

UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA
UNIDAD ACADÉMICA SAN LUIS RIO COLORADO



**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN
BIOSUSTENTABLES**

**“IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. DEL VALLE DE
SAN QUINTÍN, B. C., PARA EL CONTROL DE *Fusarium* sp. y *Botrytis*
sp.”**

PROYECTO DE TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

FRANCISCO EDUARDO VARGAS CRUZ

SAN LUIS RIO COLORADO, SONORA.

FEBRERO, 2016.

FORMATO F5

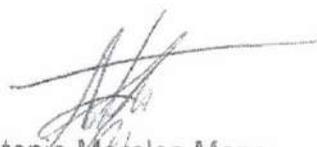
ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAESTRO, OPCIÓN TESIS

Los miembros del Comité de Tesis del alumno Francisco Eduardo Vargas Cruz recomendamos que el documento titulado: Identificación de cepas de *Trichoderma sp.* del Valle de San Quintín, B.C. para el control de *Fusarium sp.* y *Botrytis sp.*, sea aceptado como Requisito Parcial para obtener el grado de MAESTRIA EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOSUSTENTABLES.

COMITÉ DE TESIS


Dr. Noé Ortiz Uribe
Director


Dra. Rufina Hernández Martínez
Co-Director


Dr. Antonio Morales Maza
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por apoyarme en las decisiones que he tomado e inspirarme en ser una mejor persona cada día.

A mi comité de tesis, el Dr. Noé Ortiz, la Dra. Rufina Hernández y el Dr. Antonio Morales por su dirección, asesoría y apoyo en este trabajo.

A mis amigos Álvaro, Edel, Montana, Claudia, Gaby, Sarita, Habib, Jose María, Luis Carlos, Manuel, Leo, Ramón y Jorge, un agradecimiento a cada uno de ellos por su tiempo y su ayuda.

A mis compañeros de: el laboratorio de fitopatología-microbiología del CICESE, la maestría en sistemas de producción biosustentables y de la empresa Berrymex por su gran apoyo.

A la Universidad Estatal de Sonora y sus maestros por darme la oportunidad de participar en el programa de posgrado y por sus enseñanzas fuera y dentro del aula.

ÍNDICE GENERAL		Pag.
	RESUMEN	1
	INTRODUCCIÓN	2
1	CAPITULO 1: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1	Planteamiento del problema	4
1.2	Justificación	5
1.3	Objetivos	6
2	CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1	El género <i>Fusarium</i> en fresas, frambuesas y zarzamoras	7
2.2	El género <i>Botrytis</i> en fresas, frambuesas y zarzamoras	8
2.3	Control Biológico de enfermedades	9
2.4	El género <i>Trichoderma</i> .	11
2.5	Caracterización morfológica y genética	12
3	CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	14
3.1	Ubicación del sitio de estudio	14

3.2	Aislamiento de patógenos y agentes de control biológico	15
3.2.1	Aislamiento del patógeno <i>Fusarium</i> spp.	15
3.2.2	Aislamiento del patógeno <i>Botrytis</i> spp.	16
3.2.3	<i>Trichoderma</i> spp.	16
3.3	Caracterización morfológica	17
3.4	Caracterización molecular	18
3.5	Determinación de producción de enzimas quitinolíticas en <i>Trichoderma</i>	20
3.6	Determinación de producción de sideróforos en <i>Trichoderma</i>	20
3.7	Inhibición de crecimiento por el método de cultivos duales	21
3.8	Compuestos orgánicos volátiles	21
3.9	Compuestos orgánicos no volátiles.	22
4	CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1	Resultados	23
4.1.1	Aislamiento e identificación de cepas	23

4.1.1.1	Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
4.1.1.2	Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> .	23
4.1.1.3	Aislamientos de <i>Trichoderma</i>	25
4.1.2	Actividad de biocontrol de <i>Trichoderma</i>	28
4.1.2.1	Competencia por cultivo dual en <i>Fusarium oxysporum</i> .	28
4.1.2.2	Competencia por cultivo dual en <i>Botrytis cinerea</i> .	29
4.1.3	Evaluación de la producción compuestos volátiles	32
4.1.4	Producción de compuestos no volátiles	34
4.1.5	Producción de quitinasas	36
4.1.6	Producción de sideróforos.	38
4.1.7	Resumen de resultados	39
4.2	Discusión	42
5	Conclusiones	47
6	Recomendaciones	48
7	Bibliografía citada	49

INDICE DE FIGURAS

Pag.

- Figura 1. Ubicación del Valle de San Quintín, visto a 10 km. Fuente: Google Maps, 2014. 15
- Figura 2. Ubicación de las zonas donde se instalaron las trampas en el Valle de San Quintín, visto a 2 km. Fuente: Google Maps, 2017. 17
- Figura 3. Figura 3 Crecimientos de los patógenos *Fusarium oxysporum* A. FFOCR; B. FFAC y *Botrytis cinerea*; C. BFOC; D. BZC-B. aislados de los campos de la empresa BerryMex. 25
- Figura 4. Figura 4. Cepas aisladas de *Trichoderma* vistas a 100X bajo microscopio. A. *T. harzianum* TRK; B. *T. asperellum* TMC; C. *T. rifaii* TSKa; D. *T. asperellum* TSK; E. *T. harzianum* TSMC; F. *T. asperellum* TPZ; G. *T. atroviride* TM; H. *T. harzianum* TC. 27
- Figura 5 Clamidoesporas de *Trichoderma* vistas a 100X bajo microscopio. A. *T. atroviride* TM; B. *T. harzianum* TC *T. asperellum* TMC; C. *T. harzianum* TRK; D. *T. rifaii* TSKa. 28
- Figura 6. Actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* en contra de los hongos *Fusarium* y *Botrytis*. 30
- Figura 7. Figura 6. Ensayo de producción de compuestos volátiles de las cepas aisladas de *Trichoderma* y su efecto sobre *F. oxysporum* (FFOCR). A. Control; B. *T. harzianum* TRK; C. *T. asperellum* TMC; D. *T. rifaii* TSKa; E. *T. asperellum* TSK; F. *T. harzianum* TSMC; G. *T. asperellum* TPZ; H. *T. atroviride* TM; I. *T. harzianum* TC. 33

- Figura 8. Figura 7. Ensayo de producción de compuestos no volátiles de las cepas aisladas de *Trichoderma* y su efecto sobre *F. oxysporum* (FFOCR). A. Control; B. *T. harzianum* TRK; C. *T. asperellum* TMC; D. *T. rifaii* TSKa; E. *T. asperellum* TSK; F. *T. harzianum* TSMC; G. *T. asperellum* TPZ; H. *T. atroviride* TM; I. *T. harzianum* TC. 35
- Figura 9. Figura 8. Ensayo de producción de quitinasas de las cepas aisladas de *Trichoderma*. A. *T. harzianum* TRK; B. *T. asperellum* TMC; C. *T. rifaii* TSKa; D. *T. asperellum* TSK; E. *T. harzianum* TSMC; F. *T. asperellum* TPZ; G. *T. atroviride* TM; H. *T. harzianum* TC.; I. Control. 37
- Figura 10. Ensayo de producción de sideróforos de las cepas aisladas de *Trichoderma*. A. *T. harzianum* TRK; B. *T. asperellum* TMC; C. *T. rifaii* TSKa; D. *T. asperellum* TSK; E. *T. harzianum* TSMC; F. *T. asperellum* TPZ; G. *T. atroviride* TM; H. *T. harzianum* TC.; I. Control. 39

INDICE DE CUADROS

Pag.

Cuadro 1.	Identificación de aislamientos de las especies de <i>Fusarium</i> y <i>Botrytis</i> , en campos del Valle de San Quintín.	24
Cuadro 2.	Identificación de aislamientos del hongo <i>Trichoderma</i> .	26
Cuadro 3.	Producción de compuestos volátiles de las cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> .	32
Cuadro 4.	Producción de compuestos no volátiles de las cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> .	34
Cuadro 5.	Producción de quitinasas de las cepas aisladas de <i>Trichoderma</i>	36
Cuadro 6.	Producción de sideróforos de las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i>	38

RESUMEN

La empresa Berrymex S. de R.L. de C.V. es una empresa dedicada a la producción de frutillas como las fresas, frambuesas, arándanos y zarzamoras. La producción se ve afectada por problemas fitosanitarios, destacando las enfermedades causadas por los hongos de los géneros *Fusarium* y *Botrytis*. Las pérdidas por estos hongos son del 5 al 20% de la producción, con un valor aproximado de \$61'000,000 de pesos por ciclo de cultivo. *Trichoderma*, es considerado un agente de control biológico capaz de disminuir los daños causados por estos patógenos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. del valle de San Quintín, B. C., para controlar a los hongos fitopatógeno *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, en beneficio de la empresa Berrymex. Se obtuvieron ocho aislamientos de *Trichoderma*, cuatro de montaña del rancho Chapala, tres de rancho Kino y una de Playa Zarahembla. Los análisis morfológicos y moleculares, indicaron que tres aislamientos pertenecen a la especie *T. harzianum* (TRK, TSMC y TC), tres a *T. asperellum* (TMC, TSK, y TPZ), una a *T. rifaai* (TSKa) y una a *T. atroviride* (TM). Por la inhibición hacia los patógenos, la producción de sideróforos, quitinasas, compuestos volátiles y no volátiles, y por su rápido crecimiento y esporulación, los aislamientos: *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK y *T. asperellum* TPZ, son excelentes candidatos para usarlos en el control biológico de *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*. Se recomienda producirlos masivamente y evaluar su efectividad de *Trichoderma* en el proceso de producción de la empresa Berrymex.

INTRODUCCIÓN

El uso de monocultivos en los suelos agrícolas en los últimos años, ha resultado en la reducción de la biodiversidad de microorganismos en estos ecosistemas y en el aumento de problemas fitosanitarios, debido a la desaparición de los mecanismos naturales de control, esto aumenta el empleo masivo de agroquímicos para disminuir las pérdidas económicas producidas por estos organismos causantes de enfermedades (Segrelles *et al.*, 2005).

Las empresas agrícolas han incrementado su interés en reducir el uso de agroquímicos e implementar estrategias amigables con la ecología del suelo para disminuir los daños causados por hongos, bacterias, virus y nematodos, mediante el uso de agentes de control biológico (Pal y Gardener, 2006)

En el área del valle de San Quintín se ha encontrado graves problemas por hongos, bacterias, virus y nematodos en los diferentes cultivos de la región. La empresa Berrymex S de RL de CV, ubicada en esta zona y dedicada a la producción de fresas, frambuesas, zarzamora y arándano; actualmente cuenta con un total de 877 hectáreas cultivadas. En los últimos años se han observado problemas fitosanitarios, en especial con hongos como *Fusarium*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Macrophomina*, *Verticillium*, entre otros.

Fusarium y *Botrytis* son hongos capaces de provocar marchitez del área foliar, pudriciones de hoja, tallo, raíz y frutos, y en algunas ocasiones muerte de la planta, causando pérdidas económicas en los cultivos (Elad *et al.*, 2007; Leslie y Summerell, 2006). En la empresa Berrymex, estos hongos son causantes de pérdidas económicas de entre el 5 al 20% durante un ciclo de cultivo, es por esto que la empresa ha optado por recurrir al manejo de estos fitopatógenos por medio de agentes de control biológico

Trichoderma es un hongo de vida libre que se encuentra presente en el suelo y particularmente en la rizósfera de las plantas, se le considera agente de control

biológico (ACB), ya que actúa como antagonista en contra de hongos fitopatógenos como *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, ha sido utilizado en cerca del 90% de las aplicaciones en la agricultura para combatir estos últimos (Benítez *et al.*, 2004). Se le considera un buen ACB, ya que tiene la capacidad de controlar a los hongos patógenos por varios mecanismos como: competencia por nutrientes; promoción de crecimiento de la planta y sus mecanismos de defensa; modifica la rizósfera liberando siderofóros, antibióticos y enzimas; produce compuestos volátiles y no volátiles y tiene la capacidad de micoparasitar a los hongos fitopatógenos (Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.* 2008; Harman *et. al.*, 2004).

Se aislaron e identificaron 8 cepas de *Trichoderma* procedentes del valle de San Quintín, con capacidad de producir distintos compuestos como siderofóros, quitinasas, compuestos volátiles y no volátiles como mecanismos de biocontrol (Howell, 2003). Las pruebas de enfrentamiento por cultivo dual realizadas en esta investigación, arrojaron que todos los aislamientos fueron capaces de inhibir el crecimiento, *in vitro*, de los hongos *Fusarium* y *Botrytis*, lo que demuestra que estos aislados son potenciales agentes de control biológico y pueden ser capaces de disminuir las enfermedades relacionadas con estos hongos en los cultivos de fresa, frambuesa, arándano y zarzamora de la empresa BerryMex.

CAPITULO I: Planteamiento del problema

1.1 Planteamiento del problema

Las prácticas agrícolas intensivas, el monocultivo y el uso repetitivo de agroquímicos para controlar enfermedades, incrementan las poblaciones de microorganismos fitopatógenos resistentes, lo cual se ha reflejado en la merma de la productividad de los cultivos y las consecuentes pérdidas económicas. En los campos del área de San Quintín de la empresa Berrymex S de R.L. de C.V., desde el 2013 a la fecha, se han observado en los cultivos de frambuesa, fresa, arándano y zarzamora síntomas como clorosis, marchitez de las hojas, pudrición de tallo, raíz, frutos y hojas, y progresiva muerte de las plantas. Dichos síntomas se atribuyen principalmente a la presencia de hongos en el suelo y en la parte aérea de la planta, entre los que destacan el género *Fusarium*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Macrophomina* y *Verticillium*.

La empresa Berrymex tiene más de 350 hectáreas que se cultivan bajo el sistema de producción orgánica, donde el uso de agroquímicos está prohibido. Una de las alternativas a seguir es el uso de agentes de control biológico (ACB). Los ACB se producen por la propia empresa o se utilizan marcas comerciales. En experimentos previos realizados por el departamento de producción de la empresa, después de la aplicación de cepas comerciales de *Trichoderma* spp., se observó que no hubo reducción de síntomas característicos causados por *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp. Contar con una colección de cepas adaptadas a las condiciones ambientales del Valle de San Quintín, que estén mejor adaptadas a la región, puede mejorar el efecto biocontrolador de estos patógenos, además el costo de producción de *Trichoderma* reproducida en el laboratorio de biotecnología de la empresa Berrymex, es más bajo. Para ello, , en este trabajo se realizó el aislamiento, la caracterización y la evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp.

1.2 Justificación

Las pérdidas ocasionadas por enfermedades en plantas reducen los ingresos económicos de la empresa Berrymex y dado que el uso de agroquímicos no es del interés de la empresa, se ha optado por invertir y producir sus propios organismos de biocontrol. Por ello, en el 2013, se creó el laboratorio de biotecnología para reproducir hongos y bacterias capaces de controlar enfermedades.

Datos internos de la empresa estiman que en los campos de frambuesa, fresa, zarzamora y arándano, entre el 5 y el 20% de las plantas presentan síntomas de infección por los hongos *Fusarium* y *Botrytis*, resultando en pérdidas con un valor aproximado a los \$61,000,000 pesos por ciclo de producción, en las 877 hectáreas cultivadas. El costo del control biológico de las enfermedades, considerando el uso de productos comerciales, asciende hasta \$17, 000,000 pesos por el total de la superficie.

La empresa Berrymex cuenta con las instalaciones necesarias para la investigación y aplicación de la tecnología para la producción de *Trichoderma* sp., se ha estimado que llevando a cabo la producción interna del agente de control biológico, el costo total aproximado sería de \$3, 400,000 pesos; consecuencia de lo anterior se tendrá un ahorro del 80% del costo, equivalente a \$13, 600,000 pesos por ciclo de cultivo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General:

- Identificar cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. del valle de San Quintín, B. C., para controlar a los hongos fitopatógeno *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, en beneficio de la empresa Berrymex.

1.3.2 Objetivo Específico:

- Aislar y caracterizar molecular y morfológicamente cepas de *Trichoderma* spp. del Valle de San Quintín.
- Seleccionar cepas de *Trichoderma* spp. de acuerdo a su capacidad de biocontrol de *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, utilizando ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 El género *Fusarium* en fresas, frambuesas y zarzamoras

El género *Fusarium* pertenece a la división de los hongos Ascomicetos, estos se encuentran distribuidos en todas partes del mundo como patógenos, endófitos y saprofitos. Destaca su gran capacidad patogénica sobre las plantas, causando problemas desde germinación de la semilla hasta plantas vegetativamente maduras (Moretti, 2009).

Leslie y Summerell (2006) mencionan que existen más de 80 especies diferentes, la mayoría de estas se encuentran en la naturaleza como fitopatógenos, se estima que de los 101 cultivos económicamente importantes en el mundo, 81 presentan problemas graves con el género *Fusarium*. Este género causa una variada gama de enfermedades; algunos síntomas característicos de este hongo son pudrición de raíz y tallo, canchales, pudrición de frutos y semillas, y deterioro de las hojas.

Las fresas, frambuesas y zarzamoras son susceptibles al género *Fusarium*. Al respecto Nam *et al.* (2009) reportaron en Corea para el cultivo de fresa, la presencia de síntomas del marchitamiento en las hojas más viejas del follaje, secado, retraso en el crecimiento de las plantas y reducción de la producción de frutos; que eventualmente provocan la muerte de la planta, causando una pérdida del 30% en la producción del país. Henry *et al.* (2016), reportaron la aparición de esta enfermedad en California en cultivos de fresa causando pérdidas millonarias y poniendo en riesgo el abastecimiento del fruto en Estados Unidos.

En Estados Unidos (Powelson, 1956), observaron problemas de pudrición de raíz de la frambuesa, de donde aislaron satisfactoriamente hongos del género *Fusarium*. Daños similares fueron reportados en Lituania (Valiuškaitė, 2008) y en Rusia, donde se describió la enfermedad con un daño en el sistema vascular de la planta (Shternshis, 2015).

Fusarium también fue reportado para zarzamora en California y México por primera vez en 2011, con un grado de infección del 10% al 40% del cultivo, observándose un cuadro sintomático muy parecido al visto en las plantas de las fresas, diferenciado por la aparición de manchas color naranja en los tallos (Gordon *et al.*, 2016).

2.2 El género *Botrytis* en fresas, frambuesas y zarzamoras

Botrytis spp. es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, se puede encontrar desde zonas tropicales hasta zonas frías, provocando problemas en los cultivos. Es común en viveros, hortalizas, ornamentales, huertos y cultivos extensivos. Se caracteriza por provocar lesiones necróticas y pudrición en diferentes partes de la planta, así como pérdida de calidad en el transporte y almacenamiento de productos de la agricultura. Afecta cerca de 235 especies dicotiledóneas y solamente a una docena de plantas monocotiledóneas. Después de haber infectado y causado necrosis en los cultivos, poseen la capacidad de seguir sobreviviendo mediante estructuras de resistencia como clamidosporas y esclerocios o simplemente como saprofitos sobre el tejido muerto de las plantas (Elad *et al.*, 2007).

La aparición de raíces blandas, unido al colapso y el humedecimiento del parénquima, y la aparición de masas de conidios y micelios color gris en hojas, tallos y frutos, son algunos de los síntomas más comunes que se relacionan con esta enfermedad (Williamson *et al.*, 2007); por su parte Elad *et al.* (2007) mencionan que bajo condiciones de humedad alta, donde la lluvia y suelos con alta retención de agua están presentes, este hongo puede llegar a causar el 50% de pérdidas de los cultivos, antes y después de la cosecha, convirtiéndose en una amenaza económica para los agricultores. Los síntomas anteriormente descritos y por consecuencia los daños económicos asociados, afectan a cultivos de alto valor económico como vid, fresa, frambuesa y zarzamora (Tanovic *et al.*, 2009). Al respecto Li *et al.* (2012), encontró que la infección causada por el hongo en la parte aérea de la planta de

zarzamora, así mismo como en frutos antes y después de cosecha se observan como una gran cantidad de conidios y micelio color gris, siendo ahí de donde se aislaron cepas de *Botrytis*. En el cultivo de fresa, las pérdidas precosecha por pudrición de la fruta causada por *Botrytis*, fluctúan entre el 0.5% al 13%, aun con aplicaciones tradicionales de fungicidas y por encima del 35% en parcelas no tratadas (Merteley *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2007), reportaron la infección de las hojas y las flores de la fresa y posteriormente la pudrición del fruto cuando este empieza a madurar, siendo el principal factor de pérdidas del rendimiento en campo. Se conocen tres enfermedades importantes en la fresa causadas por *Botrytis*: Pudrición de hoja, flor y fruto en precosecha y poscosecha (Huang *et al.*, 2011). El hongo causa problemas en las plantas de frambuesa, presentándose principalmente como pudrición del fruto, pero también ataca las hojas jóvenes y maduras produciendo una lesión de color café con márgenes amarillos que se expande a las cañas del primer año o “primocañas” y posteriormente aparece como una lesión café pálido en el tallo principal (Williamson *et al.*, 2007). Por otra parte Dashwood y Fox (1988) observaron síntomas de infección de flores totalmente abiertas y frutos en plantas de frambuesa donde apareció el micelio gris característico de este hongo.

2.3 Control Biológico de enfermedades

El fundamento del control biológico es mitigar los efectos negativos de organismos patógenos, con el uso de organismos antagónicos, y compuestos naturalmente derivados de plantas y animales, con la finalidad de reducir o reemplazar compuestos sintéticos al integrar estrategias benévolas de protección del cultivo con el medio ambiente y con la finalidad de obtener mejores rendimientos (Narayanasamy, 2013).

Existen tres tipos de control biológico: clásico, aumentativo y por conservación. El control clásico se describe como la inoculación de especies no nativas de la zona para lograr un nivel de control; las que se puede mantener por un largo periodo. El

umentativo es la introducción de altos números de individuos periódicamente, con la finalidad de crear un número mayor de organismos benéficos, estos tienen que ser aplicados nuevamente en cada ciclo de cultivo. Por último el control por conservación es el que implementa medidas para incrementar la población de los organismos benéficos endógenos de la zona (Bale *et al.*, 2008).

El primer registro del uso de un control biológico fue en 1200 D. C donde los chinos usaron hormigas para el control de la chinche apestosa del litchi (*Tessarotoma papillosa*); desde ese entonces el uso del control biológico ha evolucionado. Actualmente se utilizan insectos parasitoides, depredadores, y microorganismo entomopatógenos y antagonistas para el control de plagas y enfermedades (Guédez *et al.*, 2008); incluso el control biológico se ha propagado a postcosecha de frutas y verduras, donde los problemas que los patógenos causan en esta etapa, pueden provocar pérdidas del 20% al 25% de los productos (Sharma *et al.*, 2009).

La depredación y la parasitación de insectos plaga en sus estadios larvales y adultos, son los mecanismos por los cuales los insectos depredadores y parasitoides ejercen su biocontrol (Badii & Abreu, 2006); en cambio, se han registrado varios medios por los cuales los microorganismos antagónicos ejercen biocontrol sobre agentes patógenos, tales como competencia por espacio y nutrientes, producción de antibióticos, parasitismo e inducción de resistencia en las plantas (Sharma *et al.*, 2009).

El incremento de la popularidad de la producción de cultivos orgánicos a nivel mundial, donde se evita el uso de químicos; ha hecho necesario el uso de agentes de control biológico en el manejo integrado de plagas y enfermedades, obteniendo resultados en incremento de los rendimientos de los cultivos y en la calidad del fruto bajo este sistema (Eilenberg & Hokkanen, 2006).

Se han utilizado agentes de control biológico para patógenos en la industria agrícola como: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* y *Trichoderma*

(Pal *et al.* 2006), destacando el uso de este último en un 90% de las aplicaciones (Benítez *et al.*, 2004).

2.4 El género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* pertenece a la división de los Ascomycetos en el reino fungi, son hongos cosmopolitas de suelos y prevalecen en madera y en materia vegetal en descomposición. Se pueden encontrar en cualquier hábitat geográfico, desde climas cálidos hasta fríos, esto se debe a su diversidad metabólica, su alta habilidad reproductiva y su capacidad competitiva en la naturaleza (Vijai *et al.*, 2014). Actualmente se utiliza como agente de control biológico en contra de fitopatógenos del suelo y aéreos (Brunner *et al.* 2005).

Se ha considerado a *Trichoderma* un excelente agente de control biológico debido a sus diferentes mecanismos. Son capaces de competir por nutrientes, promueven el crecimiento de la planta y sus mecanismos de defensa, modifican la rizósfera liberando siderofóros, antibióticos y enzimas, producen más de 100 compuestos volátiles y no volátiles ya identificados y micoparasitan a hongos fitopatógenos (Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.* 2008). *Trichoderma* ha sido reportado como antagonista de hongos patógenos como: *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* causantes de pérdidas económicas en muchos cultivos (Benítez *et al.*, 2004).

Carvalho *et al.* (2014) demostraron por medio de un experimento, donde utilizaban una suspensión de conidios de cinco especies diferentes de *Trichoderma* en el tratamiento a semilla de frijol, obteniendo una reducción en un 40 al 31 % en la infección y muerte por *Fusarium*. Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), aislaron el patógeno *Fusarium* del tejido de plantas de tomate enfermas, realizando ensayos *in vitro*, *Trichoderma* inhibió en un 53% el crecimiento del patógeno, y en plantas previamente infectadas, se presentó una inhibición del 75 al 85% del patógeno. Al respecto González-Cárdenas *et al.* (2005) observaron biocontrol por parte de *Trichoderma* sobre *Fusarium*, inoculando plantas de mango, permitiendo el

desarrollo de la planta sin presentar síntomas por la enfermedad. Así también Michel-Aceves *et al.* (2008) y Gawade *et al.* (2012), en estudios similares demostraron que en ensayos in vitro, se obtuvo una inhibición de *Fusarium* por parte de *Trichoderma* en un 62.9% y 60.78%, respectivamente.

Se ha reportado el efecto antagonista de *Trichoderma* sobre *Botrytis*. Donde al respecto Brunner *et al.* (2005) utilizaron cepas de *Botrytis*, *Pythium* y *Rizhooctonia* para realizar un experimento de inhibición por *Trichoderma*, en el caso de *Botrytis* se evaluó la germinación de esporas inhibiendo un 61% la germinación de estas; para *Pythium* y *Rizhooctonia* se observó que a los siete días de inoculación en cajas Petri, *Trichoderma* parasitó a ambas. Bogumil *et al.* (2013) probaron el biocontrol ejercido por 52 cepas de *Trichoderma* en contra de *Botrytis*, después de seis días de incubación presentaron de un 78 a 45% de inhibición, reportando también la producción de quitinasas, sideróforos y ácido indole-3-acético por parte del hongo benéfico. De manera similar Cheng *et al.* (2012) observaron la micoparasitación de *Tichoderma* sobre *Botrytis* al cuarto y quinto día de incubación y un porcentaje de inhibición del 75% en cajas petri.

2.5 Caracterización morfológica y genética

La morfología de los hongos ha sido estudiada como parte de su identificación, las características macro y micro morfológicas son partes determinantes para lograr una identificación acertada La textura, color, olor y las dimensiones, número y forma de cada órgano, son registrados para posteriores identificaciones (Watanabe, 2010).

Para algunos hongos filamentosos la identificación morfológica por medio de microscopio se vuelve limitada, debido a la necesidad de presencia de estructuras reproductivas y la dificultad de determinar la especie (Romanelli *et al.*, 2010). Una de las técnicas más efectivas para la identificación de hongos, es la amplificación y secuenciación de las regiones nucleares ITS (por sus siglas en inglés: *Internal Transcribed Spacer*). Los ITS pueden variar entre especies dentro de un género y

están ubicados entre las subunidades ribosomales 18S (homólogo de 16S usado para bacterias y algunos pocos usos para el reino fungi) y 28S, las dos separadas por la subunidad ribosomal 5.8S (Schoch *et al.*, 2012). Estas regiones pueden ser amplificadas con los oligonucleótidos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), ITS2 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), ITS3 (GCATCGATGAAGAACGCAGC), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGG) (White *et al.*, 1990), mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación da como resultado un fragmento con un tamaño aproximado de 400 a 700 pares de bases de longitud; aunque para algunos hongos la secuencia de estas regiones no es suficiente para la identificación a nivel especie (Romanelli *et al.*, 2010).

Por otro lado, la secuenciación del gen factor de elongación 1-alpha (EF-1 α) es la herramienta más usada para caracterizar los hongos a un alto nivel taxonómico, ya que son genes altamente conservados, estas zonas pueden ser amplificadas con los oligonucleótidos EF-1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'), EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'), EF-11 (5'-GTGGGGCATTACCCCGCC-3'), EF-21 (5'-GAGTGGCGGGGTAAATGCC-3') y EF-22 (5'-AGGAACCCTTACCGAGCTC-3'), mediante la técnica de PCR (O'Donnell *et al.*, 1998). Esta región es muy usada para el género *Fusarium*, el cual cuenta con una extensa base de datos de este gen, para identificación de la mayoría de las especies (Tkacz y Lange, 2004).

Kumar *et al.* (2012), Martínez *et al.* (2013) y Bogumil *et al.* (2013) han utilizado las técnicas antes mencionadas para la identificación del género y especie del hongo *Trichoderma*. Shahnazi *et al.* (2012) identificaron al género *Fusarium* por medio de la secuenciación de la región ITS y su morfología, por su parte Leslie y Summerell (2006) reportaron la traducción del factor de elongación 1-alpha para encontrar relación y/o diferencias entre especies de este género. Elad *et al.* (2007) mencionan la identificación de género y especie de *Botrytis*, por medio de una secuenciación de la región ITS y por su análisis morfológico; de igual manera Tanovic *et al.* (2014) usaron estos métodos de identificación para el fitopatógeno.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del sitio de estudio

Berrymex S de RL de CV, es una empresa agrícola dedicada a la producción de frutillas (fresa, frambuesa, arándano y zarzamora) con un total de 900 hectáreas en producción, destacando la fresa con 325 hectáreas, la frambuesa con 312 hectáreas, el arándano con 208 hectáreas y la zarzamora con 31 hectáreas de área cultivada. Actualmente se manejan cultivos bajo sistemas de producción convencional y orgánica; ésta última de alto interés económico por el valor en el mercado. En los picos más altos de producción la empresa emplea a más de 4,000 jornaleros y personal técnico para la producción de estos cultivos.

La empresa Berrymex se encuentra ubicada en el Valle de San Quintín, municipio de Ensenada (Figura 1). Las coordenadas de la ubicación son latitud 30°33'37" N, longitud 115°56'33" O y altitud de 28 msnm.

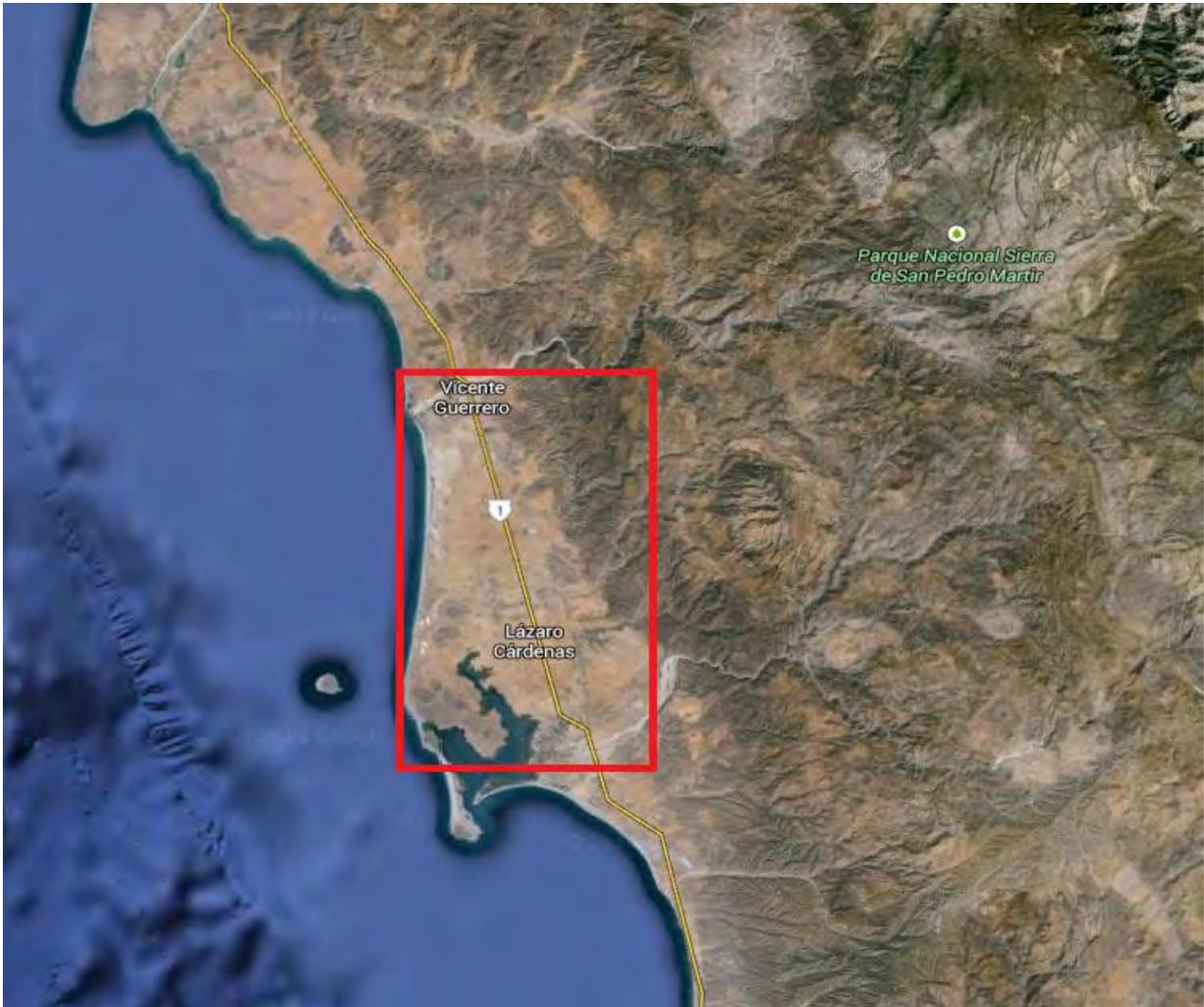


Figura 1. Ubicación del Valle de San Quintín, visto a 10 km. Fuente: Google Maps, 2014.

3.2 Aislamiento de patógenos y agentes de control biológico

3.2.1 Aislamiento del patógeno *Fusarium* spp.

Para el aislamiento de este hongo, se recolectaron plantas de frambuesa orgánica infectadas. Se tomaron muestras de plantas con síntomas de la enfermedad de marchitez por *Fusarium* y se trasladaron al laboratorio de fitopatología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California. Se realizaron cortes transversales en los tallos de las plantas donde se

presentaban síntomas de pudrición, posteriormente se hicieron cuatro rodajas de un centímetro de ancho por planta, se sumergieron en alcohol al 96%, se flamearon durante cinco segundos y se cortaron trozos más pequeños del borde de tejido necrosado. Cuatro de estos cortes, se colocaron en cajas Petri con agar PDA suplementado con 25mg/ml de cloranfenicol para evitar el desarrollo de bacterias.

3.2.2 Aislamiento del patógeno *Botrytis* spp.

En el caso de *Botrytis*, se recolectaron frutillas de zarzamora previamente cosechadas en los campos de Berrymex, posteriormente se incubaron bajo condiciones de refrigeración convencional a 4°C constante. Al aparecer micelio color gris característico de este patógeno, se utilizó un palillo de dientes de madera previamente esterilizado, se extrajo cuidadosamente micelio y conidios del fruto, para posteriormente colocar sobre una caja Petri con Caldo de Dextrosa y Papa (PDB) suplementado con 25mg/ml de cloranfenicol.

3.2.3 *Trichoderma* spp.

Las cepas se obtuvieron mediante la instalación de trampas de arroz en campo siguiendo la metodología descrita previamente (Pardo, 2014) con modificaciones como sigue. Las trampas se prepararon colocando 10 g de arroz dentro de frascos de vidrio de un litro, se agregó 20 ml de agua purificada, se colocó una tapadera de tela cubierta por aluminio, posteriormente se esterilizó en la autoclave y se dejó enfriar, para colocarse sin la tapa de aluminio enterrada en el suelo.

Para evitar aislar cepas de productos comerciales las trampas fueron instaladas lejos de los campos de producción agrícola. Se concentraron principalmente en tres zonas del valle de San Quintín, en los lugares que se muestran en la Figura 2. Se estimó un radio de dos kilómetros de distancia de cualquier campo agrícola para comenzar a colocar las trampas.

En total, se colocaron 90 trampas de arroz distribuidas en las zonas antes mencionadas, se instalaron en la base de arbustos y árboles nativos de la zona, a 25 cm del tallo principal y a 10 cm de profundidad, manteniéndose durante 15 días.

Posteriormente se recolectaron las muestras, se envolvieron con film de plástico para evitar la contaminación en el traslado. En el laboratorio se observaron los crecimientos bajo un microscopio y se aislaron los microorganismos que presentaran morfología similar al de *Trichoderma* descrita por Watanabe (2010). Las cepas putativas se colocaron en cajas Petri con PDA suplementado con 25 mg/ml de cloranfenicol, para lo cual se utilizaron palillos de madera previamente esterilizados. Al finalizar la siembra, las cajas Petri se colocaron en la incubadora durante cinco días a 28 °C.



Figura 2. Ubicación de las zonas donde se instalaron las trampas en el Valle de San Quintín, visto a 2 km. Fuente: Google Maps, 2017.

3.3 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las cepas se realizó por medio de microscopía óptica, en el laboratorio de fitopatología microbiología del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada), mediante un microscopio invertido Carl Zeiss. Las muestras se obtuvieron de un cultivo puro

sembrado sobre agar al 15% en agua, incubado durante 5 días a 28°C. Para las observaciones se cortó un bloque de agar de la caja que contenía el hongo. La identificación de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Botrytis* se realizó con base a sus características morfológicas, comparándolas con las reportadas por Watanabe (2010), Leslie y Summerell (2006) y Elad et al. (2007), respectivamente.

3.4 Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó por medio de la extracción de ADN genómico de un cultivo incubado a 28°C por cinco días en Caldo de Dextrosa y Papa (PDB) de donde fue recuperado el micelio que se colocó a -20 °C hasta congelarlo. Se tomó el micelio congelado y se utilizó el método de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) para la extracción del ADN genómico (Doyle y Doyle, 1990). Este método consiste en agregar 400 µl de buffer CTAB al 3% en un microtubo de 1.5 ml con 0.3 g de tejido, se maceró con un pistilo y se agregaron 400 µl más de buffer, luego se incubó a 60 °C por 30 minutos con agitaciones cada cinco minutos, después se añadieron 600 µl de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico con una relación 24:1 y temperatura de -20 °C, enseguida se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 ml, se le agregaron 10 µl de RNAsa a 1 µg.µl⁻¹, se homogeneizó la muestra y se incubó en baño maría a 37 °C por 30 minutos, luego se adicionaron 600 µl de la solución de cloroformo y alcohol isoamílico, y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, enseguida se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga, se adicionó isopropanol, se centrifugó a 13,000 rpm durante ocho minutos y se decantó el isopropanol, para finalizar se le agrega 500 µl de etanol al 70% a -20 °C y se centrifugó durante tres minutos a 13,000 rpm, hasta obtener la pastilla de ADN. La verificación de la presencia e integridad del ADN genómico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando 3 µl del ADN extraído, 0.5 µl de GelStar™ (Nucleic Acid Gel Stain 10,000X - Lonza) y 2 µl de búfer de carga. El gel de sometió a un voltaje de 70 mV por 40 minutos en Tris acetato- EDTA (TAE) 1X. La presencia de bandas por medio de una cámara de luz UV, reveló la presencia

del ADN contenido en el gel. El número de bases se midió colocando en un extremo del gel una escalera de 100 pares de bases. Una vez obtenido el ADN, se midió su concentración en un nanodrop y se ajustó a 30 ng/μl. Estas muestras se usaron para amplificar las regiones ITS (Internal transcript spacer) y factor de elongación 1-alfa (EF1a), usando los oligonucleótidos universales ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y ITS4 (White et al., 1990) (TCCTCCGCTTATTGATATGC), y EF1 (ATGGGTAA GGA(A/G)GACAAGAC) y EF2 (GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT) (O'Donnell *et al.*, 1998). La mezcla de reacción para realizar el PCR consistió en 2 μl de ADN genómico, 0.25 μl Taq polymerase (AccuPrime™ 5 U. μl⁻¹), 2.5 μl de búfer de la enzima 10X, 1 μl de cada oligonucleótido, 0.25 μl de una mezcla de dNTPs a 20mM, 1.5 μl de MgCl₂ a 25mM, 0.5 μl de BSA a 0.1μg.μl⁻¹ y aforando con agua destilada, hasta completar 25 μl de volumen. El PCR fue realizado en un termociclador marca BioRad®, bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por tres minutos, seguido de 35 ciclos de un minuto de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 60 °C y un minuto de extensión a 72°C, finalizando con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los fragmentos de DNA amplificados se purificaron utilizando PCR Clean columns (*EpochLifeScience*) y se cuantificaron con el uso del nanodrop. La calidad del mismo se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió arriba. Para secuenciar se usaron 10 ng que se prepararon de acuerdo a las indicaciones de *Clemson University Genome Institute* (CUGI). Los resultados obtenidos fueron comparados con la bases de datos de secuencias reportadas en el GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y con International Commission for the Taxonomy of Fungi (ICTF) (<http://www.fungaltaxonomy.org>).

3.5 Determinación de producción de enzimas quitinolíticas en *Trichoderma*

La evaluación de producción de quitinasas se llevó a cabo por el método de colorimetría mediante la producción de N-acetil-D-glucosamina (NAG) liberada por la acción hidrolítica de la quitinasa (Agrawal y Kotasthane, 2012). Se preparó quitina coloidal por el método señalado por Kamala y Devi (2012), y se resguardo a 4 °C, posteriormente se preparó un medio que contenía 4.5 g de quitina coloidal, 0.3 g sulfato de magnesio, 3.0 g sulfato de amonio, 2.0 g fosfato de potasio dibásico, 1.0 g ácido cítrico monohidratado, 15 g agar, 0.15 g purpura de bromocresol y 200 µl de tween-80. El pH se ajustó a 4.7 y se esterilizó a 121 °C por 15 min.

Las diferentes cepas de *Trichoderma* se incubaron por cinco días a 28°C en PDA; de estos cultivos, se obtuvieron discos de micelio de cinco milímetros. Los discos se colocaron sobre el medio de detección de quitinasas y se incubaron durante cinco días a 28 °C. Después de la etapa de incubación se observaron las cajas Petri en busca de cambio de coloración de amarillo a purpura y se evaluó la intensidad de la zona coloreada (Padey, 2014). El experimento se realizó por triplicado.

3.6 Determinación de producción de sideróforos en *Trichoderma*.

La evaluación de la producción de sideróforos se realizó por medio del ensayo de Cromo Azurol S (Schwyn y Neilands, 1987), el cual determina la producción de estos compuestos por medio de colorimetría. El agar azul fue vertido sobre cajas Petri, posteriormente se colocó en el centro de esta un disco de micelio del hongo previamente incubado por cinco días a 28 °C en PDA. Las cajas fueron incubadas a 28 °C por cinco días. Al término del periodo de incubación se observaron para evaluar, mediante el cambio de color en el agar de un azul intenso a rojo magenta la presencia de sideróforos; se documentó la intensidad del cambio de color y el diámetro a ese momento (Machuca y Milagres, 2003). El experimento se realizó por triplicado.

3.7 Inhibición de crecimiento por el método de cultivos duales

Se evaluó la capacidad de inhibición de crecimiento de las diferentes cepas de *Trichoderma spp.*, contra las cepas *Fusarium spp.* y las cepas *Botrytis spp.*, por el método de cultivo dual descrito por Siameto (2010). Se tomaron discos de micelio de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Botrytis* de cajas Petri con PDA incubados por cinco días a 28 °C. Los discos de las diferentes cepas de *Trichoderma* y de los fitopatógenos fueron colocados en los extremos opuestos de una caja Petri con PDA, con todas las combinaciones posibles de las cepas de *Trichoderma* con los dos patógenos. Se utilizaron controles tanto del hongo antagonista como del fitopatógeno; todas las combinaciones se hicieron por triplicado. Después cinco días a 28 °C, las interacciones de las colonias fueron observadas y se midieron como porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium* y *Botrytis*, siguiendo la siguiente fórmula utilizada por Jeyaseelan *et al.* (2012):

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde R1 es el crecimiento radial del patógeno hacia el lado opuesto de la caja control y R2 es el crecimiento radial del patógeno hacia el lado opuesto de la caja con *Trichoderma* presente.

3.8 Compuestos orgánicos volátiles

Se evaluó la presencia de compuestos volátiles producidos por las diferentes cepas de *Trichoderma* siguiendo el protocolo con modificaciones de Raut (2014). Se utilizaron cultivos de los hongos crecidos por tres días en medio PDA para obtener discos de micelio de 3 mm de diámetro. Los discos se inocularon en medio PDA, se removieron las tapas, y se colocan una sobre la otra, quedando expuestos entre ellos ambos microorganismos, en la parte superior el fitopatógeno y en la inferior el antagonista; las cajas se unieron con cinta adhesiva (cinta de aislar) para evitar el escape de cualquier compuesto volátil. La evaluación se realizó midiendo el crecimiento longitudinal de las colonias cada 24 horas, hasta que el control del fitopatógeno cubrió la caja por completo. Se colocaron controles, tanto de

Trichoderma como de los fitopatógenos, usando de fondo una caja Petri solamente con PDA como tapadera. El ensayo se realizó por triplicado.

3.9 Compuestos orgánicos no volátiles.

Para determinar la producción de compuestos orgánicos no volátiles se utilizó la metodología mencionada por Khalili (2012), donde se colocó un círculo de celofán esterilizado que cubría toda la superficie del PDA de la caja petri; y se colocó un disco de micelio de *Trichoderma* incubándose durante 72 horas a 28 °C. Después del tiempo de incubación se retiró el celofán con el crecimiento de *Trichoderma*, posteriormente se inoculó la caja Petri con un disco de micelio de los fitopatógenos y se incubó por 72 horas a 28 °C. En el caso de los controles, solo se utilizaron los hongos fitopatógenos sobre las cajas de PDA donde previamente se había retirado el disco de celofán sin crecimiento de *Trichoderma*. El experimento se realizó por triplicado y con dos controles.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Aislamiento e identificación de cepas

4.1.1.1 Aislamientos de *Fusarium oxysporum*

Las cepas se aislaron de tallos de frambuesas enfermas provenientes de los campos de Berrymex. Se obtuvieron dos cepas nombradas FFOCR por *Fusarium* Frambuesa Orgánica variedad Carmina rancho Rodríguez y FFAC por frambuesa *Fusarium* Frambuesa variedad. La cepa FFOCR se caracterizó por un crecimiento de micelio hialino y aéreo, en cambio la cepa FFAC, produjo micelio hialino y plano. Ambas cepas se tornaron de un color purpura a los cinco días de incubación y en las dos se observaron macroconidios de diferentes tamaños, septados y curvados en forma de banano y microconidios redondos y ovalados característicos del género *Fusarium* (Figura 3). La determinación de la especie se determinó mediante análisis molecular (Cuadro 1).

4.1.1.2 Aislamientos de *Botrytis cinerea*

Se obtuvieron dos cepas nombradas BFOC por *Botrytis* Frambuesa Orgánica variedad Carmina y BZC-B por *Botrytis* Zarzamora Convencional rancho Burns. La cepa BFOC se obtuvo de tejido de tallo enfermo de plantas de frambuesa, mientras que la cepa BZC-B se aisló de fruto de zarzamora; ambas cepas mostraron micelio grisáceo, algodónoso y ramificado (Figura 3), las hifas mostraban septos, los conidióforos surgieron directamente del micelio, mostrando forma subglobosa al igual que los conidios, también se observó la formación de esclerocios. La especie se determinó mediante análisis molecular (Cuadro 1).

Cuadro 1. Identificación de aislamientos de las especies de *Fusarium* y *Botrytis* en el Valle de San Quintín B. C.

Clave	Origen	Género	Especie
FFOCR	Tallo de frambuesa	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
FFAC	Tallode frambuesa	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
BFOC	Tallo de frambuesa	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>
BZC-B	Fruto de zarzamora	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>

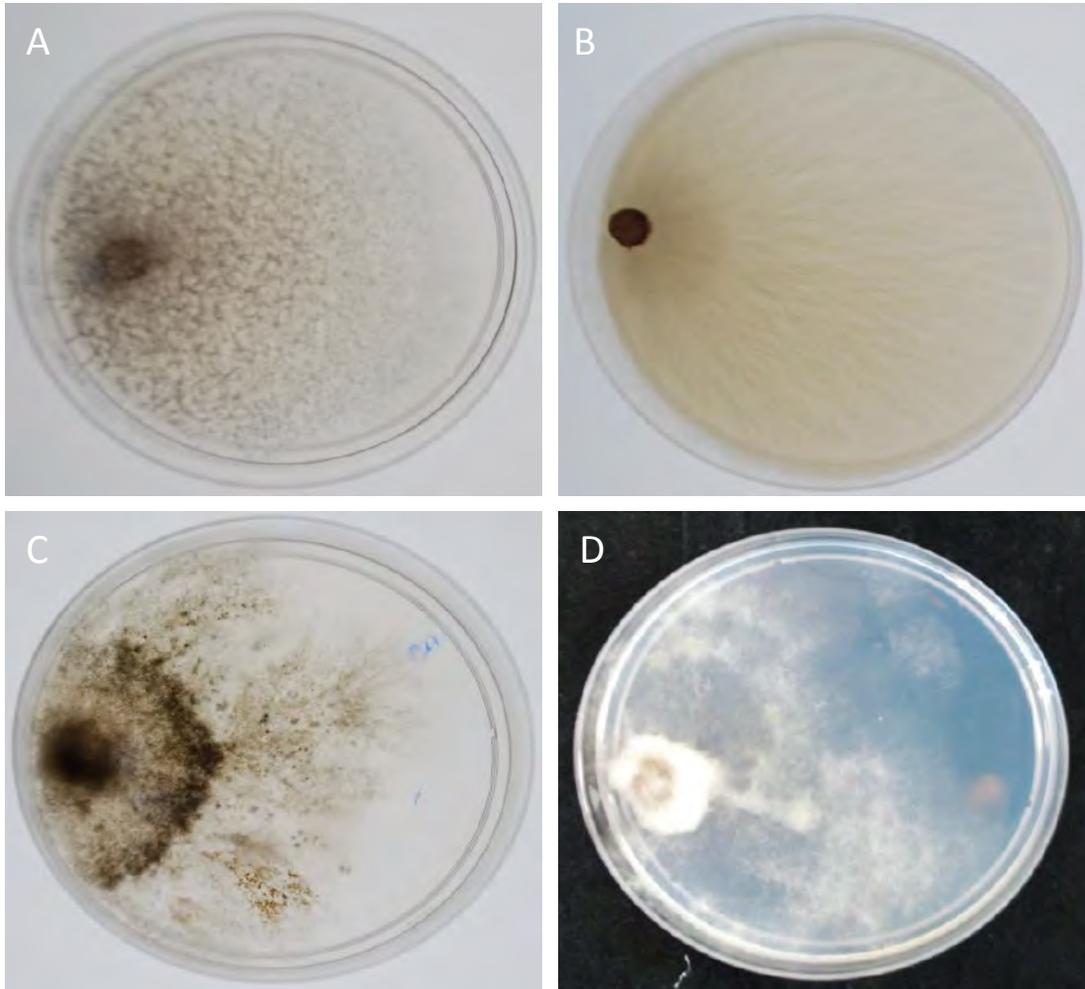


Figura 3 Crecimiento en medio de PDA de los patógenos *Fusarium oxysporum* A. FFOCR; B. FFAC y *Botrytis cinerea*; C. BFOC; D. BZC-B. aislados de los campos de Berrymex.

4.1.1.3 Aislamientos de *Trichoderma*

A partir de las trampas de arroz colocadas en zonas no disturbadas por la actividad agrícola, se obtuvieron ocho cepas designadas como TRK, TMC, TSKa, TSK, TSMC, TPZ y TC, nombradas de acuerdo al rancho de donde fueron aisladas. El crecimiento de las cepas fue muy similar; al inicio presentaron un micelio hialino, algodónoso y después de tres días se tornaron de color verde. Las cepas cubrieron por completo la superficie del agar a los cinco días de inoculación, a excepción de

la cepa TM, la cual requirió siete días para cubrir por completo la caja Petri. Todas las cepas mostraron las siguientes características: conidióforos hialinos, erectos y ramificados soportando masas de esporas en el ápice de las fiálides, estas últimas cortas y gruesas, la forma de los conidios fue ovalada, globosa y subglobosa de color verde oscuro (Figura 4), solamente se observó producción de clamidoesporas terminales e intermedias en TM (*T. atroviridae*), TC (*T. harzianum*), TSKa (*T. asperellum*) y TRK (*T. harzianum*) (Figura 5). Las características mencionadas anteriormente, corresponden al género *Trichoderma*. La determinación de la especie de cada una de ellas se obtuvo mediante análisis moleculares y el resultado del análisis se muestra en el Cuadro 2. En total se obtuvieron tres cepas de *T. harzianum* (TRK, TSMC y TC), tres de *T. asperellum* (TMC, TSK y TPZ), una de *T. rifaii* (TSKa) y una de *T. atroviride* (TM). De Rancho Kino y de las Montañas del rancho Chapala fue de donde se aislaron 3 especies diferentes.

Cuadro 2. Identificación de aislamientos del hongo *Trichoderma* del Valle de San Quintín, B.C

Clave	Lugar de colecta	Identificación molecular
TRK	Rancho Kino	<i>Trichoderma harzianum</i>
TSMC	Montañas del rancho Chapala	<i>Trichoderma harzianum</i>
TC	Montañas del rancho Chapala	<i>Trichoderma harzianum</i>
TMC	Montañas del rancho Chapala	<i>Trichoderma asperellum</i>
TSK	Rancho Kino	<i>Trichoderma asperellum</i>
TPZ	Playa Zarahembla	<i>Trichoderma asperellum</i>
TSKa	Rancho Kino	<i>Trichoderma rifaii</i>
TM	Montañas del rancho Chapala	<i>Trichoderma atroviride</i>

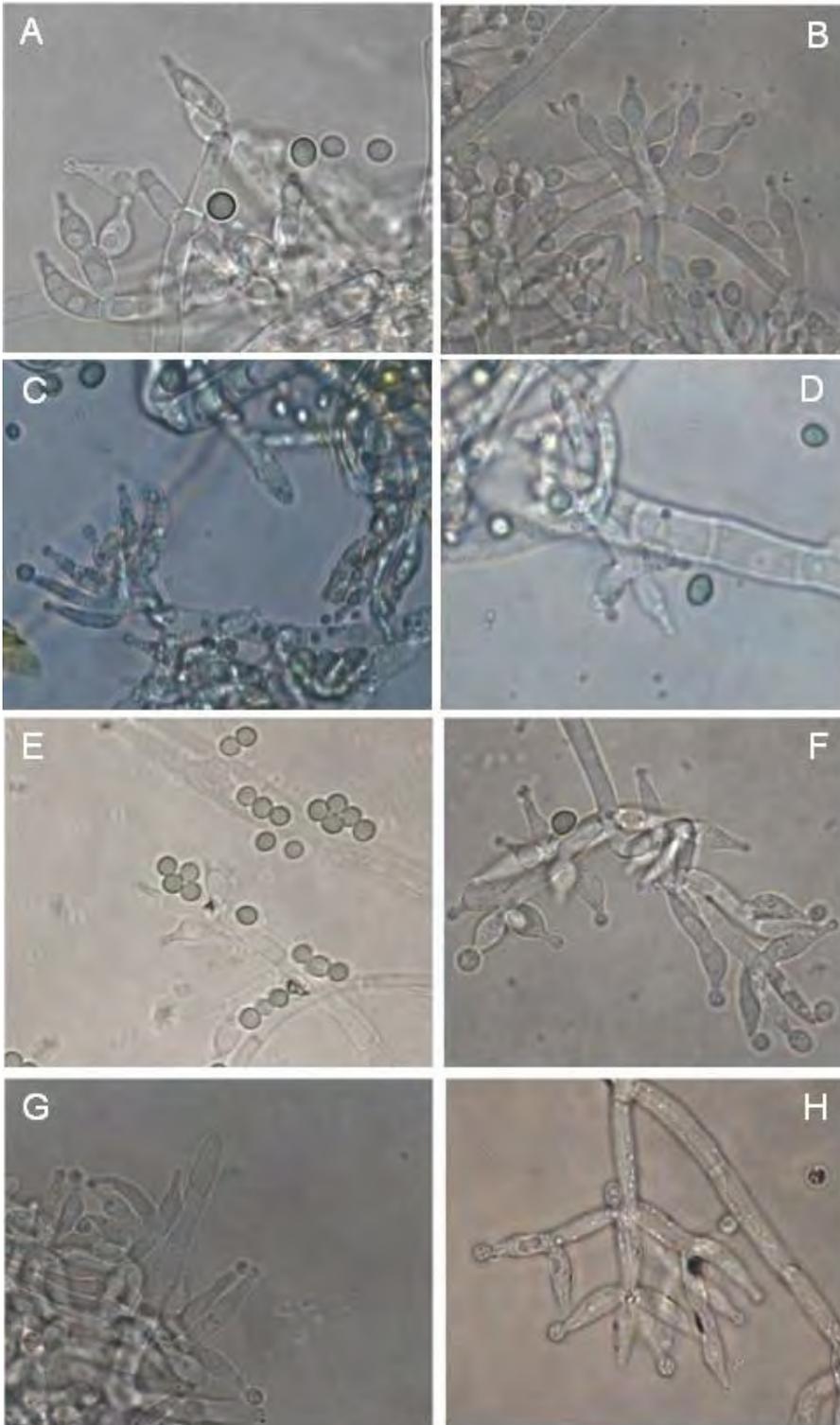


Figura 4. Cepas aisladas de *Trichoderma* vistas a 100X bajo microscopio. A. *T. harzianum* TRK; B. *T. asperellum* TMC; C. *T. rifaii* TSKa; D. *T. asperellum* TSK; E. *T. harzianum* TSMC; F. *T. asperellum* TPZ; G. *T. atroviride* TM; H. *T. harzianum* TC.

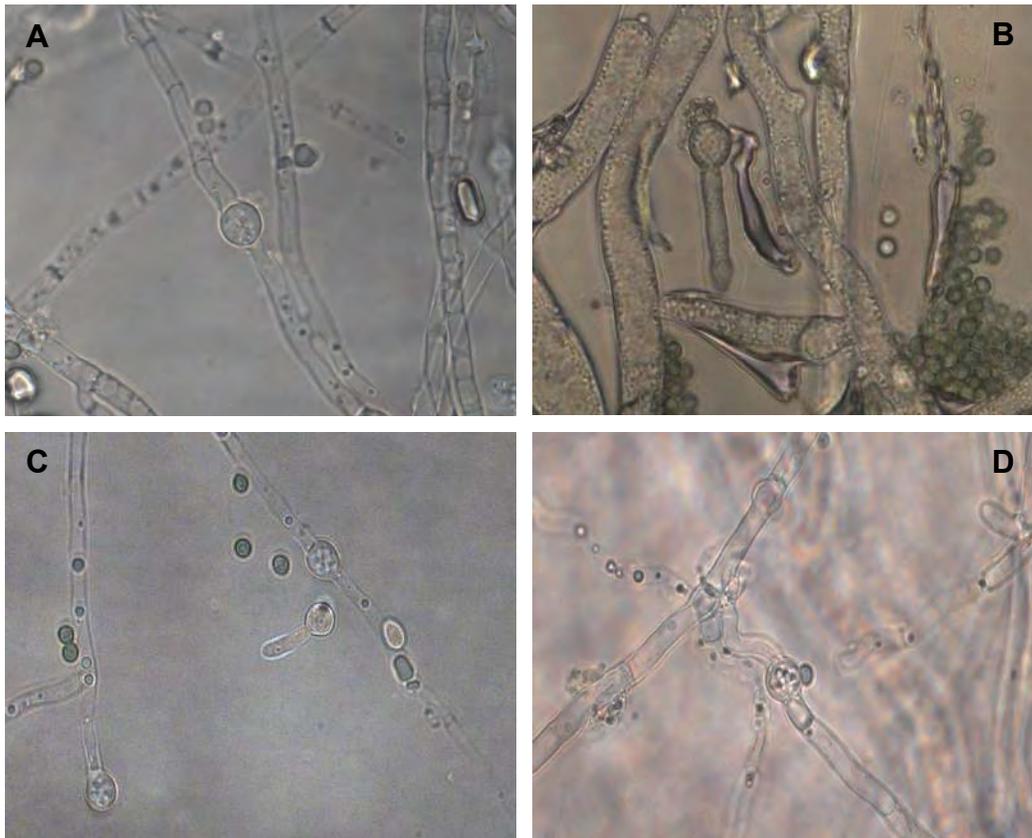


Figura 5. Clamidoesporas de *Trichoderma* vistas a 100X bajo microscopio. A. *T. atroviride* TM; B. *T. harzianum* TC *T. asperellum* TMC; C. *T. harzianum* TRK; D. *T. rifaii* TSKa.

4.1.2 Actividad de biocontrol de *Trichoderma* spp.

4.1.2.1 Competencia por cultivo dual en *Fusarium oxysporum*

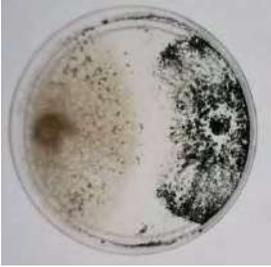
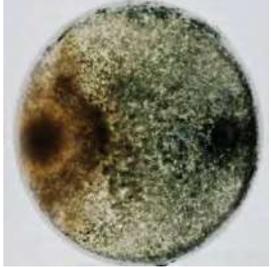
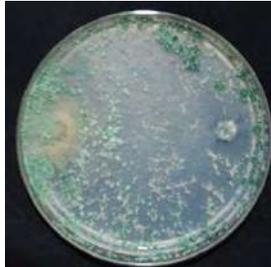
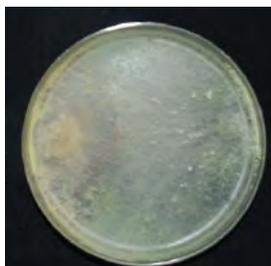
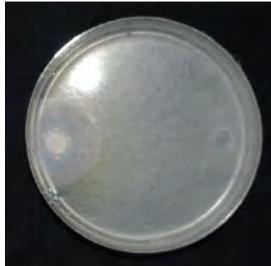
Los resultados del bioensayo en cultivo dual demostraron que todas las cepas de *Trichoderma* aisladas inhiben el crecimiento de *Fusarium* por encima del 50%. Se observó que la cepa de *T. atroviride* TM presentó el mejor desempeño, inhibiendo el crecimiento de FFOCR en un 79.04%, seguido de *T. asperellum* TPZ con un 76.66% y *T. harzianum* TRK con 68.57%. En el caso de FFAC, destacaron las

actividades inhibitorias de *T. asperellum* TSK, *T. asperellum* TMC, *T. atroviride* TM y *T. harzianum* TRK con 67.14%, 59.52% ,58.57% y 57.61% de inhibición, respectivamente. Se observó crecimiento sobre el patógeno por parte de todas las cepas de *Trichoderma* (Figura 5).

4.1.2.2 Competencia por cultivo dual en *Botrytis cinerea*

Todas las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de ambas cepas de *Botrytis* en al menos el 70%. Se registraron inhibiciones para la cepa BFOC del 85.64% por parte de la cepa *T. harzianum* TC, seguida de *T. harzianum* TSMC y *T. harzianum* TPZ con 85.12% y 80.51%. Para los enfrentamientos con la cepa BZC-B el mayor porcentaje de inhibición lo presentó *T. harzianum* TRK con 90%, seguida de *T. asperellum* TMC con 89.52% y *T. asperellum* TSK con 86.66%. Todas las cepas de *Trichoderma* mostraron capacidad de crecimiento sobre los patógenos evaluados (Figura 6).

Porcentaje de Inhibición (%)

Cepa	Porcentaje de Inhibición (%)			
	FFOCR	FFAC	BFOC	BZC-B
TRK	 68.57	 57.62	 75.90	 90.00
TMC	 66.19	 59.52	 78.97	 89.52
TSKa	 62.86	 57.62	 77.95	 80.48
TSK	 67.62	 67.14	 78.46	 86.67

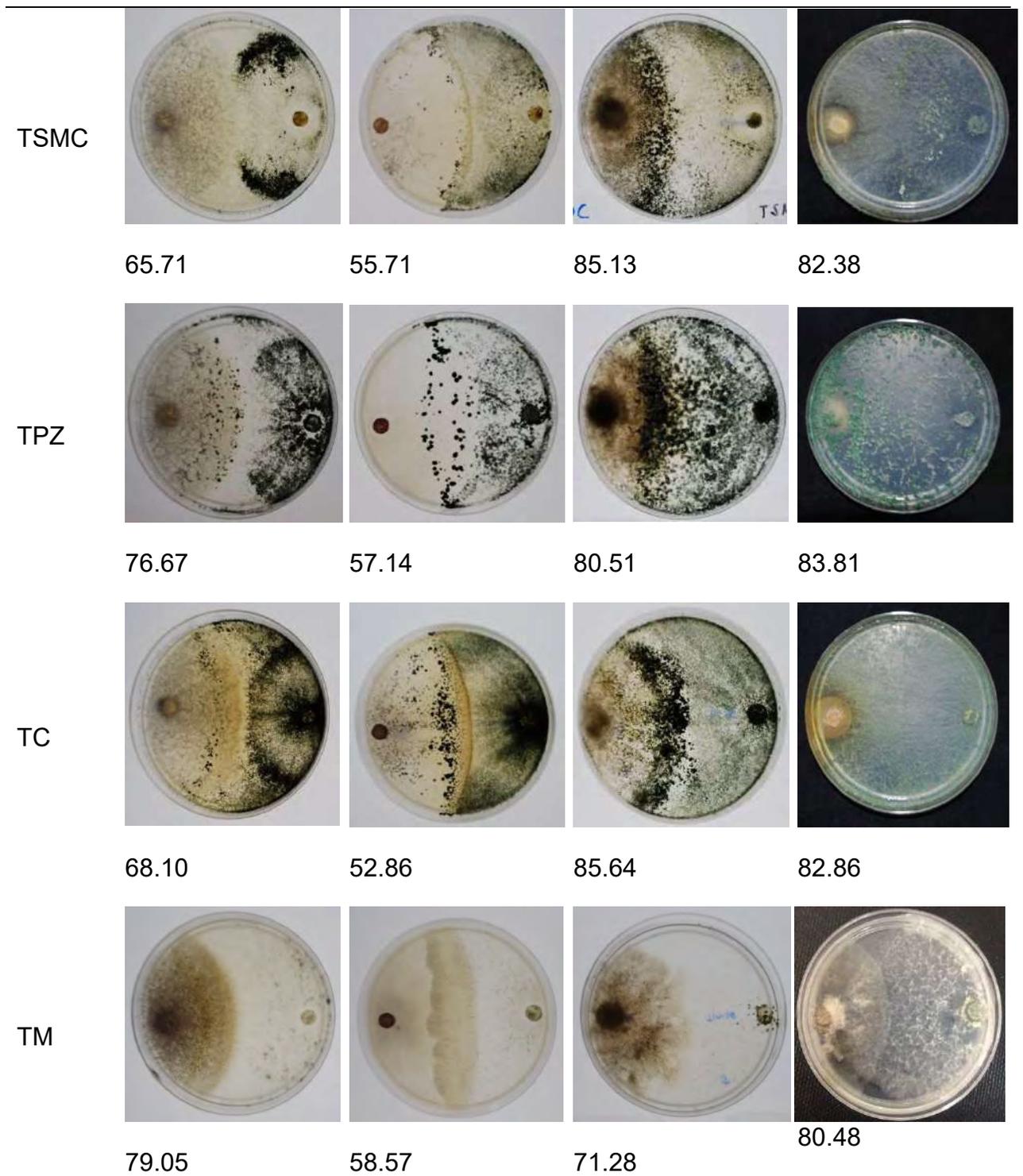


Figura 6. Actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* en contra de los hongos *Fusarium* y *Botrytis*.

4.1.3 Evaluación de la producción compuestos volátiles

Todos los aislamientos de *Trichoderma* produjeron compuestos volátiles (Cuadro 3). Las cepas *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK, *T. asperellum* TSMC, *T. harzianum* TC y *T. atroviride* TM presentaron la mayor inhibición del crecimiento de la cepa FFOCR (*Fusarium oxysporum*), la única cepa patógena evaluada (Figura 7).

Cuadro 3. Producción de compuestos volátiles de las cepas de *Trichoderma*, aisladas en el Valle de San Quintín, B.C.

Cepa	Especie	Producción de compuestos volátiles*
TMC	<i>T. asperellum</i>	++
TSK	<i>T. asperellum</i>	++
TSMC	<i>T. harzianum</i>	++
TC	<i>T. harzianum</i>	++
TM	<i>T. atroviride</i>	++
TSKa	<i>T. rifaii</i>	+
TPZ	<i>T. asperellum</i>	+
TRK	<i>T. harzianum</i>	+

*Indicadores de inhibición de crecimiento: (+) bajo, (++) medio

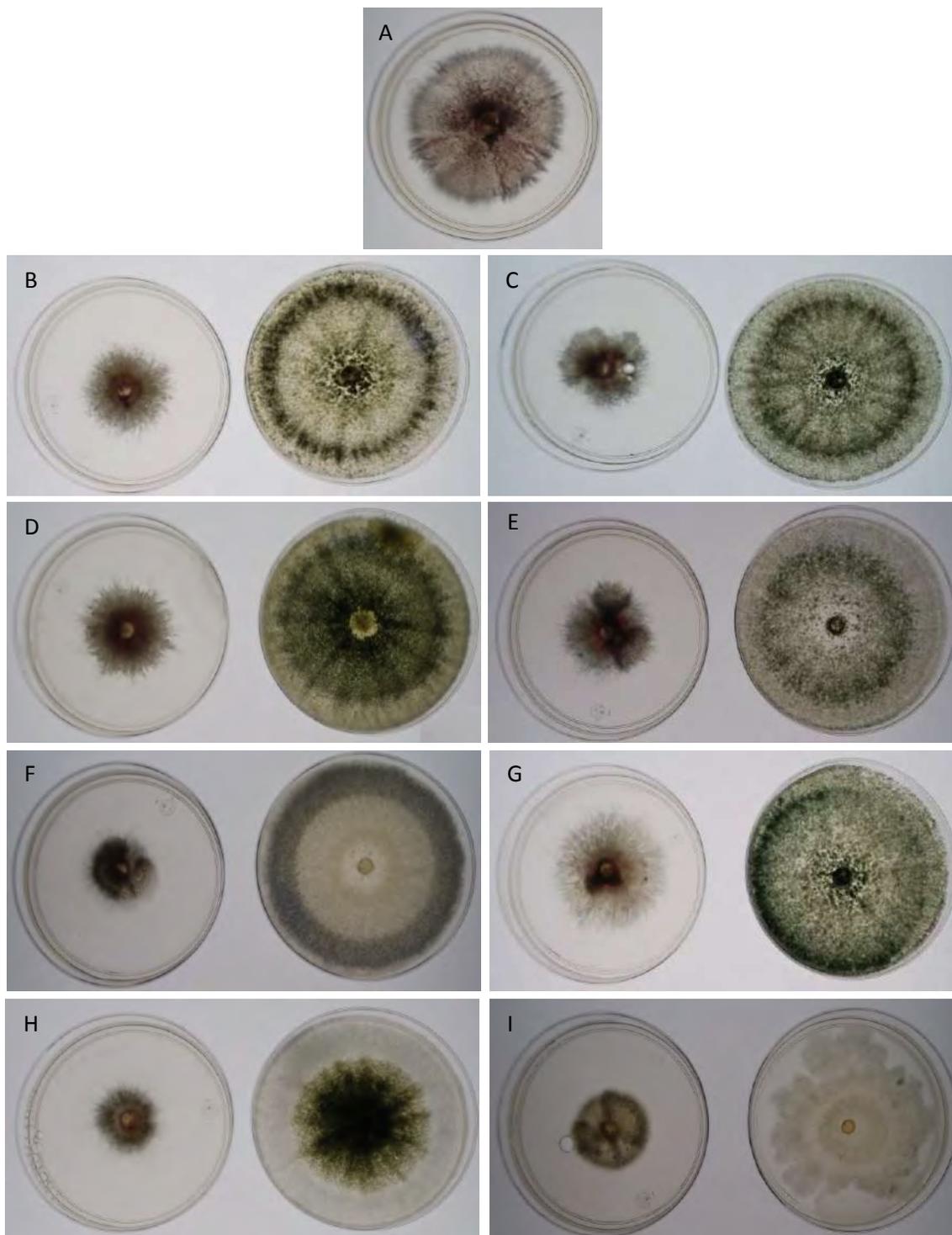


Figura 7. Ensayo de producción de compuestos volátiles de las cepas aisladas de *Trichoderma* y su efecto sobre *F. oxysporum* (FFOCR). A. Control; B. *T. harzianum* TRK; C. *T. asperellum* TMC; D. *T. rifaai* TSKa; E. *T. asperellum* TSK; F. *T. harzianum* TSMC; G. *T. asperellum* TPZ; H. *T. atroviride* TM; I. *T. harzianum* TC.

4.1.4 Producción de compuestos no volátiles

Las cepas *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK, *T. asperellum* TPZ Y *T. atroviride* TM, presentaron actividad positiva en la producción de compuestos no volátiles disminuyendo el crecimiento de la cepa patógena FFOCR (Figura 8); mientras que las cepas *T. rifaii* TSKa, *T. harzianum* TSMC y *T. harzianum* TC no presentaron efecto de inhibición (Cuadro 4.).

Cuadro 4. Producción de compuestos no volátiles de las cepas de *Trichoderma* aisladas en el Valle de San Quintín , B. C.

Cepa	Especie	Producción de compuestos no volátiles*
TRK	<i>T. harzianum</i>	+
TMC	<i>T. asperellum</i>	+
TSK	<i>T. asperellum</i>	+
TPZ	<i>T. asperellum</i>	+
TM	<i>T. atroviride</i>	+
TSKa	<i>T. rifaii</i>	-
TSMC	<i>T. harzianum</i>	-
TC	<i>T. harzianum</i>	-

*Indicadores de inhibición de crecimiento: (+) bajo, (++) medio

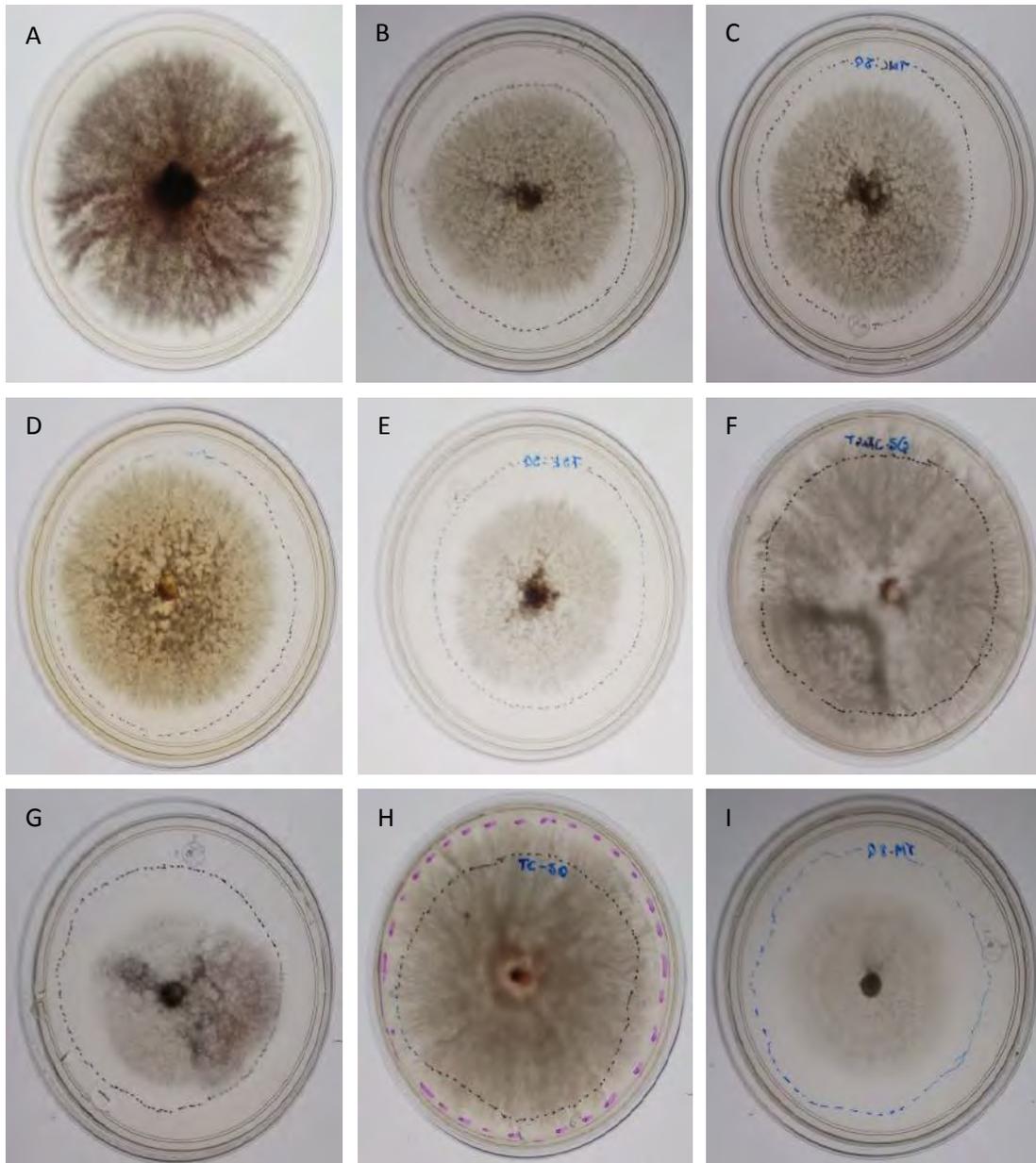


Figura 8. Ensayo de producción de compuestos no volátiles de las cepas aisladas de *Trichoderma* y su efecto sobre *F. oxysporum* (FFOCR). A. Control; B. *T. harzianum* TRK; C. *T. asperellum* TMC; D. *T. rifaai* TSKa; E. *T. asperellum* TSK; F. *T. harzianum* TSMC; G. *T. asperellum* TPZ; H. *T. atroviride* TM; I. *T. harzianum* TC.

4.1.5 Producción de quitinasas

Todos los aislamientos de *Trichoderma* presentaron actividad quitinolítica, destacando con mayor producción las cepas *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK, *T. harzianum* TSMC y *T. asperellum* TPZ (Cuadro 5); que fueron las que presentaron el mayor diámetro y coloración purpura en las cajas Petri (Figura 9).

Cuadro 5. Producción de quitinasas de las cepas de *Trichoderma* aisladas en el Valle de San Quintín B.C.

Cepa	Especie	Actividad de quitinasas
TRK	<i>T. harzianum</i>	+++
TMC	<i>T. asperellum</i>	+++
TSK	<i>T. asperellum</i>	+++
TPZ	<i>T. asperellum</i>	+++
TSMC	<i>T. harzianum</i>	+++
TSKa	<i>T. rifaii</i>	++
TC	<i>T. harzianum</i>	+
TM	<i>T. atroviride</i>	+

*Indicadores de inhibición de crecimiento: (+) bajo, (++) medio

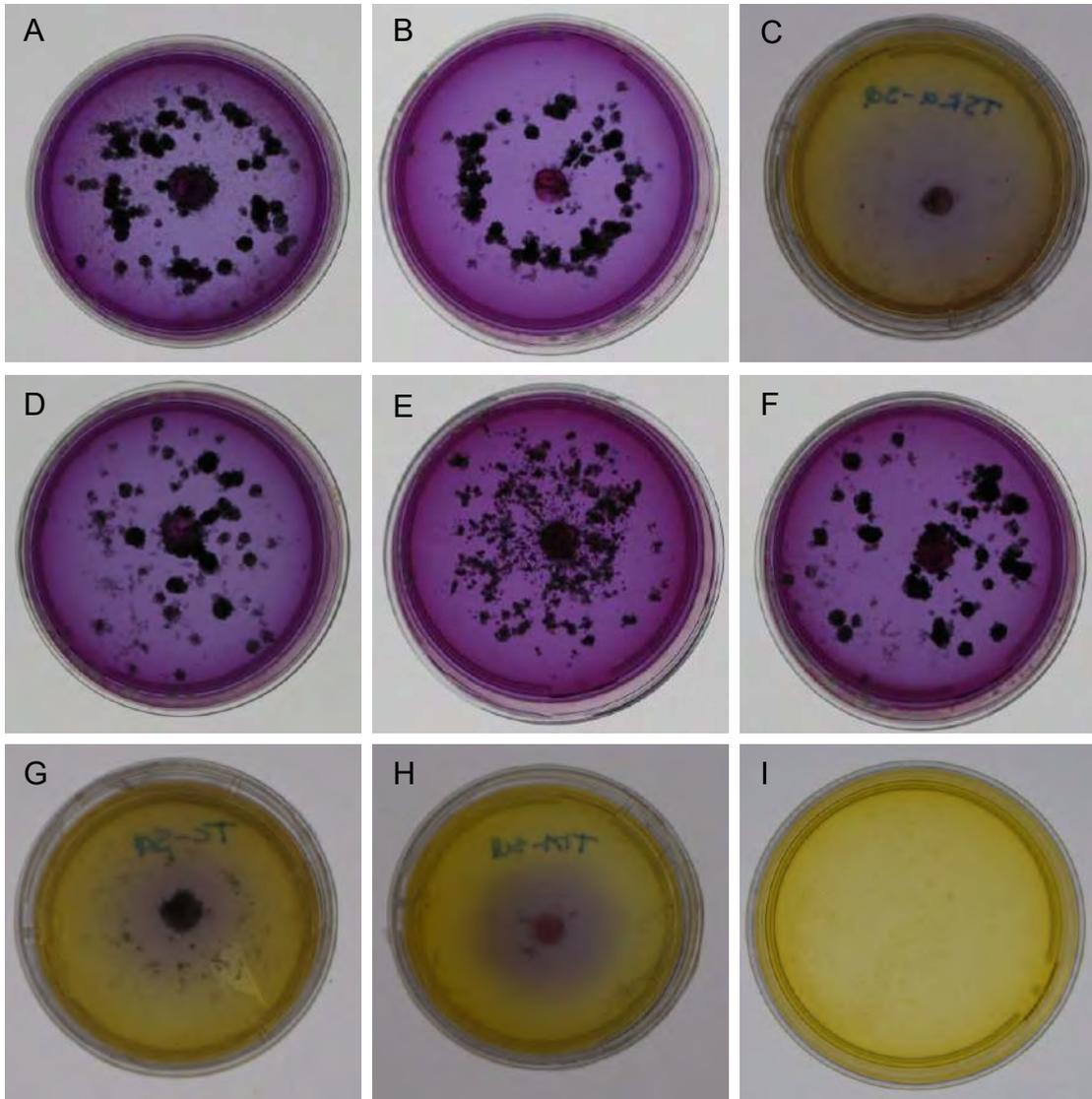


Figura 9. Ensayo de producción de quitinasas de las cepas aisladas de *Trichodema*. A. *T. harzianum* TRK; B. *T. asperellum* TMC; C. *T. rifaii* TSKa; D. *T. asperellum* TSK; E. *T. harzianum* TSMC; F. *T. asperellum* TPZ; G. *T. atroviride* TM; H. *T. harzianum* TC.; I. Control.

4.1.6 Producción de sideróforos.

Las cepas *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK, *T. asperellum* TSMC, TPZ y TM produjeron sideróforos tornando el azul del medio de cultivo a un rojo magenta (Figura 10). Las cepas TSKa y TC no manifestaron producción de estos compuestos (Cuadro 6)

Cuadro 6. Producción de sideróforos de cepas de *Trichoderma* aisladas en el Valle de San Quintín B.C.

Cepa	Especie	Actividad sideróforos*	de
TRK	<i>T. harzianum</i>	+	
TMC	<i>T. asperellum</i>	+	
TSK	<i>T. asperellum</i>	+	
TPZ	<i>T. asperellum</i>	+	
TSMC	<i>T. harzianum</i>	-	
TSKa	<i>T. rifaii</i>	-	
TC	<i>T. harzianum</i>	-	
TM	<i>T. atroviride</i>	-	

*Indicadores de inhibición de crecimiento: (+) positivo, (-) negativo

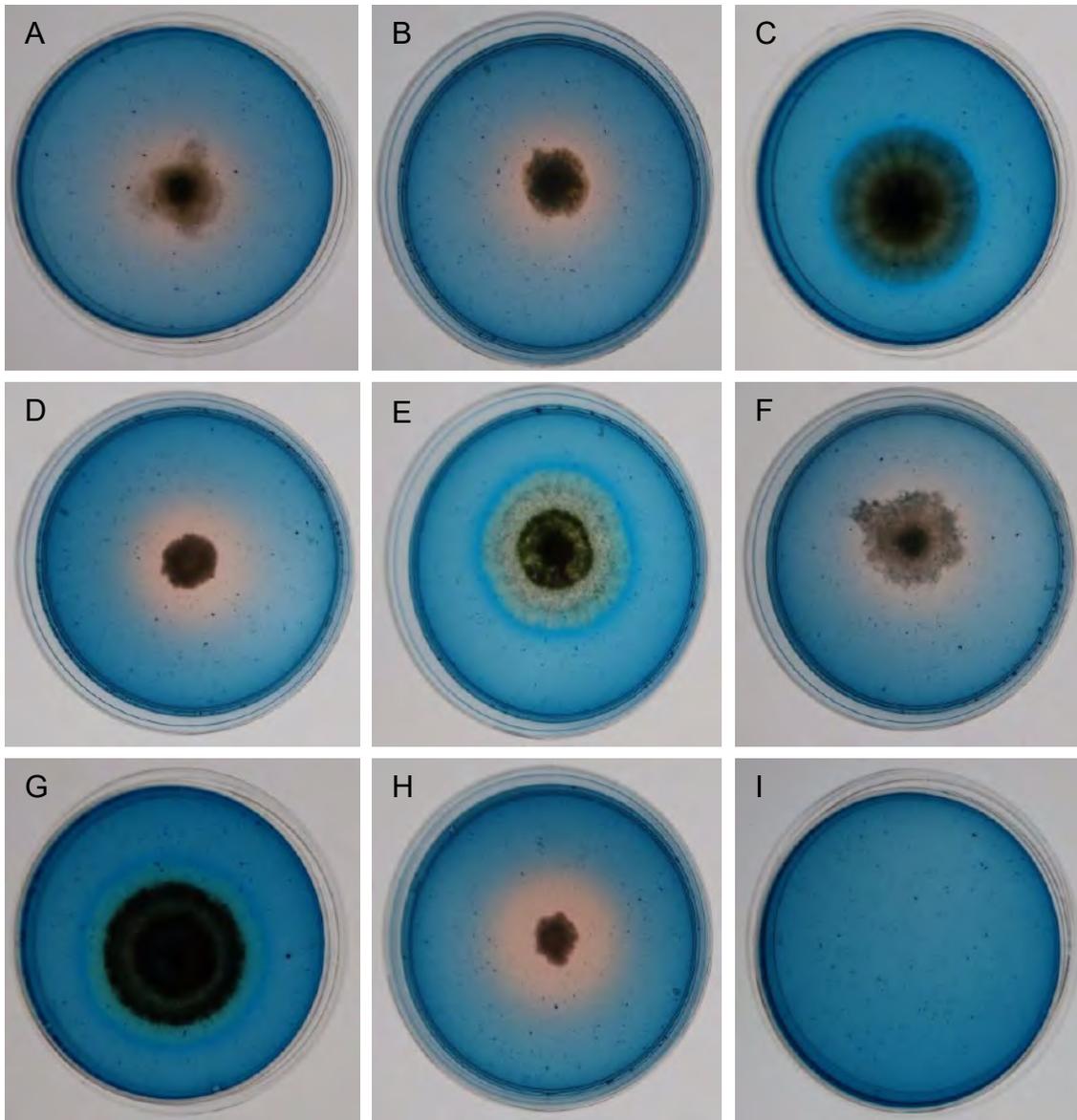


Figura 10. Ensayo de producción de sideróforos de las cepas aisladas de *Trichoderma*. A. *T. harzianum* TRK; B. *T. asperellum* TMC; C. *T. rifaai* TSKa; D. *T. asperellum* TSK; E. *T. harzianum* TSMC; F. *T. asperellum* TPZ; G. *T. atroviride* TM; H. *T. harzianum* TC.; I. Control.

4. 1.7. Resumen de resultados

El aislado *T. harzianum* TRK mostró el más alto porcentaje en inhibición, en comparación con todos los aislamientos hacia de *B. cinerea* BZC-B, asimismo

presentó inhibición de *F. oxysporum* FFOCR, *F. oxysporum* FFAC y *B. cinerea* BFOC, también tuvo compuestos volátiles y no volátiles, sideróforos y quitinasas.

La cepa de *T. asperellum* TSK mostró el mayor porcentaje de inhibición, de todos los aislamientos de *Trichoderma*, en contra de *F. oxysporum* FFAC, además fue capaz de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* FFOCR, *B. cinerea* BFOC y *B. cinerea* BZC-B, se observó presencia de los compuestos sideróforos, quitinasas y volátiles y no volátiles.

Las cepas *T. asperellum* TPZ y *T. asperellum* TMC presentaron inhibición de crecimiento de las cuatro cepas patógenas y también producción de compuestos volátiles y no volátiles, sideróforos y quitinasas.

La cepa de *T. atroviride* TM presentó la mayor inhibición, de todos los aislamientos de *Trichoderma*, en contra de la cepa de *F. oxysporum* FFOCR; inhibió también a las cepas *F. oxysporum* FFAC, *B. cinerea* BFOC y *B. cinerea* BZC-B; presentó producción de quitinasas y de compuestos volátiles y no volátiles, no se observó presencia de sideróforos. Su crecimiento y esporulación fue la más lenta de todas las cepas de este género; por lo tanto, no es el mejor candidato para realizar pruebas en campo y producirse masivamente.

El aislamiento *T. harzianum* TC mostró la mayor inhibición hacia el patógeno *B. cinerea* BFOC, el mayor porcentaje de todos los aislamientos, igualmente presentó inhibición de las cepas *F. oxysporum* FFOCR, *F. oxysporum* FFAC y *B. cinerea* BZC-B, no presentó producción de compuestos no volátiles y sideróforos, en cambio sí se observó la presencia de compuestos volátiles y de quitinasas.

El aislado *T. harzianum* TRK obtuvo el más alto porcentaje en inhibición, en comparación con todos los aislamiento, de *B. cinerea* BZC-B, asimismo presentó inhibición de *F. oxysporum* FFOCR, *F. oxysporum* FFAC y *B. cinerea* BFOC, también obtuvo presencia de compuestos volátiles y no volátiles, sideróforos y quitinasas.

Las cepas *T. harzianum* TSMC y *T. rufaii* TSKa no presentaron producción de sideróforos y de compuestos no volátiles, en cambio sí hubo presencia de quitinasas, y de compuestos volátiles. Ambas cepas inhibieron el crecimiento de los cuatro aislamientos de patógenos.

4.2 Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue aislar e identificar cepas autóctonas de *Trichoderma* del valle de San Quintín, capaces de controlar a los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp., hongos fitopatógenos de cultivos de gran importancia de la zona y causantes de pérdidas económicas de entre el 5 al 20% a las empresas productoras (Koike *et al.*, 2017; Elad *et al.*, 2007).

El género *Trichoderma* es cosmopolita de suelos, ya que se le ha encontrado desde climas cálidos a fríos y tiene la capacidad de alimentarse prácticamente de cualquier tipo de materia orgánica (Vijai *et al.*, 2014). Las ocho cepas aisladas se obtuvieron del suelo de la rizósfera de plantas nativas del área de San Quintín. Las características como su color, olor y morfología bajo el microscopio fueron determinantes para seleccionarlas de entre los hongos que crecieron en las trampas de arroz. El número de cepas aisladas fue reducido, comparado con las trampas colocadas, muy probablemente debido a la baja precipitación pluvial del valle de San Quintín, el cual es de 50 mm por año (Gobierno de B. C., 2017), considerando a esta zona como de clima muy árido (Arriaga *et al.*, 2000). La poca humedad encontrada en los suelos áridos es un factor limitante para todos los procesos biológicos en el suelo, lo cual afecta al desarrollo de los microorganismos y a sus sistemas enzimáticos (Paul, 2015).

Existen reportes previos sobre la infección del género *Fusarium* en plantas de frambuesa en diferentes países (Shternshis, 2015; Valiuškaitė, 2008), los síntomas observados en las plantas coinciden con los encontrados en los campos del valle de San Quintín. Las cepas aisladas fueron obtenidas de tejido vegetal de plantas enfermas de frambuesa para después comparar su morfología con las descripciones observadas por parte Leslie y Summerell (2006); lo que confirmó el género del hongo.

En cuanto a las cepas de *Botrytis*, las dos cepas fueron aisladas de distintas fuentes, una se obtuvo de tallos de frambuesas infectadas por el hongo (BFOC) y la segunda

se encontró sobre un fruto de zarzamora (BZC-B), lo cual concuerda con lo encontrado por Elad *et al.*, (2007), quienes mencionan que *Botrytis* es un hongo capaz de producir pudrición en cualquier parte de la planta. Al respecto, Williamson *et al.*, 2007 observaron que este hongo infecta los tallos de frambuesa, mientras que Li *et al.* (2012) lo encontraron colonizando frutos de zarzamora. La morfología se comparó con las observada por Khazaeli *et al.* (2010) el cuál describe la coloración gris característica del hongo y su morfología, lo que confirmó el género del hongo y se confirmó con el análisis de las secuencias obtenidas.

Las identificaciones moleculares de *Trichoderma* se realizaron por medio de la amplificación de las regiones ITS y EF-1 (Savitha y Sriram, 2015), con lo cual se confirmó la presencia de varias especies, tres pertenecientes a la especie *T. harzianum*, tres a *T. asperellum*, una a *T. rifaii* y una a *T. atroviride*. Las últimas dos cepas han sido reportadas como endófitas (Chaverri *et al.*, 2016; Toghueo *et al.*, 2016). Sin embargo, la especie *T. rifaii* solamente había sido reportada como endófito de hojas y tallos de árboles tropicales como *Theobroma cacao* y *Theobroma gileri*, en zonas neotropicales (Chaverri *et al.*, 2016). Las especies *T. harzianum* *T. atroviride* y *T. asperellum* ya han sido aisladas de suelo y/o material vegetal en descomposición en diferentes zonas geográficas (Toghueo *et al.*, 2016; Raut *et al.*, 2014; Kumar y Sharma, 2011). Para *Botrytis* se utilizó la amplificación de la región ITS (Behr *et al.*, 2013), lo que evidenció que las dos cepas aisladas pertenecían a la especie *B. cinerea*. La identidad de las especies de *Fusarium* se obtuvo amplificando la región EF-1 (Rahjoo *et al.*, 2008), encontrando que ambas cepas pertenecen a la especie *F. oxysporum*.

Se ha encontrado que *Trichoderma* posee una gran actividad antagónica en contra de los patógenos de plantas, atacándolos por diferentes mecanismos de biocontrol (Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.* 2008). En estudios previos, la técnica de cultivo dual para evaluar la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* contra los hongos fitopatógenos, destaca a las especies *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. harzianum* con mayor inhibición de *Fusarium* (Toghueo *et al.*, 2016; Vargas-Hoyos *et al.* 2015; Carvalho *et al.*, 2014) y *T. asperellum* y *T. harzianum* para *Botrytis*

(Guigón-López *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2012), estas especies ya han sido reportadas con anterioridad controlando estos patógenos. En nuestro caso, las cepas que presentaron mayor actividad antagónica fueron las pertenecientes a las especies *T. asperellum* y *T. harzianum*, en reportes anteriores se les ha observado obteniendo mejores resultados inhibiendo a patógenos, que otras especies del mismo género (Rojó *et al.* 2007; Castillo *et al.*, 2011; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013).

Todas las cepas de *Trichoderma* aisladas produjeron compuestos volátiles y fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium*, destacando las especies *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. harzianum*. Este mecanismo de inhibición y el mismo resultado lo observaron Raza *et al.* (2014) utilizando *T. harzianum* en contra de *Fusarium*, Raut *et al.* (2015) observaron el mismo comportamiento usando la especie *T. asperellum* y Toghueo *et al.* (2016) observaron que *T. atroviride* pudo inhibir el crecimiento del mismo patógeno.

La producción de compuestos no volátiles varió entre las cepas aisladas, solamente las cepas TRK (*T. harzianum*), TMC (*T. asperellum*), TSK (*T. asperellum*), TPZ (*T. asperellum*) y TM (*T. atroviride*) produjeron este tipo de compuestos y fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium*, estudios similares reportan este mismo efecto al inhibir el crecimiento del patógeno por parte del hongo benéfico (Raza *et al.*, 2011; Raut *et al.*, 2015; Toghueo *et al.*, 2016). Las cepas TSKa (*T. rifaï*), TSMC (*T. harzianum*) y TC (*T. harzianum*) no presentaron actividad de estos compuestos. Así, se evidencia que la actividad biocontroladora no está determinada por la especie, ya que esta habilidad de producir estos compuestos no está dictada por la especie y algunos aislamientos pueden carecer de esta capacidad (Dennis y Webster, 1971). Por ello, sigue siendo necesaria la evaluación individual de las cepas.

La capacidad de producir la enzima quitinasa se observó en todas las cepas aisladas. Esta enzima es importante ya que degrada las paredes celulares de los hongos patógenos y es usada para micoparasitar a otros hongos (Gupta *et al.*, 2014). Las cepas que reflejaron mayor actividad de esta enzima fueron TRK (*T.*

harzianum), TMC (*T. asperellum*), TSK (*T. asperellum*), TSMC (*T. harzianum*) y TPZ (*T. asperellum*), seguidas de las cepas TSKa (*T. rifaïi*) y TC (*T. harzianum*) presentando menor actividad de esta enzima. Michel-Aceves *et al.* (2005) y Vargas-Hoyos *et al.* (2015) encontraron esta actividad en todas las cepas aisladas y usaron esta enzima para inhibir el crecimiento de *Fusarium* con resultados positivos, también se observó que no todas las cepas producían la misma cantidad de este compuesto. Sharaf *et al.* (2012) utilizó quitinasas extraídas de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *Botrytis* en cajas petri. La habilidad de producir quitinasas le confiere al hongo una ventaja en su poder biocontrolador, es por ello que es deseable que la presenten.

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que sirven para secuestrar hierro (Vinale *et al.*, 2013), las cepas de *Trichoderma* utilizan estos compuestos para crecer en condiciones pobres de hierro y para competir por este elemento con otros microorganismos (Mukherjee *et al.*, 2012). Las cepas TRK (*T. harzianum*), TMC (*T. asperellum*), TSK (*T. asperellum*), TSMC (*T. harzianum*), TPZ (*T. asperellum*). y TM (*T. atroviride*) produjeron sideróforos. Vinale *et al.* (2013) identificaron al ácido harzianico como sideróforo producido por *Trichoderma*, con capacidad antifúngica y como promotor de crecimiento de las plantas, también Lehner *et al.* (2013) demostraron la producción de estos compuestos por 10 especies diferentes de *Trichoderma*. Las cepas TSKa (*T. rifaïi*) y TC (*T. harzianum*) no manifestaron presencia de estos compuestos, Srivastava *et al.* (2013) reportaron la diferente capacidad de producción de sideróforos por diferentes cepas de *Trichoderma*.

Previo a esta investigación, la compañía empleaba cepas comerciales de *Trichoderma*, estas podrían no estar adaptadas a la región. Con el análisis de los resultados obtenidos se concluye que las cepas *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK y *T. asperellum* TPZ fueron las que presentaron mayor potencial para usarse en el control biológico de los microorganismos *F. oxysporum* y *B. cinerea*, altamente patógenos y causantes de pérdidas en la cosechas de la empresa BerryMex. Dado que estas cepas presentaron producción de compuestos

como sideróforos, quitinasas, compuestos volátiles y no volátiles, mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* (Benitez *et al.*, 2004), y adicionalmente obtuvieron altos porcentajes de inhibición en contra de las cepas patógenas. Estas cepas podrían disminuir los daños causados por estos patógenos, por lo tanto, se recomienda su uso en ensayos en campo y su producción masiva.

5 Conclusiones

Se obtuvieron ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. del valle de San Quintín, cuatro de las montañas del rancho Chapala, tres de rancho Kino y una de Playa Zarahembla.

Los análisis morfológicos y moleculares, indicaron que tres aislamientos pertenecen a la especie *T. harzianum* (TRK, TSMC y TC), tres a *T. asperellum* (TMC, TSK, y TPZ), una a *T. rifaii* (TSKa) y una a *T. atroviride* (TM)

Todos los aislamientos mostraron capacidad de controlar *in vitro* a los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, destacando *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, y *T. asperellum* TSK que inhibieron el crecimiento de ambos patógenos.

Las cepas *T. harzianum* TRK, *T. asperellum* TMC, *T. asperellum* TSK y *T. asperellum* TPZ, por su producción de sideróforos, quitinasas, compuestos volátiles y no volátiles, y por su rápido crecimiento y esporulación en las cajas petri, son excelentes candidatos para evaluarlos en campo y posteriormente para producirlos masivamente.

Con este trabajo se apoya a la empresa Berrymex al proporcionarle aislamientos de *Trichoderma* spp. que podrían disminuir los daños causados por *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*.

6 Recomendaciones

Evaluar el control de las cepas de *Trichoderma* aisladas en ensayos en plantas de fresa, frambuesa, arándano y zarzamora, infectadas por los hongos patógenos aislados *Botrytis* y *Fusarium*.

Evaluar diferentes sustratos para la producción a gran escala de *Trichoderma*, mediante el uso fermentación sólida.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ab Majid, A. H., Zahran, Z., Rahim, A. H. A., Ismail, N. A., Rahman, W. A., Zubairi, K. S. M. & Satho, T. (2015). Morphological and molecular characterization of fungus isolated from tropical bed bugs in Northern Peninsular Malaysia, *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 707-713.

Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*, 1(1), 73.

Ajith, P. S., & Lakshmidivi, N. (2010). Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. *Nature and Science*, 8(9), 265-269.

Arriaga, L., J.M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez y E. Loa. (2000). Regiones terrestres prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/terrestres.html>

Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.

Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1492), 761-776.

Behr, M., Legay, S., & Evers, D. (2013). Molecular identification of *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp. in Luxembourg. *OENO One*, 47(4), 239-247.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

- Bogumił, A., Paszt, L. S., Lisek, A., Trzciński, P., & Harbuzov, A. (2013). Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Horticulturae*, 25(2), 123-132.
- Bristow, P. R., McNicol, R. J., & Williamson, B. (1986). Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. *Annals of Applied Biology*, 109(3), 545-554.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., & Mach, R. L. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3959-3965.
- Carvalho, D. D., Lobo Junior, M., Martins, I., Inglis, P. W., & Mello, S. (2014). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39(5), 384-391.
- Castillo, F. D., Padilla, A. M., Morales, G. G., Siller, M. C., Herrera, R. R., Gonzales, C. N., & Reyes, F. C. (2011). In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Science*.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.
- Cheng, C. H., Yang, C. A., & Peng, K. C. (2012). Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology*, 102(11), 1054-1063.
- Dashwood, E. P., & Fox, R. A. (1988). Infection of flowers and fruits of red raspberry by *Botrytis cinerea*. *Plant pathology*, 37(3), 423-430.

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25IN3-39.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15

Eilenberg, J., & Hokkanen, H. M. (Eds.). (2006). *An ecological and societal approach to biological control* (Vol. 2). Dordrecht: Springer.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (Eds.). (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Science & Business Media.

Gawade, D. B., Pawar, B. H., Gawande, S. J., & Vasekar, V. C. (2012). Antagonistic Effect of *Trichoderma* against *Fusarium moniliformae* the causal of sugarcane wilt. *American J. Agric. & Environ. Sci*, 12(9), 1236-1241.

Gobierno del Estado de Baja California. (2017, 10 de Febrero). Programa para la atención de la región de San Quintín (2015-2019). Recuperado de <http://www.copladebc.gob.mx/programas/regionales/Programa%20para%20la%20Atencion%20de%20la%20Region%20de%20San%20Quintin%202015-2019.pdf>

González-Cárdenas, J. C., Maruri-García, J. M., & González-Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México (Antagonistic comparison of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum*, causal agent of damping off of seedlings in papaya in Tuxpan, Veracruz, México.).

Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Henry, P. M., Kong, M., & Broome, J. C. (2016). First Report of a Wilt Disease of Blackberry Caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*.

Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 13, 50-74.

Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L. & 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.

Gupta, V. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, M. (Eds.). (2014). *Biotechnology and biology of trichoderma*. Newnes.

Henry, P. M., Kirkpatrick, S. C., Islas, C. M., Pastrana, A. M., Yoshisato, J., Koike, S. T., ... & Gordon, T. (2016). The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. fragariae, cause of Fusarium wilt of strawberry, in California. *Plant Disease*, (ja).

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Huang, R., Li, G. Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H. J., Jiang, D. H., & Huang, H. C. (2011). Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7), 859-869.

Kamala, T., & Devi, S. I. (2012). Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-East India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*, 11(34), 8491-8499.

Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S., & Khosravi, V. (2012). Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 297-305.

Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., & Bayat, H. (2012). Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* causal agent of gray mold in rose greenhouses in central regions of Iran. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 1(1), 19-24.

Kim, J. H., Lee, S. H., Kim, C. S., Lim, E. K., Choi, K. H., Kong, H. G., & Moon, B. J. (2007). Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using

Bacillus licheniformis N1 formulation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(3), 438-444.

Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (2002). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor and Francis Ltd.

Lehner, S. M., Atanasova, L., Neumann, N. K., Krska, R., Lemmens, M., Druzhinina, I. S., & Schuhmacher, R. (2013). Isotope-assisted screening for iron-containing metabolites reveals a high degree of diversity among known and unknown siderophores produced by *Trichoderma* spp. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 18-31.

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.

Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., & Schnabel, G. (2012). *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia*, 104(3), 650-658.

Machuca, A., & Milagres, A. M. F. (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in applied microbiology*, 36(3), 177-181.

Mertely, J. C., Chandler, C. K., Xiao, C. L., & Legard, D. E. (2000). Comparison of sanitation and fungicides for management of Botrytis fruit rot of strawberry. *Plant disease*, 84(11), 1197-1202.

Michel, A. C., Otero, M. A., Rebolledo, O., Lezama, R., & Ochoa, M. E. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* in vitro. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 11(2), 273-278.

Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, L. Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la " Escoba de

Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 18-26.

Moretti, A. N. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (117), 7-13.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35-45.

Muthu, K. A., & Sharma, P. (2011). Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4532-4543.

Nam, M. H., Park, M. S., Kim, H. G., & Yoo, S. J. (2009). Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *J Microbiol Biotechnol.[En línea]*, 19(5), 520-4.

Narayanasamy, P. (2013). *Biological management of diseases of crops*. Springer.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044-2049.

Pandey, S., Shahid, M., Srivastava, M., Sharma, A., Singh, A., Kumar, V., & Gupta, S. J. (2014). Chitinolytic assay for *Trichoderma* species isolated from different geographical locations of Uttar Pradesh. *African Journal of Biotechnology*, 13(45).

Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-1142.

Pardo, Ó. F. E. (2014). Extracción e identificación de microorganismos asociados al cultivo del ají (*Capsicum annuum*) en La Mesa (Cundinamarca). *Revista del Sistema de Ciencia Tecnología e Innovación (SENNOVA)*, 1(1), 156-174.

- Paul, E. A. (2015). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
- Powelson, R. L. (1956). Red Raspberry Root Rot in Northern Utah.
- Qi, W., & Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 355-364.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A. M., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., & Klemsdal, S. S. (2008). Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 463-468.
- Raut, I. U. L. I. A. N. A., Badea-Doni, M. I. H. A. E. L. A., Calin, M. A. R. I. A. N. A., Oancea, F., Vasilescu, G. E. L. U., Sesan, T. E., & Jecu, L. (2014). Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. *Revista de Chimie*, 65(11), 1285-1288.
- RAUT, I., CALIN, M., VASILESCU, G., DONI, M. B., SESAN, T., & JECU, L. (2014). Effect of non volatile compounds of *Trichoderma* spp. against *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18, 178-181.
- Raza, W., Faheem, M., Yousaf, S., Rajer, F. U., & Yameen, M. (2013). Volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Sci. Lett*, 1, 21-24.
- Rojo, F. G., Reynoso, M. M., Ferez, M., Chulze, S. N., & Torres, A. M. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop protection*, 26(4), 549-555.
- Romanelli, A. M., Sutton, D. A., Thompson, E. H., Rinaldi, M. G., & Wickes, B. L. (2010). Sequence-based identification of filamentous basidiomycetous fungi from clinical specimens: a cautionary note. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 741-752.

SAVITHA, M., & SRIRAM, S. (2015). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates with biocontrol potential against *Phytophthora* blight in red pepper. *Pest Management In Horticultural Ecosystems*, 21(2), 194-202.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Segrelles Serrano, J. (2011). El problema de los cultivos transgénicos en América Latina: una “nueva” revolución verde.

Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., & Nejat, N. (2012). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 78(3), 160-169.

Sharaf, E. F., El-Sarrany, A. E. A. Q., & El-Deeb, M. (2012). Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase. *African Journal of Microbiology Research*, 6(21), 4538-4545.

Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.

Shternshis, M. V., Belyaev, A. A., Matchenko, N. S., Shpatova, T. V., & Lelyak, A. A. (2015). Possibility of biological control of primocane fruiting raspberry disease caused by *Fusarium sambucinum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), 15656-15662.

Siameto, E. N., Okoth, S., Amugune, N. O., & Chege, N. C. (2010). Antagonism of *Trichoderma harzianum* isolates on soil borne plant pathogenic fungi from Embu District, Kenya. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(3), 47-54.

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017, 10 de Febrero). Atlas agroalimentario 2016. Recuperado de <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>

Sreedevi, B., Charitha Devi, M., & Saigopal, D. V. R. (2011). Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Agricultural Technology*, 7(3), 623-635.

Srivastava, M. P., Tiwari, R., & Sharma, N. (2013). Effect of different cultural variables on siderophores produced by *Trichoderma* spp. *Int J Adv Res*, 1, 1-6.

Sundaramoorthy, S., & Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1(03), 36-40.

Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J., & Nikolić, M. (2009). Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 61(3), 419-429.

Tanović, B., Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., & Delibašić, G. (2014). *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. *Pesticidi i fitomedicina*, 29(4), 237-247.

Tkacz, J. S., & Lange, L. (2004). *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. Springer Science & Business Media.

Toghueo, R. M. K., Eke, P., Zabalgoceazcoa, Í., de Aldana, B. R. V., Nana, L. W., & Boyom, F. F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96, 8-20.

Valiuškaitė, A., Survilienė, E., & Raudonis, L. (2008). Effect of Mycostop on *Fusarium* root-rot agents of raspberry. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 27(1), 47-51.

Vargas-Hoyos, H. A., & 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.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.

Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., ... & Woo, S. L. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, 347(2), 123-129.

Watanabe, T. (2010). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC press.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.