostraron una tonalidad de color verde y

Tabla 1. Ubicación de puntos de muestreo donde se recolectó el material vegetativo de raíz de cultivares, pertenecientes a los municipios de Guachochi y Morelos en Chihuahua. Nota: 1,3,5 y 8=Número de cepa, CP=Ciénega Prieta, G=Guachochi, R=Raíz, T=*Trichoderma*, SP=San Pablo, M=Morelos, M5=Muestra 5, LJ=Las Joyitas, M2=Muestra 2, M=Muestra.

Cultivar	Identificación de Aislados	Municipio	Localización geográfica
Pino	1=CP-G-R-T	Ciénega Prieta Guachochi	26° 50' 52.74" N 106° 56' 44.12" W 2400 m s.n.m.
Durazno variedad amarillo	3=SP-M-M5-R-T	San Pablo, Morelos	26° 32' 54.3" N 107° 47' 38.8" W 2094 m s.n.m.
Durazno variedad blanco	5=LJ-M-M2-R-T	Las Joyitas, Morelos	26° 37' 45.3" N 107° 44' 37.9" W 1238 m s.n.m.
Madroño	8=CP-G-M-R-T	Ciénega, Prieta Guachochi	26° 51' 40.50" N 106° 58' 8.333" W 2400 m s.n.m.

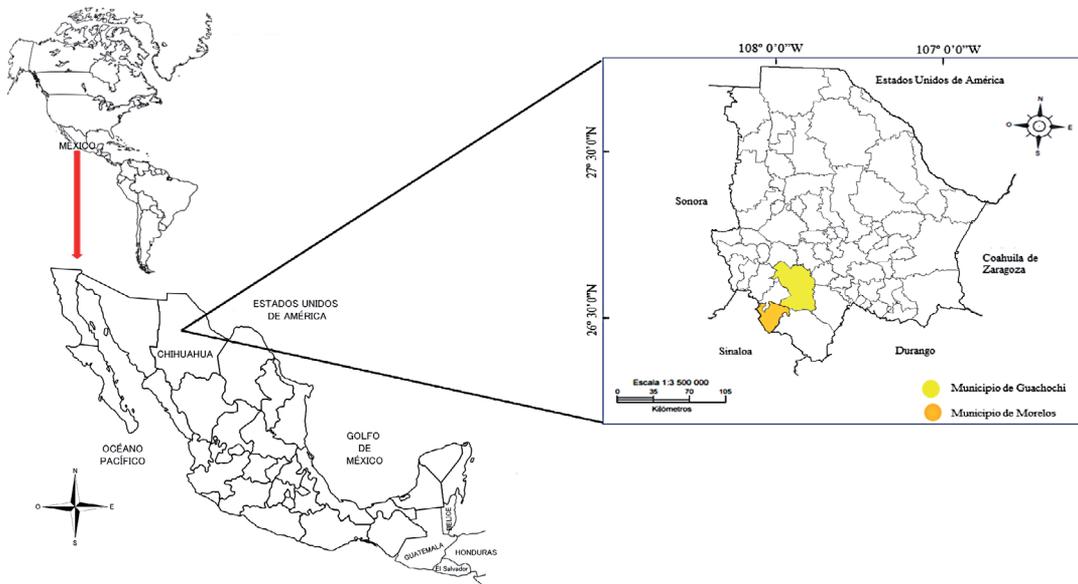


Fig. 1. Mapa del sur de Chihuahua, México, que muestra los sitios de recolección de material vegetativo de los aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos.

anillos concéntricos. Se tomaron porciones de las colonias las cuales se transfirieron al medio de cultivo PDA (Panizo *et al.*, 2005).

Caracterización morfológica. Para observar las estructuras microscópicas, el material fúngico se montó en glicerina aplicando la técnica de aplastamiento o “squash” (Lugo *et al.*, 2018). La muestra se observó bajo un microscopio óptico compuesto Imager M2 utilizando el software ZEN, en aumentos de 100X y 400X. Se registró la forma, largo y ancho de 50 conidióforos, el diámetro de las hifas vegetativas (principal eje

de los conidióforos) (Guigón & Guerrero, 2010; Kubicek *et al.*, 2019), así como el largo y ancho del micelio, diámetro y forma de las esporas y longitud de hifas (Ezziyany *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2016; Asis *et al.*, 2021).

Las características evaluadas incluyeron el diámetro de las colonias, coloración del anverso y reverso de las mismas, presencia de clamidosporas y pigmento difusible, textura de las colonias, disposición de las métulas o fiálides, esporas, conidióforos y formación de anillos concéntricos (Arrúa *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2018; Nawas *et al.*, 2018; Andrade *et al.*, 2019).

Identificación molecular

Extracción de ADN, PCR y secuenciación.

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de micelio aéreo aislado de *Trichoderma* con el reactivo DNazol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante (Ríos *et al.*, 2021). Para la identificación molecular se amplificó el espaciador transcrito interno (ITS) y el gen parcial de factor de elongación 1 alfa (TEF), mediante PCR utilizando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3') (White, 1990), y EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (Carbone y Kohn, 1999) / TEF1LLErev (5'-AACTTGACGCAATGTGG-3') (Hall, 1999; Jaklitsch *et al.*, 2005), respectivamente. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L, los cuales contenían 1 μ L de ADN genómico, Buffer 1X, 1,25 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP's y 1U de Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, con 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min; el anillamiento a 55°C por 1 min con extensión a 72°C por 40 seg min (ITS) y a 59°C por 1,5 min con extensión a 72° por 1,5 min (TEF) ambos con una extensión final de 72°C por 5 min. La visualización de los fragmentos amplificados en gel de agarosa al 1%, fue teñido con bromuro de etidio en un fotodocumentador (BIO-RAD). Una vez obtenidos los productos amplificados estos fueron secuenciados en Macrogen Inc. (Corea) los cuales se anclan en los ADNr.

Análisis filogenético. Para editar las secuencias se utilizó el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999). Las mismas se compararon con secuencias depositadas en la base de datos GenBank, empleando el algoritmo BLASTn. Las cadenas de cada gen/región fueron alineadas a un set de cadenas de referencia del género *Trichoderma* y la cadena de *Protocrea farinosa* CBS 121551, con el alineador MUSCLE (Edgar, 2004) e implementado con MEGA11 (Zhan *et al.*, 2018). Los alineamientos se concatenaron en MEGA y la matriz resultante se analizó en PartitionFinder versión 1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012) para determinar el mejor esquema de particiones. Con respecto al árbol filogenético, se llevó a cabo por el método de Máxima Verosimilitud en RAXML versión 7.2.8 (Stamatakis, 2006; Voglmayr *et al.*, 2016), empleando el modelo GTRGAMMAI y 1000 réplicas Bootstrap. Se utilizó el software FigTree versión 1.4.0 (Rambaut, 2014) para editar el filograma.

Cultivos duales. Se empleó la técnica de cultivos duales descrita por Andrade *et al.* (2019) para establecer la capacidad antagónica de los aislados de *Trichoderma* con cinco géneros de hongos fitopatógenos de *P. persica*: dos aislados de *Fusarium* sp. obtenidos del municipio de Balleza, dos de *Alternaria* sp. y cuatro de *Epicoccum* sp. obtenidos de los municipios de Guachochi y Morelos, uno de *Monilinia* sp. obtenido del municipio de Batopilas y uno de *Colletotrichum* sp del municipio de Morelos, todos del sur del estado de Chihuahua, México. Se utilizaron cajas Petri (90 mm) con PDA para el crecimiento de los diferentes fitopatógenos. En un extremo de las cajas Petri se situó un disco de 6 mm de diámetro de micelio tomado de cultivos con PDA de los fitopatógenos. Tres días después se colocó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de *Trichoderma* (previamente crecido en PDA) el otro extremo. La confrontación dual se llevó a cabo por cuatro (*Alternaria* sp., *Epicoccum* sp.), siete (*Monilinia* sp. *Colletotrichum* sp.) y nueve (*Fusarium* sp.) días de edad, una vez que el testigo de cada patógeno llenó la caja Petri (Rubio *et al.*, 2021). Cada combinación (fitopatógeno-*Trichoderma*) contó con seis repeticiones (Heflish *et al.*, 2021). Las cajas Petri se incubaron a 27 ± 2 °C. Para su registro se consideró el número de días de contacto entre antagonista y fitopatógeno, midiéndose el crecimiento radial en ambas colonias (mm), cada 12 h, para estimar la tasa de crecimiento diario (Andrade *et al.*, 2019; Savin *et al.*, 2021). Adicionalmente, se calculó la inhibición del crecimiento micelial (PICM), en porcentaje, con la fórmula propuesta por Oliveira *et al.* (2021).

Porcentaje de inhibición de Crecimiento Micelial (PICM) = $[(C - T) / C] \times 100$.

Donde: C = Crecimiento micelial del patógeno en la caja control (mm) y T = crecimiento micelial del patógeno enfrentado a *Trichoderma* (mm).

El efecto antagónico de *Trichoderma* se evaluó utilizando la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) que comprende cinco grados: 1) el antagonista invade completamente la superficie del medio de cultivo envolviendo completamente al patógeno; 2) el antagonista alcanza a sobrepasar las 2/3 partes de la superficie del medio de cultivo; 3) el antagonista y el patógeno colonizan cada uno alrededor de la mitad de la área del medio y ninguno parece dominar al otro; 4) el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando 3/4 partes de la superficie de la caja Petri y 5) el fitopatógeno llega a cubrir completamente la caja Petri.

Análisis estadístico. Los PICM se analizaron con ANOVA de Rango Alineado Transformado (ART), una prueba no paramétrica factorial implementada en el paquete ARTTool versión 4.0.5 (Wobbrock et al., 2022) de RStudio versión 1.4.1106 (Allaire, 2011). Las discrepancias entre tratamientos se determinaron con la prueba de media de Tukey con un alfa de P (>0.05). Los valores fueron ajustados con la librería emmeans versión 4.0.5 en RStudio (Lenth et al., 2022), utilizando un diseño estadístico completamente al azar.

RESULTADOS

Caracterización morfológica. Se lograron obtener cuatro aislados con características morfológicas y culturales tipológicas del género *Trichoderma* (CP-G-R-T, SP-M-M5-R-T, LJ-M-M2-R-T y CP-G-M-R-T). Al principio, las cepas se mostraron de color blancas y algodonosas. Después de cuatro días de incubación, el micelio alcanzó el borde del agar cubriendo completamente la caja Petri, apareciendo de color verde oscuro. Luego se desarrollaron pequeños círculos compactos de color verde amarillento a verde intenso, especialmente en el centro de un punto de crecimiento o en zonas concéntricas en forma de anillo en la superficie del medio empleado. El aislado 3 (SP-M-M5-R-T) desarrolló una coloración de colonia verde oscuro fuerte de dos anillos concéntricos grandes con textura algodonosa, con poco de micelio aéreo después de 10 días de crecimiento, y una coloración blanca sobre la superficie filamentosas al reverso de la caja Petri. Los conidios presentaron forma globosa de 3,67 a 4,44 μm de diámetro, con fiálides en forma globosa de 5,67 de ancho y 11,35 μm de largo (Fig. 2).

Las colonias 5 (LJ-M-M2-R-T) y 8 (CP-G-M-R-T) presentaron colonias color verde oscuro de 3 a 4 anillos concéntricos grandes con textura pulverulenta y granulada, con abundante micelio aéreo después de nueve días de crecimiento, de color crema con tonalidad verdosa y con un halo céntrico al reverso de la caja Petri. Los conidios eran de forma ovoide a elipsoide de 4,77 a 5,77 μm de diámetro, las fiálides presentaron forma ligeramente globosa, de 5,41 μm de ancho y 13,00 μm de largo (Fig. 2). En el aislado 1 (CP-G-R-T) se observó una coloración verde oscuro-azulado, con formación de colonia pulverulenta, con abundante micelio aéreo, sin presencia anillos concéntricos, con conidios de forma subglobosa de 4,00 a 4,93 μm de diámetro, y fiálides en forma de botella de 5,67 μm de ancho y 11,35 μm de

largo (Fig. 2). Las cuatro cepas de *Trichoderma* spp. registraron una tasa de crecimiento de entre 0,95 a 1,09 mm/día, cubriendo por completo la caja Petri en 96 h.

Identificación molecular. Al comparar la secuencia de la región ITS, de los aislados CP-G-R-T, SP-M-M5-R-T, LJ-M-M2-R-T y CP-G-M-R-T, con la base de datos de GenBank, la cepa SP-M-M5-R-T presentó 100% de igualdad con distintas especies del género *Trichoderma*: *T. asperellum* (MT529846, ON877396), *T. hamatum* (MT111894), *T. asperelloides* (ON844157) y *T. yunnanense* (MN989979). Al comparar las secuencias parciales del gen TEF, los resultados mostraron un 100% de similitud de todas las cepas con *Trichoderma asperellum* (MK391533) y *T. asperelloides* (MN428412). El análisis filogenético multigen confirmó que las cepas de *Trichoderma* estudiadas pertenecen a la especie *T. asperelloides* (Fig. 3), ya que todas se agrupan en un mismo clado con la secuencia de referencia de *T. asperelloides* aislado GJS 04-217 (Bootstrap 55%).

Biocontrol de *Trichoderma asperelloides* en fitopatógenos. El efecto antagónico de todas las cepas de *Trichoderma* frente a los diferentes patógenos se clasificaron en grado 1 de la escala de Bell et al. (1982), ya que *Trichoderma asperelloides* limita el crecimiento del fitopatógeno y crece sobre él, cubriendo toda la superficie de la caja (Fig. 4). Dichos resultados indican la importancia de conocer la rapidez del aumento de crecimiento micelial de la cepa 3 con respecto al resto de los antagonistas. Las cepas de *T. asperelloides* presentaron un desarrollo más rápido que los fitopatógenos.

De acuerdo con el análisis estadístico, no existen diferencias significativas en el biocontrol de los hongos patógenos con las cepas de *T. asperelloides* ($F= 5,87$; $P = 0,0007$). La prueba post hoc no detectó diferencias en porcentaje de crecimiento en la capacidad antagónica de la cepa 1 (CP-G-R-T) con respecto a las cepas 3 (SP-M-M5-R-T) y 5 (LJ-M-M2-R-T) (Fig. 5). En general, la cepa 1 (CP-G-R-T) registró porcentajes de inhibición más bajos (mediana= 72,7%; RIQ= 9,7) que las cepas 3 (SP-M-M5-R-T) (mediana= 81,2%; RIQ= 7,0) y 5 (LJ-M-M2-R-T) (mediana= 79,2%; RIQ= 6,8). La cepa 8 (CP-G-M-R-T), al igual que el resto de las cepas de *Trichoderma asperelloides*, mostró un porcentaje similar (mediana 80,6%; RIQ= 6,9) (Fig. 5). Existe un efecto en la interacción *Trichoderma*-fitopatógeno ($F= 2,21$;

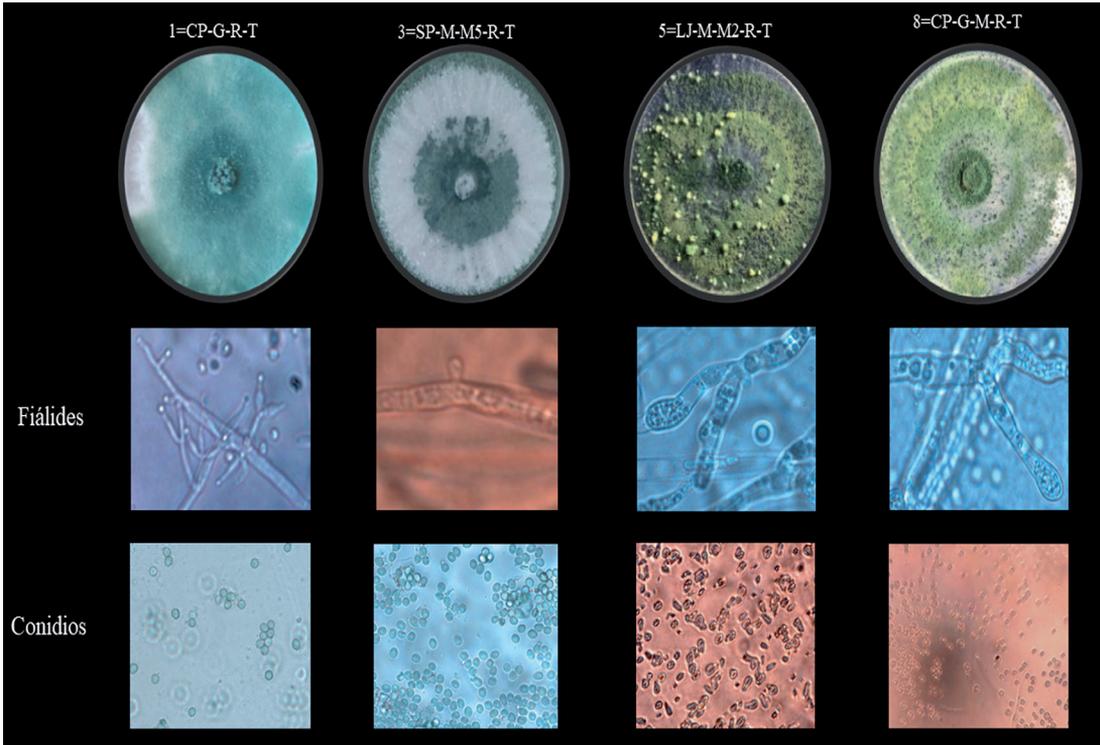


Fig. 2. Morfología típica del género *Trichoderma* spp. a los 9 días de crecimiento.

$P= 0,0009$), es decir, la capacidad antagonista de las cepas de *T. asperelloides* está en función del hongo fitopatógeno.

DISCUSIÓN

De las cepas obtenidas en el sur de Chihuahua, México, todas presentaron características morfológicas y culturales tipológicas del género *Trichoderma* spp. (Romero-Rosales *et al.*, 2021). Esto se debió principalmente a su coloración verde oscuro con anillos concéntricos en la caja Petri de 90 mm (Savín *et al.*, 2021), iniciando con coloraciones amarillentas y tornando a verde claro, hasta llegar al verde oscuro (Zin *et al.*, 2020; Degani & Dor, 2021). Estas características y la identificación molecular reafirman tanto el género como la especie de *Trichoderma asperelloides*, que a su vez coinciden con las reportadas por Mulatu *et al.* (2022) en Etiopía. En dicho estudio se revelaron colonias con rápida crecimiento micelial, anillos concéntricos y superficies flocosas o compactas en el medio de cultivo. Asimismo, se encontró que formaban colonias con micelio blanco, volviéndose verdes al formar los conidios y conidióforos (Mulatu *et al.*, 2022).

Por otro lado, Pakdaman (2013), obtuvo resultados con cepas de *T. asperelloides* los cuales fueron cultivados a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), destacando el potencial de dos de las cepas con alto potencial antagonista y velocidades de crecimiento estadísticamente altas. Sin embargo, el cambio de temperatura de 25°C a 15°C provocó el aumento de los valores de 2 a 4 días de crecimiento, mientras que, en el presente trabajo, las cepas de *T. asperelloides* tuvieron su grado óptimo de crecimiento a los $27\pm 2^\circ\text{C}$ en un periodo de 3 días de crecimiento a temperatura ambiente.

En cuanto al porcentaje de inhibición, de cada aislamiento se obtuvo un 72,7 a 81,2% de las cepas obtenidas en el sur de Chihuahua. Esto coincide con lo propuesto por Umaña *et al.* (2018), donde se presentó una variación de 3 a 90% de grado de inhibición, durante 72 horas, en condiciones ambientales similares. De igual manera, Sumida *et al.* (2018), evaluaron el potencial antagonista que ejerce *Trichoderma asperelloides* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* causante de la enfermedad de moho blanco en cultivo de soja, mostrando una excelente inhibición de crecimiento con rangos de 60 a 100% en todas las cepas evaluadas.

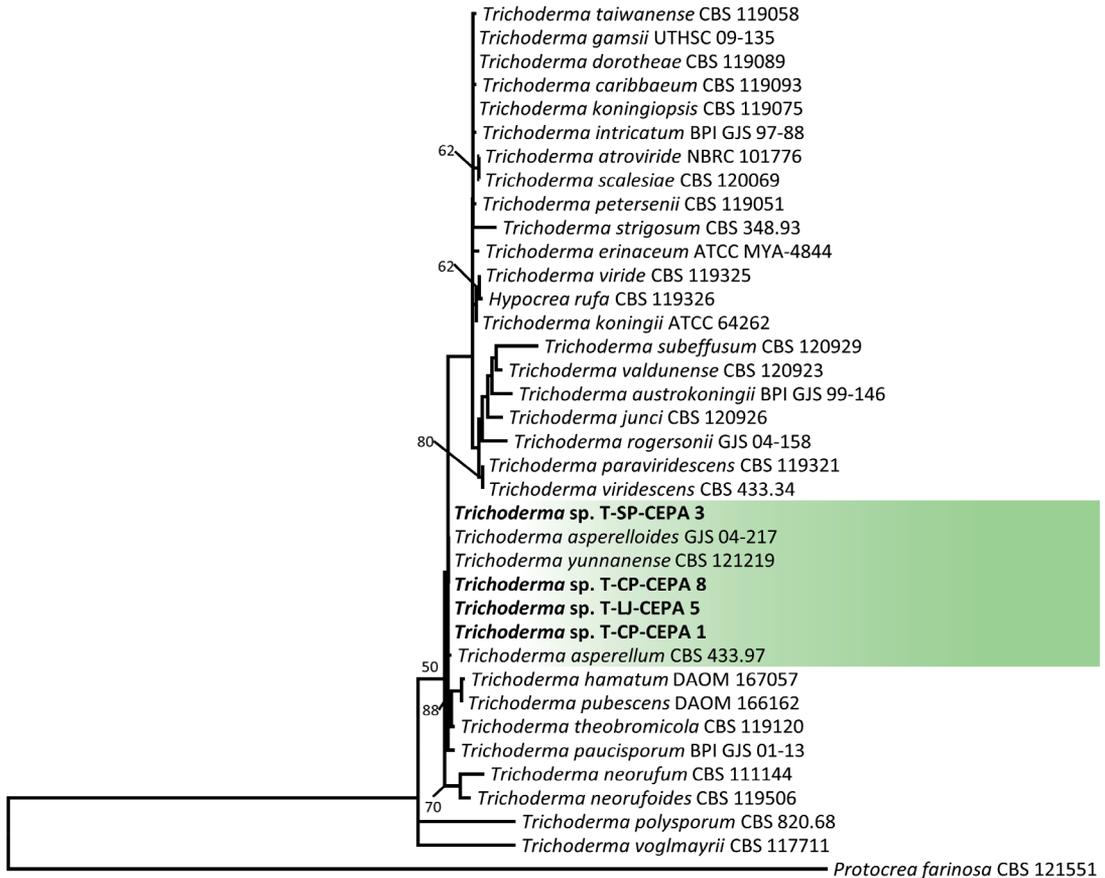


Fig. 3. Árbol filogenético del género *Trichoderma*, inferido por Máxima Verosimilitud a partir del alineamiento concatenado de la zona ITS y la secuencia parcial del gen característico del factor de elongación (TEF). La escala representa las sustituciones del promedio por sitio. Los datos bootstrap $\geq 50\%$ se muestran arriba de las ramas, junto a los internodos. Las especies estudiadas en esta investigación se exponen en negritas.

Asimismo, estos resultados son similares a los reportados por Sánchez *et al.* (2021), quienes obtuvieron un total de 17 aislados de *Trichoderma*, localizándose siete especies diferentes del antagonista en estudio, tales como: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. songyi*, *T. virens* y *T. breve*. De estas especies, *T. asperelloides* coincide con las características morfológicas y coloración encontradas en los aislados identificados en el sur de Chihuahua, mostrando efectividad como control biológico de enfermedades y promotores de crecimiento vegetal (Steffen *et al.*, 2019). Por consiguiente, se ha considerado a *T. asperelloides* como un hongo antagonico que reduce considerablemente la gomosis causada por *Fusarium* spp. en el norte del estado de Veracruz, permitiendo así una mejoría en la sanidad del cultivo de los cítricos (Cruz *et al.*, 2020).

En correspondencia con el árbol filogenético se logró identificar homogeneidad de los genes en las cuatro cepas aisladas de los municipios de Morelos y Guachochi, Chihuahua, ya que todas se agruparon en un mismo clado con la secuencia de referencia de *Trichoderma asperelloides* aislada GJS 04-217 (Bootstrap 55%). Asimismo, *T. asperelloides* fue encontrado en aislamientos de terrenos agrícolas, suelos de bosques tropicales y diferentes cultivos, por ejemplo, plátano (*Musa paradisiaca*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y pasto Guinea (*Panicum maximum*) en Nicaragua, con números de acceso MK427695.1 con puntuación de 946 e identidad máxima de 100 y 99,43 (Sánchez *et al.*, 2021). Además se ha identificado cepas de *T. asperelloides* utilizando pares de cebadores EF1728F y TEF1LLErev, así como CAL-228F y CAL-737R (cal1) (Gal *et*

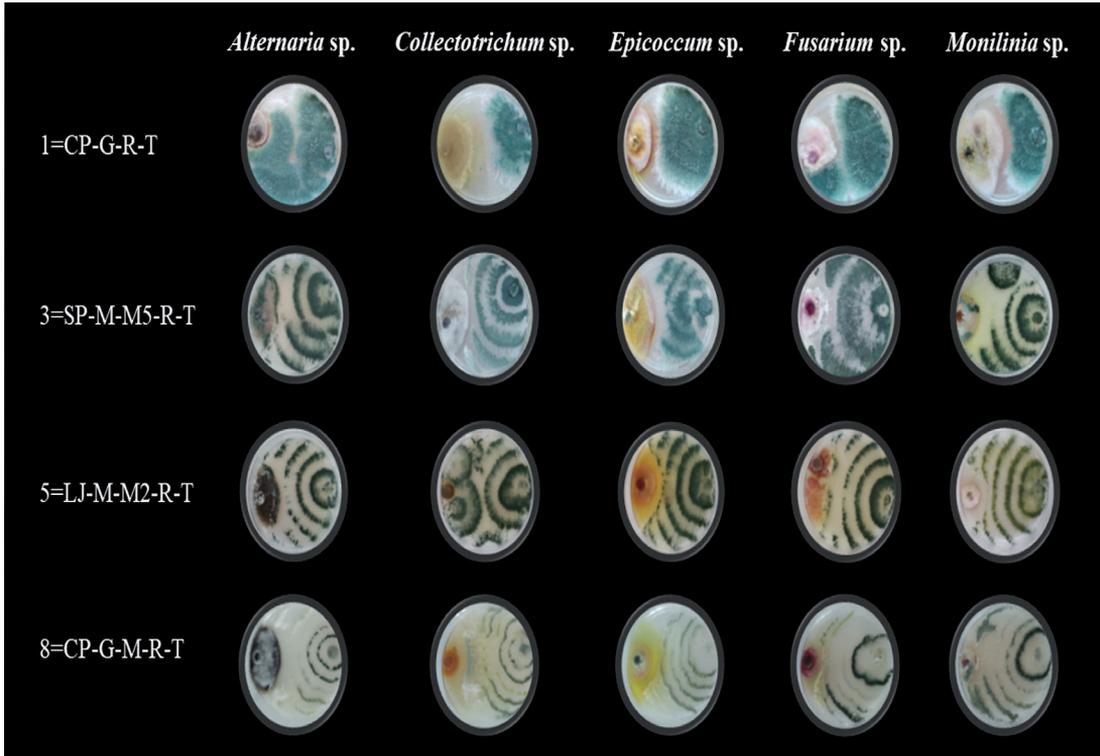


Fig. 4. Biocontrol *in vitro* de *Trichoderma asperelloides* aisladas de áreas templadas contra hongos fitopatógenos.

al., 2011). Por otro lado, estudios realizados por Heflish *et al.* (2021) evaluaron las características moleculares usando los genes ITS, Rpb2 y Tef-1, utilizando la herramienta GenBank BLAST para comparar las secuencias obtenidas con las de la base de datos.

En este estudio se destaca la importancia de las pruebas de PICM y de dar ventaja de tres días de crecimiento para obtener mejores resultados en los ensayos *in vitro*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ramírez *et al.* (2020), quienes evaluaron la efectividad de los agentes de biocontrol *Bacillus paralicheniformis* y *T. asperelloides* en condiciones *in vitro* e *in vivo* para controlar las enfermedades de tomate como la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*) y el tizón temprano (*Alternaria alternata*). Como resultado se vio que *T. asperelloides* fue capaz de ejercer un efecto micoparasitario sobre ambos hongos fitopatógenos en las pruebas *in vitro* entre 53,8% y 66,7%. Iguales resultados fueron obtenidos por López-Valenzuela *et al.* (2022), quienes lograron medir la capacidad de biocontrol con *Fusarium oxysporum*, *Alternaria spp.* y *Helminthosporium spp.* obteniendo porcentaje de inhibición entre 83,3% y 87,7% ubicados entre

los grados 1 y 2 de la escala propuesta por Bell *et al.* (1982). Asimismo, Silva *et al.* (2022) evaluaron a *T. asperelloides* enfrentando a fitopatógenos, tanto de suelo como foliares, donde los porcentajes de inhibición presentaron una variación de 56,6% a 80,4% en *Colletotrichum gloeosporioides*, de 70,5% a 73,1% en *Macrophomina sp.*, y de 80,4% a 84,5% en *Curvularia lunata*, considerándose un antagonista eficaz.

CONCLUSIONES

Los cuatro aislados de *Trichoderma* derivados de la parte del suelo (rizosfera) de las plantas de durazno (*Prunus persica*) y pino (*Pinus arizonica*) en el sur de Chihuahua, fueron caracterizados morfológica y molecularmente, y se determinó que pertenecen a la especie *T. asperelloides*.

Todos los aislados mostraron una alta inhibición del crecimiento micelial contra los cinco hongos fitopatógenos: *Epicoccum sp.*, *Alternaria sp.*, *Monilinia sp.*, *Collectotrichum sp.* y *Fusarium sp.* La estirpe 3 (SP-M-M5-R-T) presentó un alto potencial para el control *in vitro* frente a los fitopatógenos.

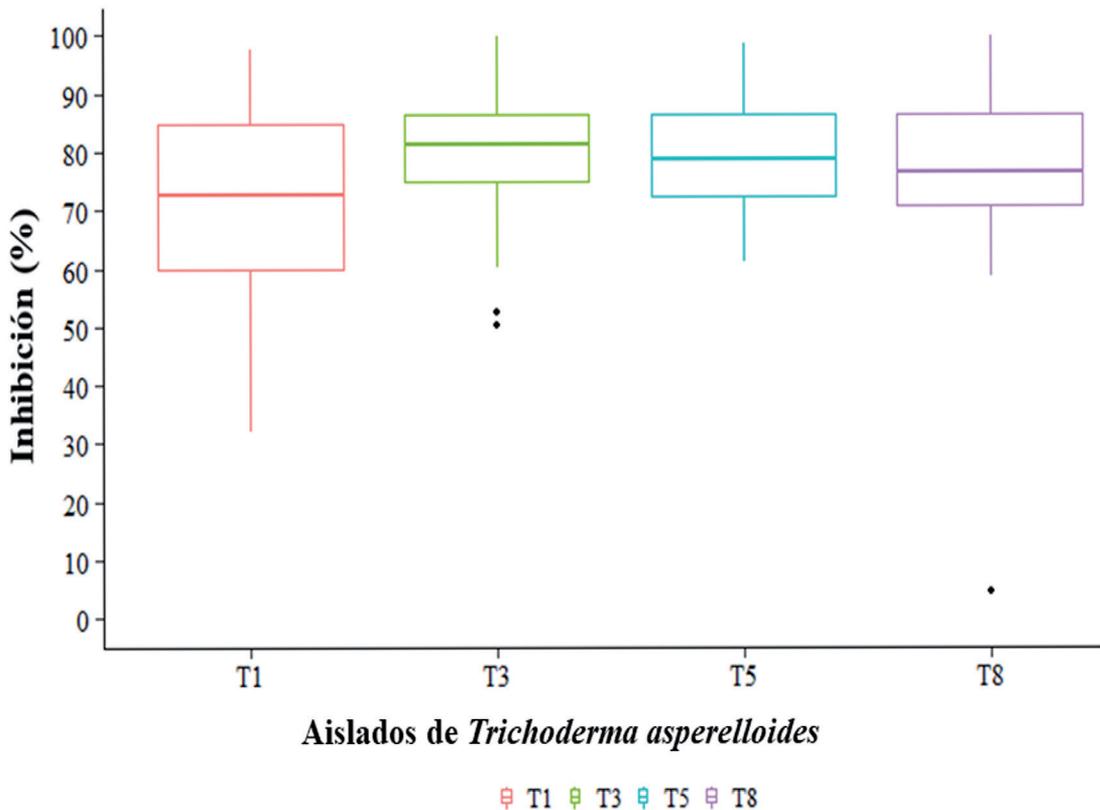


Fig. 5. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. (1=CP-G-M-R-T, 3=SP-M-M5-R-T, 5=LJ-M-M2-R-T y 8=CP-G-R-T) contra fitopatógenos (*Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Monilinia* sp., *Epicoccum* sp. y *Colletotrichum* sp.) de *Prunus persica*.

La aplicación de microorganismos antagonistas es una alternativa biológica para el control de fitopatógenos foliares en cultivos de durazno en condiciones controladas (*in vitro*). Por lo tanto, se recomienda realizar bioensayos de biocontrol en condiciones de invernadero o campo abierto en cultivos de durazno.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONAHCyT por el apoyo brindado para la realización de esta investigación. También a la Unidad Local de Fitosanidad Vegetal del Valle del Fuerte y la Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal por proporcionar los equipos para la realización de este trabajo. Por último, a Zaira Moreno, Leidy Chávez y Rogelio Estrada, quienes participaron como colaboradores del trabajo experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Allaire, J.J. 2011. RStudio: Integrated Development Environment for R. <https://www.r-project.org/conferences/useR-2011/abstracts/180111-allairejj.pdf>
- Andrade, H.P., Luna, C.A., Osorio, H.E., Molina, G.E., Landero, V.N. & Barrales, C.H.J. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(6): 1259–1272.
- Arrúa, A.A.A., Moreno, M.E., Quezada, V.M.Y., Moreno, L.J., Vázquez, B.M.E. & Flores O.A. 2012. *Aspergillus aflatoxigénicos*: enfoque taxonómico actual. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(5): 1047–1052.
- Asis, A., Shahriar, S.A., Naher, L., Saallah, S., Fatimah, H.N.N., Kumar, V. & Siddiquee, S. 2021. Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports* 48(4): 3285–3301.
- Bell, D.K., Well, H.D. & Markham, C.R. 1982. *In vitro*

- Antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Ecology and epidemiology* 72: 379–382.
- Cai, F. & Druzhinina, I.S. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal diversity* 107(1): 1–69.
- Corke, A.T.K. 1975. Review of Biological control of plant pathogens. By Kenneth F. Baker and R. James Cook. San Francisco: Freeman (1974), pp. 433. *Experimental Agriculture* 11(2): 159.
- Cruz, R.L., Silva, M.K.L., González, C.J.C., Elorza, M.P. & Purroy, V.R. 2020. Análisis campo-sustancia de TRIZ para el uso de *Trichoderma asperelloides* como antagonista en *Citrus sinensis*. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan* 8(2): 8–13.
- Degani, O. & Dor, S. 2021. *Trichoderma* biological control to protect sensitive maize hybrids against late wilt disease in the field. *Journal of fungi* 7(4):315.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32(5): 1792–1797.
- Ezziyiani, M., Requena, M.E., Egea, G.C. & Candelà, M.E. 2007. Biological control of *phytophthora* root of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei*. *Combination. Journal of phytopathology* 155(6): 342–349.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. & Stanković, S. 2018. Control biológico de fitopatógenos por especies de *Bacillus*. *Journal of biotechnology* 285: 44–55.
- Gal, H.I., Atanasova, L., Komon, Z.M., Druzhinina, I.S., Viterbo, A. & Yarden, O. 2011. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and environmental microbiology* 77(15):5100–5109.
- Garrido, F.C., Cedano, S.C., Delgado, J.M. & Neira, S.Z. 2021. Actividad micoparasítica de nueve aislamientos de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. sobre *Rhizoctonia solani* en frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.). *Tayacaja* 4(2): 59–65.
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carbajal-Millan, E., Avila-Quezada, G., Bravo-Luna, D., Ruocco, L., Lanzuise, M., Woo, S. & 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): 87–96.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41(49): 95–98.
- Heflish, A.A., Abdelkhalek, A., Al-Askar, A.A. & Behiry, S.I. 2021. Protective and curative effects of *Trichoderma asperelloides* Ta41 on tomato root rot caused by *Rhizoctonia solani* Rs33. *Agronomy* 11(6): 1162.
- Hu, M.J., Cox, K.D., Schnabel, G. & Luo, C.X. 2011. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS ONE* 6(9): Article e24990.
- Inglis, P.W., Mello, S.C.M., Martins, I., Silva, J.B.T., Macedo, K., Sifuentes, D.N. & Valadares, I.M.C. 2020. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *PLoS ONE* 15(3): Article e0228485.
- Imran, I., Amanullah, A., Arif, M., Shah, Z. & Bari, A. 2020. Soil application of *Trichoderma* and peach (*Prunus persica* L.) residues possesses biocontrol potential for weeds and enhances growth and profitability of soybean (*Glycine max*). *Sarhad journal of agriculture* 36(1): 10–20.
- Jang, S., Kwon, S.L., Lee, H., Jang, Y., Park, M.S., Lim, Y.W., Kim, C. & Kim, J.J. 2018. New report of three unrecorded species in *Trichoderma harzianum* species complex in Korea. *Mycobiology* 46(3): 177–184.
- Jiang, Y., Wang, J.L., Chen, J., Mao, L.J., Feng, X.X., Zhang, C.L. & Lin, F.C. 2016. *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. *Plos One* 11(8): e0160613.
- Kubicek, C.P., Steindorff, A.S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopychinskiy, A.G., Kubicek, E.M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Noronha, E.F., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I.V. & Druzhinina, I.S. 2019. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics* 20(1): 485.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. & Guindon, S. 2012. Partition finder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution* 29(6): 1695–1701.
- Lenth, R., Buerkner, P., Giné, V.L., Herve, M., Jung, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H. & Singmann, H. 2022. Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/emmeans.pdf>
- López, V.B., Tzintzun, C.O., Armenta, B.A., Valenzuela, E.F., Lizárraga, S.G. & Ruelas, I.J., González, M.D. 2022. Microorganismos del género *Trichoderma* productores de fitohormonas y antagonistas de fitopatógenos. *Bioagro* 34(2): 163–172.
- Lugo, M., Iriarte, H.J., Crespo, T.M.L., Ontivero, E., Risio, L.V., Menoyo, E. & Ballesteros, S.L. 2018. *Preparación de soluciones y colorantes. Manual de metodologías para el trabajo con hongos y sus simbiosis* 1ª ed. Nueva Editorial Universitaria, San Luis. 74 pp.
- Mazrou, Y.S.A., Makhlof, A.H., Elseehy, M.M., Awad, M.F. & Hassan, M.M. 2020. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian journal of biological pest control* 30(1): 1–8.
- Mulatu, A., Megersa, N., Abena, T., Kanagarajan, S., Liu, Q., Tenkegna, T.A. & Vetukuri, R.R. 2022. Biodiversity of the genus *Trichoderma* in the rhizosphere of coffee (*Coffea arabica*) plants in Ethiopia and their potential use in biocontrol of coffee wilt

- disease. *Crops* 2(2):120–141.
- Nawaz, K., Shahid, A.A., Bengyella, L., Subhani, M.N., Ali, M., Anwar, W., Iftikhar, S. & Ali, S.W. 2018. Diversity of *Trichoderma* species in chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsica*. *Scientia horticulturae* 239: 242–252.
- Oliveira, R.S.D., Martins, A., Martins, A.L.L., Nunes, H.V., Nunes, B.H.D.N., Chagas, L.F.B. & Chagas, J.A.F. 2021. Biocontrol *in vitro* of *Trichoderma* spp. to pathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Curvularia lunata*. *Revista de Ciências Agrárias* 44(1): 61–70.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/STAT). Producción mundial de cultivos <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. (Acceso 2022, agosto 28).
- Pakdamani, B.S. 2013. Toward the quantification of confrontation (Dual Culture) Test: A case study on the biological control of *Pythium aphanidermatum* with *Trichoderma asperelloides*. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* 04(02): e1000137
- Panizo, M.M., Reviákina, V., Montes, W. & González, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología* 25(1): 35–40.
- Ramírez, C.H.F., Guadarrama, M.P.C., Sánchez, L.V., Cuervo, P.J.A., Ramírez, R.T., Dunlap, C.A. & Valadez, B.R. 2020. Biocontrol de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* por *Trichoderma asperelloides* y *Bacillus paralicheniformis* en plantas de tomate. *Antonie van Leeuwenhoek* 113(9): 1247–1261.
- Ren, D.Y. 2019. Organs, cultivars, soil, and fruit properties affect structure of endophytic mycobiota of pinggu peach trees. *Microorganisms* 7(9): 322.
- Ríos, H.T.A., U-c, V.A. & Evangelista, M.Z. 2021. Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(3): 391–413.
- Romero, R.T., Acuña, S.J., Azuara, D.A., Lázaro, D.M.A., Monteon, O.A., Vargas, M.H. & Secundin, E.Y. 2021. Identification and *in vitro* antagonism evaluation of native strains of *Trichoderma* spp. on phytopathogenic fungi associated with chalice spot in jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L). *Tropical and subtropical agroecosystems* 24(1): 1–10.
- Rubio, T.S., Osorio, H.E., Estrada, D.B., Silva, E.J.H.T, Rodríguez, M.M.D.L. & Nava, J.R.A. 2021. Biocontrol antagonista *in vitro* de *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(3): 515–528.
- Sánchez, M.M.D., Moreno, M.L.F. & Páramo, A.L.A. 2021. Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. *Revista ciencia y tecnología el higo* 11(1): 26–42.
- Savín, M.J., Hernández, M.L.G., Ceiro, C.W., Ávila, Q.G.D., Palacios, E.A., Ruiz, E.F.H. & Romero, B.M. 2021. Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos semiáridos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(3): 435–451.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción nacional de durazno en México. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (acceso 2022, septiembre 30)
- Silva, de O.R., Borges, Ch.L.F., Lima, M.A.L., Costa, S.M., Lima, L.L., Luane, G.F. & Chagas, J.A.F. 2022. *Trichoderma* in the phytopathogenic biocontrol. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 28(4): 717–724.
- Sumida, C.H., Daniel, J.F.S., Araujod, A.P.C.S., Peitl, D.C., Abreu, L.M., Dekker, R.F.H. & Canteri, M.G. 2018. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol Science and Technology* 28(2): 142–156.
- Stamatakis, A. 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688–2690.
- Steffen, G., Maldaner, J., Steffen, R., Saldanha, C. & Peccatti, A. 2019. *Trichoderma asperelloides* promueve crecimiento inicial em mudas de *Corymbia citriodora*. *Enciclopedia Biosfera* 16(29): 1699–1708
- Udayanga, D., Miriyagalla, S.D., Herath, I.S., Castlebury, L.A., Ferdinandez, H.S. & Manamgoda D.S. 2020. Foliar pathogenic fungi: growing threats to global food security and ecosystem health. *Ceylon Journal of Science* 49(5):337.
- Umaña, C.J., Orozco, C.S, Umaña, C.R. & Molina, B.R. 2018. Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales* 53(1): 125.
- Voglmayr, H., Akulov, O.Y. & Jaklitsch, W.M. 2016. Re-assessment of *Allantonectria*, phylogenetic position of *Thyronectroidea*, and *Thyronectria caraganae* sp. nov. *Mycological Progress* 15(9): 921–937.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics PCR Protocols. *Mycologia* 64 (1):315–322.
- Wobbrock, J.O., Findlater, L., Gergle, D., Higgins, J.J. 2011. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*: 143–146.
- Wu, S., Zhen, C., Wang, K. & Gao, H. 2019. Effects of *Bacillus subtilis* CF-3 VOCs combined with heat treatment on the control of *Monilinia fructicola* in peaches and *Colletotrichum gloeosporioides* in litchi fruit. *Journal of food science* 84(12): 3418–3428.
- Zhang, X., Wu, F., Gu, N., Yan, X., Wang, K., Dhanasekaran, S., Gu, X., Zhao, L., & Zhang, H. 2020. Post-harvest biological control of *Rhizopus* rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*. *Postharvest biology and technology* 163: e111146.
- Zhan, Q., Wang, N., Jin, S., Tan, R., Jiang, Q. & Wang, Y. 2018. ProbPPF: A multiple sequence alignment algorithm combining partition function and hidden

markov model with particle swarm optimization. *IEEE International conference on bioinformatics and biomedicine (BIBM)*: 1290–1295.

Zin, N.A. & Badaluddin, N.A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of agricultural sciences* 65(2): 168–178.

Doi: 10.22179/REVMACN.26.833

Recibido: 17-X-2023
Aceptado: 16-II-2024