



# Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*

## Interspecific incompatibility of *Trichoderma* species against *Meloidogyne incognita* in *Solanum lycopersicum*

Felicia Amalia Moo Koh, Jairo Cristóbal Alejo, Arturo Reyes Ramírez<sup>1</sup>, José María Tun Suárez, Marcela Gamboa Angulo, Ignacio Rodrigo Islas-Flores

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Conkal, Avenida Tecnológico S/N C.P. 97345, Conkal, Yucatán, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México.

Jairo Cristóbal Alejo, e-mail: jairo.cristobal@itconkal.edu.mx

### RESUMEN

**Antecedentes:** El control biológico de fitopatógenos se mejora al incorporar cepas nativas de agentes biocontroladores; es el caso de *Trichoderma* spp. El efecto de control es mayor cuando se aplican consorcios y muestran interacciones incompatibles entre sí para incrementar condiciones de antagonismo.

**Objetivos:** El objetivo del presente estudio fue identificar y evaluar *in vitro* la relación interespecífica de especies nativas de *Trichoderma* spp., así como la efectividad antagónica de especies incompatibles contra *Meloidogyne incognita*.

**Métodos:** Se realizaron 45 enfrentamientos duales *in vitro*, las cuatro con mayor incompatibilidad fueron: *T. virens* (Th27-08) / *T. harzianum* (Th33-59), *T. citrinoviride* (Th33-58) / *T. harzianum* (Th33-59), *T. virens* (Th43-13) / *T. ghanense* (Th26-52) y *T. simmonsii* (Th09-06) / *T. harzianum* (Th33-59). Estos se evaluaron contra *M. incognita* en *Solanum lycopersicum*, en condiciones de invernadero.

**Resultados y conclusiones:** Los resultados mostraron interacciones incompatibles con diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) contra el nematodo. En éstas, en relación al testigo sin inoculantes fúngicos se estimaron reducciones del 50.8-83.0% en la severidad del daño radical, 25.7-80.3% en el número de huevos y 31.5-94.1% en el número de hembras. El mejor efecto fue observado en el enfrentamiento de *T. citrinoviride* (Th33-58) / *T. harzianum* (Th33-59) al ser comparado con el testigo Oxamil 24%.

**Palabras clave:** aislados nativos, antagonismo, competencia por espacio, nematodo fitopatógeno *Trichoderma citrinoviride*

### ABSTRACT

**Background:** The biological control of phytopathogens is improved by incorporating native strains of biocontrol agents; this is the case of *Trichoderma* spp. The control effect is higher when are applied groups of organisms and show incompatible interactions with increase antagonism.

**Objective:** The objective of the present study was to identify and evaluate *in vitro* the interspecific relation of native *Trichoderma* spp., and the antagonistic effect of incompatible species against *Meloidogyne incognita*.

**Methods:** The isolates of *Trichoderma* spp. were evaluated among them in dual culture, 45 dual cultures were performed, the four with greater incompatibility: *T. virens* (Th27-08) / *T. harzianum* (Th33-59), *T. citrinoviride* (Th33-58) / *T. harzianum* (Th33-59), *T. virens* (Th43-13) / *T. ghanense* (Th26-52) y *T. simmonsii* (Th09-06) / *T. harzianum* (Th33-59) and were evaluated against *M. incognita* in *Solanum lycopersicum*, in greenhouse.

**Results and conclusions:** The results showed interactions incompatible with significant differences ( $P \leq 0.01$ ) against the nematode in relation to the control without fungal inoculants, reductions of 50.8-83.0% in the severity of the radical damage were estimated, 25.7-

80.3% in the number of eggs and 31.5-94.1% in the number of females. The best effect was observed in the confrontation of *T. citrinoviride* (Th33-58) / *T. harzianum* (Th33-59) when compared to the Oxamil 24% control.

**Keywords:** antagonism, competition for space, native isolates, phytopathogenic nematode, *Trichoderma citrinoviride*

## INTRODUCCIÓN

Los nematodos parásitos de plantas son un grupo de patógenos importantes con origen en el suelo, varias especies inducen la formación de agallas en tejidos radiculares, los cuales afectan la absorción de nutrientes y agua, lo que ocasiona mayor susceptibilidad de las plantas a otros patógenos (Zhang *et al.*, 2015). En la actualidad el control biológico de fitopatógenos se ha impulsado debido a la aplicación desmedida del control químico y sus efectos deletéreos. La incorporación de cepas nativas de agentes biocontroladores como *Trichoderma* spp., adaptadas a condiciones de donde se aíslan, mostraron efectos significativos en el control de especies de fitonematodos (Candelero *et al.*, 2015; Pinzón *et al.*, 2015).

Las especies de *Trichoderma* están ampliamente distribuidas en el suelo, poseen propiedades parasíticas y antibióticas y su capacidad metabólica y su competencia en la naturaleza por espacio y nutrientes, las hacen altamente competentes en las actividades agrícolas (Hermosa *et al.*, 2013). Especies como *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. longibrachiatum* se utilizan como antagonistas de nematodos agalladores de la raíz en diversos cultivos (Mendoza *et al.*, 2013; Elgorban *et al.*, 2014; Hernández-Ochandía *et al.*, 2015). Estas especies fueron eficaces en el manejo de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *Heterodera avenae* ya que redujeron significativamente las poblaciones de estos organismos en los cultivos de pepino (*Cucumis sativus* L.), chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.), cuando se aplicaron de forma individual (Zhang *et al.*, 2014; Candelero *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015). El efecto de control es mayor cuando se aplican consorcios de microorganismos de la misma especie (relación intraespecífica) o de especies diferentes (relación interespecífica), que interactúan entre sí y muestran un comportamiento antagónico (interacción incompatible). Varias investigaciones han indicado que la combinación de aislados para el biocontrol puede ser compatible o incompatible para que se produzca mayor inhibición de los patógenos (Ortuño *et al.*, 2013). De esta forma las interacciones incompatibles de aislados fúngicos pueden ampliar el rango de control de patógenos (Hernández-Ochandía *et al.*, 2015).

El uso de *Trichoderma* spp., antagonistas con diferentes espectros de acción, constituyen un reto y una vía para la elaboración de consorcios comerciales. La selección de aislados nativos en evaluaciones *in vitro* reduce la variabilidad en el control biológico *in vivo*. También, se ha observado que pueden favorecer el sinergismo con otros agentes biocontroladores similares o distintos (Benítez *et al.*, 2004).

Estudios previos en Yucatán, reportaron con aislados nativos de *Trichoderma* spp. actividad promotora de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus* L.), chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), y antagonismo *in vitro* de manera individual contra *M. incognita* y *Fusarium* spp. (Candelero *et al.*, 2015; Pinzón *et al.*, 2015). Con base a lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron identificar molecularmente los aislamientos de *Trichoderma* spp., así como evaluar *in vitro* la relación interespecífica de *Trichoderma* spp. y su efectividad antagónica de las especies incompatibles contra *M. incognita* en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de aislados de *Trichoderma*

Los aislados de *Trichoderma* spp. en estudio se obtuvieron de la colección del laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal, en total fueron 10 aislados provenientes de la rizosfera de suelos con (Th02-04, Th20-07, Th26-52, y Th32-09) y sin actividad agrícola (Th09-06, Th27-08, Th33-58, Th33-59, Th43-13, Th43-14). Estos hongos se reactivaron en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se mantuvieron a 25 °C por ocho días.

### Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp.

Para las identificaciones específicas de los aislados fúngicos se hicieron extracciones de DNA, a partir de micelio fúngico con tres días de crecimiento, con el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep



TM. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación para el análisis molecular se desarrolló siguiendo la metodología modificada por Moo-Koh *et al.* (2014). La amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 y 5.8S del ARN ribosomal, se realizó con los iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen USA, las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con el banco de genes de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y con ayuda del programa Blast. Adicionalmente, se comparó con el International subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy en el programa TrichoBlast, posteriormente las secuencias fueron depositadas al banco de genes del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Bioensayo de enfrentamiento dual *in vitro* de aislados

Los enfrentamientos duales se realizaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo PDA. Un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada aislado (de ocho días de crecimiento) se depositó en puntos equidistantes de la caja de Petri. De esta forma se obtuvieron 45 enfrentamientos duales, todos con cuatro réplicas y como testigo se utilizaron los aislados individuales. Los cultivos se incubaron a 25 °C por ocho días. Al final de este tiempo se realizó una selección de los aislados fúngicos, donde se consideraron tres características: a) el crecimiento proporcional (50/50%) de ambos aislados en la caja de Petri, b) la presencia de barrera micelial (incompatibilidad de los aislados) y c) la coloración en el medio de cultivo (Ortuño *et al.*, 2013). Posteriormente, los aislados seleccionados se evaluaron *in vivo* como antagonistas de *M. incognita*.

### Evaluación de aislados incompatibles de *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*

Para la evaluación de los aislados incompatibles en el control de *Meloidogyne incognita*, con cada uno de los enfrentamientos duales seleccionados *in vitro*, se preparó una suspensión de conidios de 10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup>. Como modelo de estudio se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del tipo Saladette cv. Río Grande, las cuales se depositaron en charolas de poliestireno de 200 cavidades que contenían sustrato comercial Cosmopeat®, mezclado previamente con agrolita 50:50

(v/v). En cada cavidad de la charola y directamente al sustrato se inoculó 1 mL de las soluciones de conidios, de cada uno de los enfrentamientos. Las inoculaciones se realizaron al momento de la siembra, ocho y 15 días posteriores a la germinación de las semillas. A partir de los ocho días después de la germinación, y durante toda la evaluación, las plántulas se mantuvieron con riegos diarios y con una dosis de fertilización recomendada total para el cultivo de 300-150-200, para 20,000 plantas ha<sup>-1</sup>, balanceada con los fertilizantes grado comercial: Urea (46-00-00), fosfato monoamónico (MAP, 12-61-00) y nitrato de potasio (NKS, 13-2-44) (Rellano-Gil y Gutiérrez-Coronado, 2006).

Para la obtención y preparación del inóculo de *Meloidogyne incognita*, se extrajeron masas de huevos a partir de raíces agalladas de tomate del mismo cultivar, empleado en la evaluación y cultivado en invernadero en suelo infestado con el nematodo y sin la aplicación de nematicidas. Cuando las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 15 cm se trasplantaron en vasos de poliestireno de un litro de capacidad conteniendo una mezcla de sustrato de suelo: agrolita (80:20), en seguida se depositaron 1500 huevos de *M. incognita*, seguido de la suspensión de conidios de los enfrentamientos seleccionados. Dos testigos se prepararon, uno comercial que consistió en la aplicación de Oxamil al 24 % (Vydate®) en dosis de 2 mL L<sup>-1</sup> (Mendoza *et al.*, 2013), al momento de trasplante, y otro solo con el nematodo sin la inoculación de los hongos. Con los hongos y el Oxamil se hicieron adicionalmente dos aplicaciones, a los ocho y 15 días posteriores al trasplante. El experimento se condujo en un invernadero tipo túnel con temperatura promedio de 32 °C, 40-50 % de humedad relativa y con fotoperiodo 10-12 horas luz.

El experimento se evaluó a los 60 días posteriores al trasplante, donde se consideraron como variables de control del nematodo la severidad del daño radical, estimada con la escala de severidad de seis clases propuesta por Taylor y Sasser (1978), el número de huevos por g de raíz licuada<sup>-1</sup> (NHU) y el número de hembras por g de raíz licuada<sup>-1</sup> (NHE). Como variables de crecimiento de las plantas se registraron: altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), longitud de la raíz (LR), volumen radical (VR), biomasa seca aérea (BSA) y peso seco de la raíz (PSR). Cada tratamiento constó de 20 plantas, distribuidas en un diseño experimental completamente al azar. Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y la comparación de

medias se estimó con el método de Scott-Knott ( $P \leq 0.05$ ), con la ayuda del programa InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>).

## RESULTADOS

### Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp.

Los resultados obtenidos de las comparaciones de las secuencias de nucleótidos permitieron realizar las asignaciones de las especies correspondientes a cada uno de los 10 aislados, con un porcentaje de homología del 99-100% con las secuencias de referencias. Los aislados correspondieron a cinco especies: *Trichoderma citrinoviride* (Th33-58), *T. ghanense* (Th02-04 y Th26-52), *T. harzianum* (Th20-07, Th43-14 y Th33-59), *T. simmonsii* (Th09-06) y *T. virens* (Th27-08, Th32-09 y Th43-13) (Tabla 1).

### Incompatibilidad de *Trichoderma* spp.

Con los 10 aislados fúngicos se generaron 45 enfrentamientos duales, de los cuales solo 15 manifestaron la misma capacidad de competencia ya que crecieron de manera proporcional en el área de la caja de Petri, de éstos 11 presentaron barrera de defensa entre 0.1-0.6 cm, donde, ocho tuvieron la barrera en el

centro de la caja (mayor competencia por espacio), y cuatro presentaron coloración en el medio de cultivo con un rango de barrera de defensa de 0.5 a 0.6 cm. Con base a esta evaluación, se seleccionaron cuatro enfrentamientos incompatibles para la evaluación *in vivo* contra *Meloidogyne incognita*. Estos correspondieron a *T. virens* (Th27-08)/*T. harzianum* (Th33-59), *T. citrinoviride* (Th33-58)/*T. harzianum* (Th33-59), *T. virens* (Th43-13)/*T. ghanense* (Th26-52), *T. simmonsii* (Th09-06)/*T. harzianum* (Th33-59) (Figura 1).

### Efecto de aislados incompatibles en el control de *Meloidogyne incognita*

LOS ANDEVA para las variables de control del nematodo mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ). Con respecto al tratamiento testigo sin inoculantes fúngicos, con la aplicación de especies incompatibles, en el daño radical, se estimaron valores según la escala de severidad (Taylor y Sasser, 1978) desde 2.8-8.1%, lo que significó una reducción del 50.8-83.0% de la severidad; en el número de huevos por g de raíz licuada y el número de hembras por g de raíz teñida los rangos de promedios fueron de 65.9-247.9 y 7.6-88.1 esto representó reducciones del 25.7-80.3% para el primero y 31.5-94.1% para el segundo. (Tabla 2).

Tabla 1. Identificación de *Trichoderma* spp., aisladas de Yucatán

Clave de aislado	Identificación Molecular				
	Especie	% de homología	% de cobertura	Secuencia de referencia del GenBank	Núm. de acceso del GenBank
Th33-58	<i>T. citrinoviride</i>	99	99	X93957	MF078653
Th02-04	<i>T. ghanense</i>	99	99	JN564003	MF078652
Th26-52		99	99	LN846701	MF078651
Th20-07	<i>T. harzianum</i>	99	99	LN846710	MF078650
Th43-14		99	99	LN846710	MF078649
Th33-59		100	99	FR872742	MF078648
Th09-06	<i>T. simmonsii</i>	99	99	KX632493	MF078647
Th27-08	<i>T. virens</i>	100	99	KJ739790	MF078646
Th32-09		99	99	KT599099	MF078645
Th43-13		99	99	KJ739790	MF078644

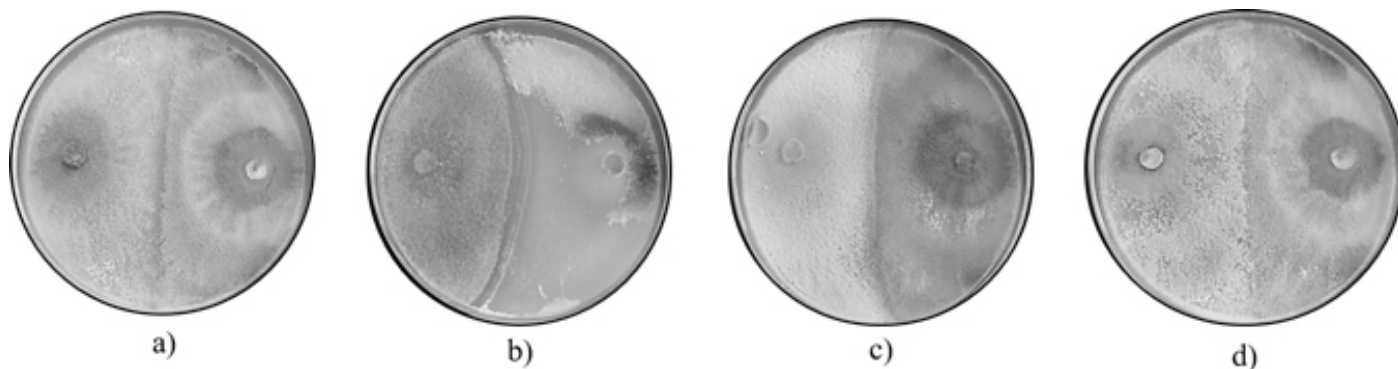


Figura 1. Enfrentamientos incompatibles seleccionados para la evaluación contra *Meloidogyne incognita*. a: *Trichoderma simmonsii* (Th09-06)/*T. harzianum* (Th33-59). b: *T. virens* (Th43-13)/*T. ghanense* (Th26-52). c: *T. citrinoviride* (Th33-58)/*T. harzianum* (Th33-59). d: *T. virens* (Th27-08)/*T. harzianum* (Th33-59).

La interacción *T. citrinoviride* (Th33-58) /*T. harzianum* (Th33-59) fue la más promisoriosa al tener un efecto igual al Oxamil, ya que las comparaciones de medias no mostraron diferencias estadísticas (Scott-Knott,  $P \leq 0.05$ ) en las tres variables de control con este tratamiento. Esta interacción ejerció reducciones del 83.0% en la severidad de daño radical, el 80.3% en el número de huevos y un 94.1% en número de hembras.

En la severidad del daño radical le siguen en efectividad la interacción *T. virens* (Th43-13) /*T. ghanense* (Th26-52), *T. simmonsii* (Th09-06) /*T. harzianum* (Th33-59) y *T. virens* (Th27-08) /*T. harzianum* (Th33-59), con reducción del 76.7, 65.5 y 50.8 %, respectivamente. Las cuales se consideraron también con buenos efectos de control del nematodo.

Para la variable número de huevos por g de raíz licuada, la interacción de *T. simmonsii* (Th09-06) /*T. harzianum* (Th33-59) mostró un 59.3% en la reducción de huevos, a la que le siguió, *T. virens* (Th43-13) /*T. ghanense* (Th26-52) y *T. virens* (Th27-08) /*T. harzianum* (Th33-59) con 52.8 y 25.7%, respectivamente. En el número de hembras por g de raíz teñida, *T. simmonsii* (Th09-06) /*T. harzianum* (Th33-59), *T. virens* (Th27-08) /*T. harzianum* (Th33-59) y *T. virens* (Th43-13) /*T. ghanense* (Th26-52) mostraron 90.1, 88.1 y 31.5%, respectivamente.

El control del nematodo se reflejó en las variables de crecimiento de la planta, por lo que los ANDEVA mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre tratamientos. Las interacciones de *Trichoderma* spp. indujeron los mayores promedios con respecto al testigo sin inoculantes fúngicos con incrementos del

31.3-33.7% en altura de la planta, 2.3-4.1% en diámetro del tallo, 2.4-14.6% en la longitud de raíz (Figura 2), 8.6-17.1% en el volumen radical, 8.8-17.6% en la biomasa seca aérea y un 11.5% en el peso seco de raíz (Tabla 3).

La interacción *T. citrinoviride* (Th33-58) /*T. harzianum* (Th33-59), mostró significativamente (Scott-Knott,  $P \leq 0.05$ ) raíces con mayor vigor, ya que superó a los tratamientos con interacciones fúngicas y al testigo sin inoculantes.

## DISCUSIÓN

La caracterización de *Trichoderma* mediante aspectos morfológicos se complementa con la aplicación de técnicas moleculares, dentro de los cuales la amplificación de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8S del ARN ribosomal han sido ampliamente utilizados; ya que existe una diversidad intraespecífica e interespecífica que viene establecida por las diferencias entre las distintas condiciones donde se desarrollaron los aislados (Hernández *et al.*, 2013; Moo-Koh *et al.*, 2014).

En la actualidad, se han registrado 381 especies de *Trichoderma* (<http://www.indexfungorum.org>), en este estudio se reportan cinco especies, de las cuales *T. citrinoviride*, *T. ghanense* y *T. simmonsii* no ha sido registradas para México, y para el estado de Yucatán se incluye el primer reporte de éstas y *T. virens*.

La cantidad de especies aisladas fue más alta en suelos sin actividad agrícola, lo que demuestra mayor diversidad de especies en ambientes menos perturbados, como ocurrió en las especies de *T. citrinoviride* (Th33-58), *T. harzianum* (Th43-14 y

Th33-59), *T. simmonsii* (Th09-06) y *T. virens* (Th27-08 y Th43-13). Sin embargo, especies como *T. harzianum* (Th20-07) y *T. virens* (Th32-09) también se encontraron en suelos con actividad agrícola. Esto puede representar un ejemplo de cómo las especies pueden desarrollarse a través de la selección impuesta por el ambiente o condiciones ecológicas particulares. Además

de evidenciar el flujo de genes por la actividad agrícola al incorporar biocontroladores en las aéreas cultivadas (Torres-De la Cruz *et al.*, 2015).

Lo anterior contribuye al acervo de especies presentes en México y representa información valiosa al momento de registrarlos en el GenBank (Guigón-López *et al.*, 2010), también pro-

Tabla 2. Efecto de las interacciones incompatibles de *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne incognita*

Tratamientos	SDR (%)	NHU	NHE
<i>T. virens</i> (Th27-08)/ <i>T. harzianum</i> (Th33-59)	8.1± 0.8 b	247.9± 10.7 b	14.8± 1.9 c
<i>T. citrinoviride</i> (Th33-58)/ <i>T. harzianum</i> (Th33-59)	2.8± 0.5 d	65.9 ± 17.6 e	7.6± 2.1 d
<i>T. virens</i> (Th43-13)/ <i>T. ghanense</i> (Th26-52)	3.9± 2.0 d	157.6± 9.8 c	88.1± 5.4 b
<i>T. simmonsii</i> (Th09-06)/ <i>T. harzianum</i> (Th33-59)	5.7± 4.9 c	135.8± 9.8 d	12.8± 2.9 c
Nematicida (Vydate®)	1.7± 0.2 d	60.80± 14.6 e	4.5± 3.3 d
Testigo (sin inoculantes fúngicos)	16.5± 1.1a	333.8± 14.5 a	128.7± 2.0 a

SDR: Severidad (%) del daño radical, NHU: Número de huevos por gramo de raíz licuada, NHE: Número de hembras por gramo teñida. Medias con diferente literal dentro de columnas son estadísticamente diferentes (Scott-Knott,  $P \leq 0.05$ ).

Tabla 3. Efecto de las interacciones incompatibles de *Trichoderma* spp. en las variables de crecimiento de *S. lycopersicum* infectadas con *Meloidogyne incognita*

Tratamiento	ALT (cm)	DT (mm)	LR (cm)	VR (mL)	BSA (g)	PSR (g)
<i>T. virens</i> (Th27-08)/ <i>T. harzianum</i> (Th33-59)	92.2±3.4 b	5.79±0.34 b	37.6±2.3 a	24.1±1.9 b	3.64±0.42 c	0.59±0.08 c
<i>T. citrinoviride</i> (Th33-58)/ <i>T. harzianum</i> (Th33-59)	94.3±1.8 a	6.60±0.32 a	37.3±1.6 a	26.9±0.9 a	4.54±0.29 a	0.87±0.01 a
<i>T. virens</i> (Th43-13)/ <i>T. ghanense</i> (Th26-52)	93.0±3.0 a	5.90±0.34 b	34.9±2.6 b	25.0±1.1 b	4.14±0.33 b	0.67±0.08 c
<i>T. simmonsii</i> (Th09-06)/ <i>T. ghanense</i> (Th26-52)	91.0±1.2 b	6.48±0.25 a	32.9±2.3 c	24.4±1.2 b	4.10±0.19 b	0.58±0.06 c
Oxamil 24% (Vydate®)	75.5±1.3 c	6.50±0.22 a	34.4±2.4 b	23.5±1.3 c	3.99±0.36 b	0.74±0.14 b
Testigo	62.5±1.2 d	6.33±0.17 a	32.1±1.5 c	22.3±1.4 c	3.74±0.27 c	0.77±0.08 b

ALT: altura de la planta, DT: diámetro del tallo, LR: longitud de la raíz, VR: volumen radical (VR), BSA: biomasa seca aérea y PSR: peso seco de la raíz. Medias con diferente literal dentro de columnas son estadísticamente diferentes (Scott-Knott,  $P \leq 0.05$ ).



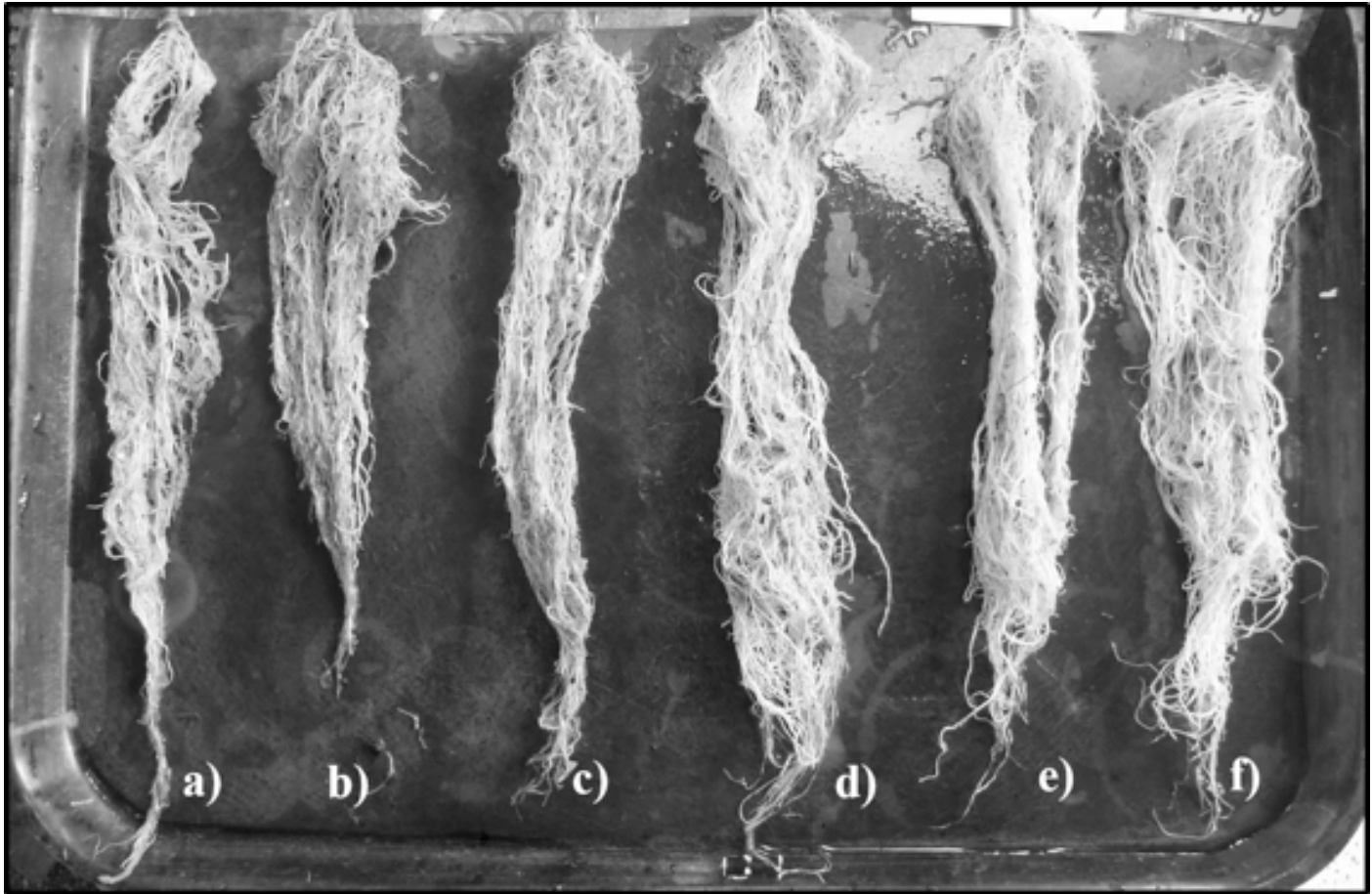


Figura 2. Enfrentamientos incompatibles. a: *Trichoderma virens* (Th43-13)/*T. ghanense* (Th26-52). b: *T. simmonsii* (Th09-06)/*T. harzianum* (Th33-59). c: *T. virens* (Th27-08)/*T. harzianum* (Th33-59). d: *T. citrinoviride* (Th33-58)/*T. harzianum* (Th33-59). e: Oxamil. f: Testigo.

porciona información disponible que permite, un mejor diseño de experimentos posteriores a fin de evaluar la actividad biológica de las especies bajo diferentes condiciones de crecimiento y determinar los mecanismos de acción que desarrollan para seleccionar aislamientos promisorios para el control de fitopatógenos.

Se pudo demostrar la incompatibilidad de aislados de *Trichoderma* en los aislados de suelos con y sin actividad agrícola. Sin embargo, entre aquellos aislados que provinieron de suelos sin actividad agrícola, tuvieron mayor incompatibilidad en particular, el enfrentamiento de *T. citrinoviride* (Th33-58) /*T. harzianum* (Th33-59) resultó el mejor tratamiento al controlar el nematodo, lo que sugiere un proceso de coadaptación como producto de las asociaciones entre especies (Ortuño *et al.*, 2013).

En resumen *T. harzianum* (Th33-59) mostró incompatibilidad con *T. citrinoviride* (Th33-58), *T. simmonsii* (Th09-06) y

*T. virens* (Th27-08); para *T. citrinoviride* solo mostró esta actividad contra *T. harzianum* (Th20-07, Th33-59 y Th43-14) y *T. virens* (Th32-09, Th27-08), siendo esta la más frecuente al estar presente en cinco enfrentamientos incompatibles de los 11 observados. Estas interacciones ayudan a comprobar los criterios de incompatibilidad interespecífica: formación de barrera de defensa, competencia por espacio según el crecimiento proporcional del 50% en la caja de Petri y antibiosis mediante las coloraciones en el medio de cultivo (Martínez *et al.*, 2013).

Estudios previos han mostrado actividad variable de las especies del género *Trichoderma* para el control de *M. incognita*. Por ejemplo, en *T. harzianum* se ha reportado el parasitismo *in vitro* en huevos, lo que favoreció la destrucción total de los mismos (Mendoza *et al.*, 2013), mientras que con filtrados de varios aislados locales de *T. harzianum* (Th43-14, Th02-01), *T.*

*virens* (Th43-13, Th27-08) y *T. simmonsii* (Th09-06) ejercieron un efecto nematocida *in vitro* del 100% en juveniles de segundo estadio ( $J_2$ ) después de 48 h de exposición, en el presente estudio estos aislados no mostraron incompatibilidad con otras especies (Candelero *et al.*, 2015). En el cultivo de *S. lycopersicum* una cepa de *T. harzianum*, causó reducciones en el daño radical del 59.72% (Qureshi *et al.*, 2012), 69.80% (Radwan *et al.*, 2012) y 88.3% (González *et al.*, 2012) valores menores de los que se obtuvo en el estudio al combinar dos aislados como *T. citrinoviride* (Th33-58) / *T. harzianum* (Th33-59). Estudios realizados en el estado de Yucatán en *M. incognita*, con inoculaciones de *Trichoderma* spp. mostraron reducciones en la formación de agallas hasta un 78.10% (Pinzón *et al.*, 2015).

Las especies de *Trichoderma* presentan diferentes mecanismos de acción, que les confieren el potencial de control de fitopatógenos, entre estos están: competencia por espacio, favorecido por la velocidad de crecimiento de los aislados; micoparasitismo, donde se involucran procesos quimiotróficos, que promueven reconocimiento, adhesión, enrollamiento y actividad lítica de quitinasas y celulasas, principalmente. Otro mecanismo es la antibiosis o la acción directa de metabolitos secundarios tóxicos sobre fitopatógenos sensibles; sin embargo, diferentes aislados de la misma especie muestran variación en su potencial nematocida (Infante *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2012, Martínez *et al.*, 2013).

El beneficio del control de los patógenos se ve reflejado en las variables de crecimiento de las plantas al notarse un incremento en ellas, así, Zhang y Zhang (2009), evaluaron dos aislados de *T. viride* en combinación con composta y observaron un aumento en el peso promedio de las raíces del 26.64% y 30.45%. Pinzón *et al.* (2015) al incorporar a *T. harzianum* obtuvieron incrementos del 28.13% en la altura y del 41.16% en la ganancia de biomasa seca total, respecto al testigo sin la aplicación del hongo, Li *et al.* (2015) obtuvieron el 31% en el aumento de peso seco de plántulas. Asimismo, estudios mostraron con *T. harzianum* incrementos en el número de hojas, área foliar, diámetro de tallo, abundancia de pelos radicales y raíces laterales (Samolski *et al.*, 2012; López-Bucio *et al.*, 2015). Bharti *et al.* (2012) con cinco aislados de *T. harzianum* en plantas de *S. lycopersicum*, observaron incrementos en peso fresco aéreo en un rango de 14.59-20.21%, en el peso de la raíz de 7.03-16.05%. Además

observaron mayor actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima clave para la síntesis de ácidos nucleicos y lípidos derivada de la vía de las hexosas monofosfato, lo que hizo concluir la capacidad de los aislados para promover el crecimiento o su capacidad inhibitoria; ya que tres aislados redujeron en un 14% peso fresco aéreo y 42.6% el peso de la raíz como ocurrió en el presente estudio en las variables de diámetro del tallo, biomasa seca aérea y peso seco de la raíz con la interacción *T. virens* (Th27-08) / *T. harzianum* (Th33-59) al obtener reducciones de 9.33%, 2.75% y 30.5%, respectivamente. Hermosa *et al.* (2013) explicaron que una alta concentración de ácido indolacético producido por *Trichoderma* inhibe el crecimiento vegetal, lo que podría ser estimado en futuros estudios. La actividad de *Trichoderma* varía según la especie y el aislado, ya que diferentes especies muestran actividad promotora variable, así como controladora de *M. incognita* (Hernández-Ochandía *et al.*, 2015; Candelero *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

La identificación específica de aislados del género *Trichoderma* empleando técnicas moleculares permitió reforzar la identificación tradicional, aportando tres nuevos registros de especies para México y cuatro para el estado de Yucatán. Las especies incompatibles *T. citrinoviride* (Th33-58) y *T. harzianum* (Th33-59) redujeron el parasitismo de *Meloidogyne incognita* por lo que mejoraron significativamente las variables de crecimiento de la planta. Esta interacción es una candidata para la composición de ingredientes activos y elaboración de bioplaguicidas. Por otra parte, la interacción *T. citrinoviride* (Th33-58) / *T. harzianum* (Th33-59), mostró significativamente (Scott-Knott,  $P \leq 0.05$ ) raíces con mayor vigor, ya que superó a los tratamientos y el testigo sin inoculantes fúngicos.

## LITERATURA CITADA

- Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Bharti, M.K., A.K. Sharma, A.K. Pandey, R. Mall, 2012. Physiological and biochemical basis of growth suppressive and growth promotory effect of *Trichoderma* strains on tomato plants. *National Academy Science Letters* 35: 355-359.
- Candelero, D.J., A.J. Cristóbal, R.A. Reyes, S.J.M. Tun S., A.M.M. Gamboa A., S.E. Ruíz, 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*  $\phi$ YTON 84: 113-119.





- Elgorban, A.M., M.A. Abdel-Wahab, A.H. Bahkali, B.A. Al-Sum, 2014. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on tomato plants by *Hypocrea lixii* (the teleomorph of *Trichoderma harzianum*). *Clean Soil, Air, Water* 42: 1464-1469.
- González, R.L., G.O. Mirabal, B.R. Rodríguez, B.M. Viltres, 2012. Uso del hongo *Trichoderma* spp. para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en tomate. *Centro Agrícola* 39: 49-54.
- Guigón-López, C., V. Guerrero-Prieto, F. Vargas-Albores, E. Carvajal-Millán, G.D. Ávila-Quezada, L. Bravo-Luna, M. Ruocco, S. Lanzuise, S. Woo, M. Lorito, 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.
- Hermosa, R., M.B. Rubio, R.E. Cardoza, C. Nicolás, E. Monte, S. Gutiérrez, 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology* 16: 69-80.
- Hernández, A., M. Jiménez, A. Arcia, D. Ulacio, N. Méndez, 2013. Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante RAPD y rADN-ITS. *Bioagro* 25: 67-74.
- Hernández-Ochandía, D., M.G. Rodríguez, B. Peteira, I. Miranda, Y. Arias, B. Martínez, 2015. Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal* 30: 139-147.
- Infante, D., B. Martínez, N. González, Y. Reyes, 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24: 14-21.
- Li, R.X., F. Cai, G. Pang, Q.R. Shen, R. Li, W. Chen, 2015. Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS ONE* 10: 1-16.
- López-Bucio, J., R. Pelagio-Flores, A. Herrera-Estrella, 2015. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 196: 109-123.
- Martínez, B., D. Infante, Y. Reyes, 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28: 1-11
- Mendoza, G.A.T., J.H. Wilson, J.C. Colina, 2013. Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. *Revista Científica de Estudiantes Facultad de Ciencias Biológicas* 1: 65-71.
- Moo-Koh, F.A., J. Cristóbal-Alejo, A. Reyes-Ramírez, J.M. Tun-Suárez, R. Sandoval-Luna, J.A. Ramírez-Pool, 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia* 48: 833-845.
- Ortuño, N., C. Miranda, M. Claros, 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal Selva Andina Biosphere* 1: 16-4.
- Pinzón, E.L.F., C.J. Candellero, S.J.M. Tun, O.V. Reyes, A.J. Cristóbal, 2015. Control de *Meloidogyne incognita* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con la aplicación de *Trichoderma harzianum*. *Fitosanidad* 19: 5-11.
- Qureshi, S., A. Ruqqa, V. Sultana, J. Ara, S. Ehteshamul-Haque, 2012. Nematicidal potential of culture filtrates of soil fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of cultivated and wild plants. *Pakistan Journal of Botany* 44: 1041-1046.
- Radwan, M.A., S.A.A. Farrag, M.M. Abu-Elamayem, N.S. Ahmed, 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology* 56: 58-62.
- Rellano-Gil, M., M.A. Gutiérrez-Coronado, 2006. Rendimiento y calidad poscosecha de tomate bajo diferentes esquemas de fertilización al suelo. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12: 113-118.
- Samolski, I., A.M. Rincón, L.M. Pinzón, A. Viterbo, E. Monte, 2012. The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158: 129-138.
- Taylor, A.L., J.N. Sasser, 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics, Raleigh.
- Torres-De la Cruz, M., C.F. Ortiz-García, C. Bautista-Muñoz, J.A. Ramírez-Pool, N. Ávalos-Contreras, S. Cappello-García, A. De la Cruz-Pérez, 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 947-961.
- White, T., J.T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego. Pp. 315-321.
- Zhang S., Y. Gan, B. Xu, 2015. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology* 94: 21-29.
- Zhang, S.X., X. Zhang, 2009. Effects of two composted plant pesticide residues, incorporated with *Trichoderma viride*, on root-knot nematode in balloonflower. *Agricultural Sciences in China* 8: 447-454.
- Zhang, S., Y. Gan, B. Xu, Y. Xu, 2014. The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. *Biological Control* 72:1-8.