

Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México

Jesús Gaudencio Aquino-Martínez, Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), Laboratorio de Fitopatología, Conjunto Sedagro s/n, Metepec, Edo. México CP 52140; **Luis Miguel Vázquez-García**, UAEM, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Universitario El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Edo. México CP 50200; y **Basilio Gabriel Reyes-Reyes**, UAEM, Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias, km 14.5 Carr. Toluca-Atlacomulco, San Cayetano, Toluca, Edo. México CP 50200. Correspondencia: jg_aquino@hotmail.com

(Recibido: Octubre 2, 2007 Aceptado: Noviembre 12, 2007)

Aquino-Martínez, J.G., Vázquez-García, L.M. y Reyes-Reyes, B.G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología 26:127-137.

Resumen. Se obtuvieron 45 aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y 45 de hongos antagonistas (T01-T45): *Trichoderma* spp. (35) y *Gliocladium* spp. (10), de plantaciones comerciales de clavel en Villa Guerrero, México. La actividad antagónica de las cepas se evaluó *in vitro*, comparada con dos cepas comerciales: *T. harzianum* "PHC T-22" (T46), *T. lignorum* "Biotrol" (T47), y una cepa nativa de *T. harzianum* (T48). En invernadero, se valoró la actividad enzimática de los mejores aislamientos. Las cepas nativas T20, T22, T23, T24, T25, y comercial T47 de *T. lignorum* presentaron diferencias altamente significativas para: invasión de colonia del patógeno, crecimiento radial del antagonista y diferencia de crecimiento radial *in vitro*. La actividad celulolítica de las cepas T25 y T47 fue significativamente superior en suelo sin desinfección; T47 también la presentó en suelo desinfectado. Las cepas nativas son una alternativa para controlar la "dormilona" del clavel por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, fomentar el biocontrol de patógenos y reducir la aplicación de plaguicidas en la zona florícola.

Palabras clave adicionales: *Trichoderma lignorum*, *T. harzianum*, hiperparasitismo.

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es uno de los principales cultivos de la zona florícola del Estado de México, después del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev, es la segunda flor de corte con mayor superficie cultivada en el

Abstract. Forty five isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and other 45 of antagonistic fungi (T01-T45): *Trichoderma* spp. (35) and *Gliocladium* spp. (10), were obtained from commercial carnation plantations in Villa Guerrero, Mexico. The antagonistic activity of isolates was evaluated *in vitro*, and compared against two commercial strains: *T. harzianum* "PHC T-22" (T46), *T. lignorum* "Biotrol" (T47), and against a native strain of *T. harzianum* (T48). The enzymatic activity of the most effective isolates was assessed in greenhouse. Native strains T20, T22, T23, T24, T25 and the commercial T47 of *T. lignorum* showed highly significant differences to: invasion of the pathogen's colony, radial growth of the antagonist, and difference in radial growth *in vitro*. The cellulolytic activity of strains T25 and T47 was significantly higher in soil without disinfection; T47 also showed such activity in disinfected soil. Native strains are an alternative to control "dormilona" of carnation caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, to enhance biocontrol of pathogens, and to contribute to reduce the use of pesticides in the flower-producing zone.

Additional keywords: *Trichoderma lignorum*, *T. harzianum*, hyperparasitism.

Abbreviated article.

After chrisanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev, carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is the second most important crop in Guerrero County in the state of Mexico, with approximately 470 ha (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2007). Yield and quality of flower stems are affected by the disease known as "dormilona", which is caused mainly by the fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. and Delacr.) Snyder and Hans. Incidence in the field and greenhouse may reach 28 and 42%. Systemic

municipio de Villa Guerrero con 470 ha (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2007). El rendimiento y calidad de tallos florales son afectados por la enfermedad conocida regionalmente como “dormilona”, causada principalmente por el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans., en campo e invernadero con incidencias entre 28 y 42% (Aquino y Sánchez, 2006). Se combate con fungicidas sistémicos del grupo de los benzimidazoles, pero su aplicación frecuente puede provocar contaminación del ambiente, favorecer la expresión de resistencia en el patógeno e incrementar los costos de cultivo (Núñez y Romero, 1980). Ello ha inducido la necesidad de probar otras estrategias de control del patógeno que no ocasionen disturbios ecológicos en el suelo, entre ellas el empleo de agentes de control biológico. El biocontrol por medio de microorganismos antagonistas representa una valiosa herramienta no química para la protección de los cultivos de clavel contra hongos patógenos del suelo (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Los agentes de biocontrol utilizados actualmente para el combate de patógenos fungosos del suelo, incluyen especies de *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Fusarium* no patógeno (Paulitz y Bélanger, 2001), que controlan los patógenos por antibiosis, competencia e hiperparasitismo (Graham y Mitchell, 1999; Weller *et al.*, 2002). La antibiosis se expresa mediante la secreción de metabolitos secundarios que inhiben el desarrollo de hongos patógenos, tales como la trichodermina (Dennis y Webster, 1971), gliovirina y gliotoxina (Howell y Stipanovic, 1995; Lumsden *et al.*, 1992; Van Tilburg y Thomas, 1993), y compuestos furanónicos antimicrobiales como la 3-(1-hexanil)-5-hidroxi-5-metil-2,5(H) furanona (Paulitz *et al.*, 2000), y la 6-pentil- α -pirona (Cooney *et al.*, 2001). La competencia se da principalmente por espacio, nutrientes y factores de crecimiento (Elad *et al.*, 1999; Graham y Mitchell, 1999; Weller *et al.*, 2002). El hiperparasitismo se expresa vía la producción de enzimas líticas como las quitinasas, β 1-3 y β 1-4 glucanasas (Graham y Mitchell, 1999; Lorito *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 2002), y proteinasas (Ait-Lahsen *et al.*, 2001), las cuales permiten la degradación de la pared celular del hospedante. Las celulasas son producidas en el suelo principalmente por hongos celulolíticos (Hayano, 1987; Rhee *et al.*, 1987) y catalizan la hidrólisis de la celulosa a D-glucosa; consecuentemente, la producción de la D-glucosa indica la actividad de hongos antagonistas en el suelo. El uso de formulados biológicos comerciales presenta algunos inconvenientes con su persistencia en el suelo, debido por un lado a las características genéticas de las cepas y condiciones del medio ambiente como lo señalan González *et al.* (1999), por ser agentes introducidos a nuevos agroecosistemas, y por el otro, a los mecanismos de defensa de los patógenos (Duffy *et al.*, 2003). Por lo anterior, se realizó un estudio con el propósito de coleccionar e identificar cepas nativas de hongos antagonistas en cultivos comerciales de clavel, evaluarlos *in vitro* como agentes de biocontrol de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, y seleccionar los mejores aislamientos en el control del patógeno para probarlos en

fungicidas are used for control of this disease. Therefore, there has been search for alternatives which do not cause ecological disturbance in soil, like the use of biological control agents (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Current biocontrol agents used against fungal soil-borne pathogens include species of antagonistic fungi like *Trichoderma*, *Gliocladium*, and nonpathogenic *Fusarium* (Paulitz and Bélanger, 2001), which control pathogens by antibiosis, competition, and hyperparasitism (Graham and Mitchell, 1999; Weller *et al.*, 2002). The use of commercial biological formulations present some drawbacks by their persistence in the soil (González *et al.*, 1999), their introduction into new agroecosystems, and defense mechanisms of pathogens (Duffy *et al.*, 2003). Therefore, a study was conducted with the objectives to collect and to identify native isolates of antagonistic fungi from carnation commercial fields, to evaluate them *in vitro* as biocontrol agents for *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, and select the best isolates as biocontrol agents of the pathogen for greenhouse evaluation.

MATERIALS AND METHODS

Plant samples and soil from the rhizosphere. During the spring and summer of 2005 fifteen samplings of plant and soil from commercial carnation fields in open field and under plastic cover distributed in five locations, were carried out in Villa Guerrero County, Mexico, where the complex “dormilona” is present. Affected fields were sampled during flowering; one sample from the central beds or rows, consisting of three plants showing initial symptoms, was taken for isolation of the pathogen; the other sample consisted of apparently healthy plants with soil adhered to the roots.

Isolation and identification of the pathogenic fungus and antagonistic fungi. Roots from diseased plants were plated on potato-dextrose-agar (PDA) after disinfection with 1% sodium hypochlorite, and incubated for 5-8 days at $26 \pm 1^\circ\text{C}$. A disc of fungal growth of 5 mm was taken and transferred to Petri plates with PDA. The pathogen was identified with pictorial keys for species of *Fusarium* (Seifert, 1996), considering colony color, reproductive structures, morphology and dimensions of micro and macroconidia. Then, a disc of fungal growth was transferred to PDA in order to have 45 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), to be used *in vitro* antagonist tests. Soil adhered to roots from 45 apparently healthy plants, was processed using sieves (40 and 60 sieves/cm²) to eliminate soil particles and plant debris. Dilutions were prepared mixing 10 g of soil in 90 mL of distilled water. Aliquots of 1 mL were placed in three PDA plates per sample and incubated at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5-8 days. Green and yellow colonies were transferred to PDA plates. The pathogen was identified by color, conidiophore morphology, morphology and dimension of conidia, using taxonomic keys for imperfect fungi (Barnett and Hunter, 1978), and species of the genus *Trichoderma* (Domsch *et al.*, 1980). Forty five native isolates of antagonistic fungi corresponding to the same number of soil samples were labeled to be used *in*

invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de planta y suelo de la rizósfera. Durante la primavera y verano del 2005 se realizaron quince muestreos de planta y suelo en lotes comerciales de clavel, a cielo abierto y bajo cubierta plástica, distribuidos en cinco localidades de Villa Guerrero, México, región donde está presente el complejo “dormilona”. Éstas se localizan entre las coordenadas 18°58'07" a 19°00'44" latitud norte y 99°39'06" a 99°42'24" longitud oeste, y altitudes de 2217 a 2445 msnm. Se caracterizan por su clima templado subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura media de 18.8°C, máxima de 39.0°C y mínima de 2.0°C; el período de lluvias inicia en el mes de mayo y concluye en los primeros días de octubre (Guadarrama, 1999). Se muestrearon cultivos de clavel en etapa de floración con presencia de la enfermedad; de cada parcela se colectaron dos muestras de las camas o surcos centrales, una compuesta de tres plantas con síntomas iniciales de la enfermedad para obtener aislamientos del patógeno, y otra de tres plantas aparentemente sanas con suelo adherido a la raíz.

Aislamiento e identificación del hongo patógeno. De las plantas enfermas se hicieron siembras de raíz desinfectada en hipoclorito de sodio al 1% en medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA marca Bioxon); las placas se incubaron durante 5 a 8 días a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ para lograr la esporulación del hongo. Se tomó un disco de crecimiento de 5 mm de la colonia con un sacabocados estéril y se transfirió a cajas de Petri con PDA para obtener cultivos uniformes. Se realizaron montajes temporales en lactofenol-azul de algodón y el patógeno se identificó empleando claves pictóricas para especies del género *Fusarium* (Seifert, 1996), tomando en cuenta la coloración de la colonia en PDA, presencia y tipo de estructuras reproductivas, así como la forma y dimensiones de los micro y macroconidios. Se tomó un disco de crecimiento de cada cultivo y se transfirió a placas de PDA para lograr 45 cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), éstas se etiquetaron para emplearlas en las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Aislamiento e identificación de los hongos antagonistas. El suelo adherido a la raíz de las 45 plantas aparentemente sanas se limpió usando tamices sobrepuestos de 40 y 60 mallas/cm² para eliminar piedras y restos vegetales. Se hicieron diluciones, mezclando 10 g de suelo en 90 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 125 mL de capacidad. Se tomó 1 mL con una pipeta para sembrar tres cajas de Petri de PDA por muestra y se incubaron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 a 8 días para lograr la esporulación de los hongos. Los crecimientos de color verde y amarillo se transfirieron a placas de PDA para obtener cultivos uniformes; los aislamientos de igual coloración se agruparon para su identificación. Se hicieron montajes temporales de estructuras reproductivas de los hongos en lactofenol-azul de algodón y se identificaron tomando en cuenta la coloración de la colonia, forma de los conidióforos, forma y dimensiones de los conidios, empleando claves

in vitro antagonistic tests.

Experimental design. Forty eight treatments were established: 45 native isolates of antagonistic fungi from Villa Guerrero (T01-T45), two commercial isolates, one of *T. harzianum* (PHC T-22) (T46) from Plant Health Care de México, and another of *T. lignorum* (Biotrol) (T47) from Biotropic, and a native isolate of *T. harzianum* (T48) from sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn from Metepec, Mexico. Each of the 48 antagonistic isolates were confronted with the 45 pathogenic fungal isolates in dual cultures, under a randomized complete block experimental design with three replications.

In vitro antagonism tests. An agar disc 5 mm diameter with fungal growth from each treatment and another one with the pathogen were placed in a PDA Petri plate separated about 6 cm from each other (Bell *et al.*, 1982), and incubated at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ for eight days; each week 360 plates were evaluated. After eight days, the following reactions were recorded: a) invasion of the pathogen's colony by the antagonist, b) growth inhibition of the pathogen's colony, and c) mutual antagonism. Radial growth of antagonist and the pathogen were measured.

Biocontrol efficiency. It was determined using the following formula: $BE = (RGA - RGP / RGA) \times 100$, adapted from Abbot's formula (Unterstenhofer, 1976); where: BE = biocontrol efficiency (%), RGA = radial growth of antagonist in cm, and RGP = radial growth of pathogen in cm.

Observations with the scanning electron microscope. Fungal growth in the invasion and inhibition zones were observed under the scanning electron microscope (JEOL JSM 59500LV) at 500 and 1000X, using a voltage of 20 KV, working distance of 10 mm, Spotsize 50.

Stablishment of the study in the greenhouse. Native isolates T20, T22, T23, T24, and T25, and commercial T47 which were outstanding in the laboratory, as well as isolates T46 and T48 were increased in PDA at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ for eight days. A conidial suspension of 5.66×10^5 CFU mL⁻¹ was inoculated onto 1 kg of wheat bran previously sterilized, and then incubated in polyethylene black bags for 21 days at room temperature in darkness. Similarly, isolate Fod FO18 of known aggressiveness, was multiplied in PDA in order to prepare a conidial suspension at 1.3×10^4 CFU mL⁻¹. A month previous to the experiment, soil was prepared in a rustic greenhouse at “El Islote”, in Villa Guerrero. Half of the area was disinfected with Metham sodium 24% (Busan 1020) at 1 L per 10 m², and the other half was not. The experiment was carried out under a completely randomized experimental design with ten treatments: eight antagonistic isolates (T20, T22, T23, T24, T25, T46, T47, T48), at 150 g m² of wheat bran inoculated, a fungicide (Methyl thiophanate) as commercial control at 1 mL per L of water and an absolute control, with four replications and 40 experimental units 1.5 m². Biological treatments were applied three days before planting (Elad *et al.*, 1981). After irrigation, carnation cuttings of cv. Red Lips were distributed in frame patterns of 20 x 20 cm, using 35 plants per experimental unit. A week later, plants and the

taxonómicas para hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1978) y especies del género *Trichoderma* (Domsch *et al.*, 1980). Se seleccionaron 45 cepas nativas de hongos antagonistas, correspondientes a igual número de muestras de suelo, se etiquetaron para usarse en pruebas de antagonismo *in vitro*.

Diseño experimental. Se probaron 48 tratamientos: las 45 cepas nativas de hongos antagonistas obtenidas de la zona florícola de Villa Guerrero (T01-T45), dos cepas comerciales, una de *T. harzianum* (PHC T-22) (T46) de la empresa Plant Health Care de México, S. de R.L. de C.V. y otra de *T. lignorum* (Biotrol) (T47) de la empresa Biotropic, S.A. de C.V., y una cepa nativa de *T. harzianum* (T48) aislada de esclerocios de *Rhizoctonia solani* Kühn en Metepec, Edo. de México. Cada una de las 48 cepas antagonistas se confrontó con las 45 del patógeno, en cultivos duales, bajo un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones, para un total de 6480 pruebas.

Pruebas de antagonismo *in vitro*. Se tomó un disco de agar de 5 mm de diámetro con crecimiento fungoso de cada tratamiento y otro del patógeno u organismo prueba; se colocaron en los extremos de una caja de Petri de PDA, separados aproximadamente 6 cm uno de otro, tal como lo indican Bell *et al.* (1982). Las cajas se incubaron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante ocho días en tandas semanales de 360 cajas. A los ocho días de la confrontación se observaron las siguientes respuestas de antagonismo: a) invasión de colonia del patógeno por el antagonista, b) detención del crecimiento de la colonia del patógeno, y c) antagonismo mutuo. También se midieron los crecimientos fungosos para determinar: crecimiento radial de la colonia del antagonista, crecimiento radial de la colonia del patógeno y diferencia de crecimiento entre ambas.

Eficiencia de biocontrol. Se determinó empleando la fórmula: $\text{EB} = (\text{CRA} - \text{CRP} / \text{CRA}) \times 100$, adaptada de la fórmula de Abbot (Unterstenhofer, 1976); donde: EB = Eficiencia de biocontrol en porcentaje, CRA = Crecimiento radial del antagonista en cm y CRP = Crecimiento radial del patógeno en cm.

Observación en el microscopio electrónico. Los crecimientos fungosos de las zonas de invasión e inhibición de los cultivos duales, se observaron en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío JEOL JSM 59500LV, propiedad del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), con una capacidad de resolución de 20 a 200,000X, usado para analizar muestras biológicas sin preparación previa. Cada muestra se observó en aumentos de 500 y 1000X, empleando un voltaje de 20 KV, distancia de trabajo de 10 mm, señal de retrodispersos y Spotsize de 50.

Establecimiento del estudio en invernadero. Las cepas nativas T20, T22, T23, T24 y T25, y comercial de *T. lignorum* (T47) sobresalientes en laboratorio, así como las dos cepas de *T. harzianum* (T46) y (T48) se incrementaron en PDA a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante ocho días. Con una suspensión de conidios de 5.66×10^5 UFC mL⁻¹ se inoculó 1 kg de salvado de trigo, previamente esterilizado en autoclave durante 60 min a 120°C y 15 libras de presión, y se incubó en bolsas de polietileno negro por 21

adyacent soil were inoculated with 7 L of Fod conidial suspension by spraying the crown with a manual sprayer. The fungicide was applied with a manual sprayer five days after application of the pathogen.

Enzymatic activity of antagonists in soil. Four series of soil samples were taken 90, 120, 150, and 180 days after planting from the rhizosphere of carnation plants in disinfected and nondisinfected soil. Samples were processed using the methodology proposed by Schinner and Von Mersi (1990) and modified by Alef y Nannipieri (1999). D-glucose production was calculated by the following equation: Equivalent glucose ($\mu\text{g g dwt}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) = $C \times v \times f / \text{sw} \times \text{dwt}$; where: C = concentration of measured glucose (μg of filtrated glucose mL⁻¹), v = volume of the test suspension (30 mL), f = dilution factor (20), sw = weight of wet soil used (10 g), and dwt = weight of 1 g of wet soil.

Statistical analysis. The results were subjected to an analysis of variance by SAS version 8 (1999), and mean comparison by DMS (Steel and Torrie, 1986).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of antagonistic fungi. Antagonistic fungi were obtained in the five locations. Isolates corresponded to *Trichoderma* spp. (24), *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz (7), *Trichoderma harzianum* Rifai (4), and *Gliocladium* spp. (10) (Table 1). The most common species *T. harzianum* was found only in one location, but the genus *Trichoderma* was present in all locations. Both species of *Trichoderma* identified in the area have been reported to be biocontrol agents of various soil pathogenic fungi (Cook and Baker, 1983; Graham and Mitchell, 1999; Mishra *et al.*, 2000; Paulitz and Bélanger, 2001), like *Fusarium* spp. (Alabouvette, 1986; Alabouvette *et al.*, 1993; Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2006; Scher and Baker, 1980).

***In vitro* antagonism tests.** Highly significant differences ($P < 0.01$) were observed between treatments for all variables-responses evaluated. From the 48 isolates tested, six of *T. lignorum* invaded the pathogen's colony during confrontation: T47 (Biotrol), T20, T22, T23, T24, and T25 (Table 2). Invasion was partial in outstanding treatments after eight days (Fig. 1A); in some cases, total coverage of the pathogen's colony occurred after 12 days. Since microscopic observation of the overposition zone only showed the presence of mycelia and conidia of *T. lignorum* (Fig. 1B), growth and formation of reproductive structures of Fod were suppressed by the antagonist or degraded by lytic enzymes. Another mechanism of antagonism was competition for space and nutrients in the culture medium by growth speed of *T. lignorum*. A different behaviour was observed in some native isolates of *Gliocladium* spp., *T. harzianum*, *T. harzianum* Metepec, and PHC T-22, which averaged few tests with this reaction (Table 2). *T. harzianum* Metepec (T48) was better stopping growth of colonies of the pathogen followed by *T. harzianum* (T41 y T42), and *Gliocladium* spp. (T10, T11, and T13). PHC T-22 (T46) had the highest number of reaction of

días a temperatura ambiente en un sitio oscuro. De la misma forma, la cepa FO18 de Fod, de probada agresividad, se multiplicó en PDA para preparar una suspensión de conidios de 1.3×10^4 UFC mL⁻¹. Un mes antes del establecimiento del estudio, se preparó el suelo de un invernadero rústico en el Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología “El Islote”, Villa Guerrero, México, con suelo de textura franca (51% arena, 32% limo y 17% arcilla), pH de 5.7, contenido de materia orgánica de 4.5%, fósforo, 79.22 ppm, potasio, 365 ppm, calcio, 1881.5 ppm, y magnesio, 181 ppm. La mitad de la superficie se desinfectó con metan sodio al 24% (Busan 1020) en dosis de 1 L por 10 m², y la otra se dejó sin desinfectar. Después de 21 días se conformaron cuatro camas de plantación de 32 m de largo por 1 m de ancho y pasillos de 60 cm de ancho. El experimento se realizó, tanto en suelo sin desinfectar como en suelo desinfectado, bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con diez tratamientos: ocho cepas antagonistas (T20, T22, T23, T24, T25, T46, T47, T48), en dosis de 150 g de salvado inoculado por m², un fungicida (tiofanato metílico) como testigo comercial a razón de 1 mL por L de agua y un testigo absoluto, con cuatro repeticiones y 40 unidades experimentales de 1.5 m². Los tratamientos biológicos se aplicaron tres días antes de la plantación de acuerdo con Elad *et al.* (1981). Luego de un riego se plantaron esquejes de clavel cv. Red Lips en marcos de plantación de 20 x 20 cm, 35 plantas por unidad experimental. Una semana después se inocularon las plantas y el suelo adyacente con 7 L de la suspensión de conidios de Fod, mediante aspersión dirigida al cuello de éstas con una aspersora manual en suelo previamente humedecido. El fungicida se aplicó con una aspersora manual, cinco días después de la inoculación con el patógeno, en aspersión dirigida al cuello de las plantas.

Actividad enzimática de los antagonistas en el suelo. Se tomaron cuatro series de muestras de suelo de la rizósfera de las plantas de clavel cultivadas en suelo sin desinfectar y en suelo desinfectado a los 90, 120, 150 y 180 días de la plantación. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Análisis de Suelos del ICAMEX empleando la metodología propuesta por Schinner y Von Mersi (1990) y modificada por Alef y Nannipieri (1999). La D-glucosa producida se calculó empleando la siguiente ecuación: Glucosa equivalente ($\mu\text{g g dwt}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) = $C \times v \times f / sw \times dwt$; donde: C es la concentración de glucosa medida (μg de glucosa filtrada mL⁻¹), v es el volumen de la suspensión de prueba (30 mL), f es el factor de dilución (20), sw es el peso de suelo húmedo usado (10 g), y dwt, es el peso de 1 g de suelo húmedo.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos de los estudios de laboratorio e invernadero se sometieron a un análisis de varianza empleando el Sistema de Análisis Estadístico SAS versión 8 (1999) y la comparación de promedios se hizo mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) (Steel y Torrie, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mutual antagonism, followed by *Trichoderma* spp. (T30, T01), and *T. harzianum* (T41, T43, T42) (Table 2). Growth of these isolates was lower than those which showed good overposition and stopped the pathogen's growth, giving rise to formation of an inhibition halo between growth of the antagonist and the pathogen, and degradation of mycelium of the first (Fig. 1C). Microscopic observation showed scarce conidia production by *T. harzianum*, as well as presence of microconidia and chlamydospores of Fod in the periphery of the inhibition zone (Fig. 1D). Although mycelium degradation of the antagonist indicated lytic activity by Fod, which has the ability to parasitize *T. harzianum* liberating lytic enzymes, chitinases and cellulases; it also liberates toxins like fusaric acid which inhibits mycelial growth of the antagonist (Duffy *et al.*, 2003).

Radial growth and biocontrol. The greatest radial growth corresponded to T20, T22, T23, T24 y T25 from *T. lignorum* (Table 3), which induced less radial growth of Fod, and showed a biocontrol efficiency ranging from 62.17 to 65.39%. On the contrary, native isolates of *Trichoderma* spp. (T30, T05, and T20) and *T. harzianum* (T42) allowed the greatest radial growth of the pathogen; they had the greatest number of tests with mutual antagonism and the lowest biocontrol efficiency (42.08 to 43.65%).

Enzymatic activity of antagonists in soil. Biotrol showed cellulolytic activity in the plant rhizosphere producing D-glucose which was significantly greater than the control in nondisinfected and in disinfected soil; isolate T25 of *T. lignorum* was outstanding only in nondisinfected soil. The cellulolytic activity of the rest of isolates was statistically similar to the control under both conditions. In disinfected soil, production of D-glucose in treatments with *T. harzianum* Metepec and the fungicide Methyl thiophanate was statistically lower than production by the native and commercial isolates of *T. lignorum* and isolate PHC T-22 (Table 4). There was enzymatic activity in the control and the fungicide treatment in both soil conditions, which could be attributed to contamination of these treatments with propagules of the antagonists applied, due to the random distribution of treatments or to the cellulolytic activity of other microorganisms in the rhizosphere by the high organic matter content (4.5%) of soil in the greenhouse. This masks the real extracellular production of lytic enzymes by the antagonists in the soil of the greenhouse, condition that is easier to prove *in vitro* (Guigón-López and González-González, 2004; Sánchez *et al.*, 2007). However, the results obtained confirm the production of lytic enzymes by the native and commercial isolates of *T. lignorum* and *T. harzianum*, which is an important mechanism for biocontrol of Fod. The studies carried out in the laboratory and in the greenhouse proved the ability of native isolates of *T. lignorum*: T20, T22, T23, T24, and T25, to develop antagonistic and enzymatic activity which allowed them to act upon Fod.

End of the abbreviated article.

Cuadro 1. Relación de cepas de hongos antagonistas aislados de cultivos comerciales de clavel (*Dianthus caryophyllus*) por sitio de muestreo en la zona florícola de Villa Guerrero, México.

Table 1. Relation of fungal antagonists isolated from commercial carnation (*Dianthus caryophyllus*) fields by sampling site in the flower-producing region of Villa Guerrero, Mexico.

Antagonista	Designación	Localidad en donde se aisló
<i>Trichoderma</i> spp.	T01, T02, T03, T31, T32, T33	San Miguel
”	T04, T05, T06, T07, T08, T14	Santa María Arantzazú
”	T26, T27, T28, T29, T30	San José los Ranchos
”	T34, T36, T37, T38, T39	Zacango la Baja
”	T44, T45	El Islote
<i>Trichoderma lignorum</i>	T20, T21, T22, T23, T24, T25	San José los Ranchos
”	T35	Zacango la Baja
<i>Trichoderma harzianum</i>	T40, T41, T42, T43	El Islote
<i>Gliocladium</i> spp.	T09, T10, T11, T12, T13, T15, T16, T17, T18	Santa María Arantzazú
”	T19	San José los Ranchos

Aislamiento e identificación de los hongos antagonistas. En las cinco localidades se obtuvieron aislamientos de hongos antagonistas asociados a la rizósfera de plantas de clavel. Las cepas correspondieron a *Trichoderma* spp. (24), *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz (7), *Trichoderma harzianum* Rifai (4) y *Gliocladium* spp. (10) (Cuadro 1). Estos

resultados están de acuerdo con lo encontrado por Núñez y Romero (1980), Guigón-López y González-González (2004), Michel-Aceves *et al.* (2006) y Sánchez *et al.* (2007), quienes obtuvieron cepas nativas de *Trichoderma* spp. de la rizósfera de clavel y de otros cultivos. Los ecosistemas agrícolas contienen gran cantidad y diversidad de microorganismos

Cuadro 2. Valores promedio de pruebas con invasión de colonia, detención de crecimiento y antagonismo mutuo de cepas nativas y comerciales de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. vs *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* a los ocho días de cultivo en papa-dextrosa-agar.

Table 2. Average values of colony invasion tests, growth stop, and mutual antagonism of native and commercial isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. vs *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, after eight days in potato-dextrose-agar cultures.

Tratamiento	Cepa	Invasión de colonia	Detención de crecimiento	Antagonismo mutuo
T47	Biotrol (<i>Trichoderma lignorum</i>)	40.0 a	4.0 x	1.0 m
T22	<i>T. lignorum</i>	33.0 b	10.0 w	2.0 klm
T23	”	30.0 c	14.0 v	1.0 m
T20	”	29.0 cd	14.0 v	2.0 klm
T25	”	28.0 d	15.3 uv	1.7 lm
T24	”	28.0 d	15.0 uv	2.0 klm
T21	”	26.0 e	17.0 stu	2.0 klm
T06	<i>Trichoderma</i> spp.	25.7 ef	15.3 uv	4.0 hij
T28	”	25.0 efg	17.0 stu	3.0 jkl
T01	”	17.7 ml	19.0 rs	8.3 bc
T29	”	11.0 qr	27.3 ghij	6.7 def
T30	”	11.0 qr	25.3 jkl	8.7 b
T13	<i>Gliocladium</i> spp.	9.7 rs	30.3 def	5.0 gh
T10	”	9.7 rs	32.3 cd	3.0 jkl
T43	<i>T. harzianum</i>	9.7 rs	27.3 ghij	8.0 bcd
T11	<i>Gliocladium</i> spp.	9.0 s	31.3 cde	4.7 hi
T48	<i>T. harzianum</i> Metepec	4.0 t	36.0 a	5.0 gh
T41	<i>T. harzianum</i>	3.7 t	33.3 bc	8.0 bcd
T42	”	3.0 t	35.0 ab	7.0 cde
T46	PHC T-22 (<i>T. harzianum</i>)	0.0 u	21.0 pqr	24.0 a

Letras iguales en la columna no difieren estadísticamente (DMS, $p = 0.05$).

benéficos (Duffy *et al.*, 2003), por lo que no es raro que se hayan aislado hongos antagonistas de todas las muestras colectadas. La especie más común *T. harzianum* (Samuels, 1996), sólo se encontró en una localidad, pero, el género *Trichoderma* está presente en todas las localidades, lo que resalta su amplia distribución (Woo *et al.*, 2006). Las dos especies de *Trichoderma* identificadas en la zona han sido reportadas como agentes de biocontrol de diversos hongos patógenos del suelo (Cook y Baker, 1983; Graham y Mitchell, 1999; Mishra *et al.*, 2000; Paulitz y Bélanger, 2001), como *Fusarium* spp. (Alabouvette, 1986; Alabouvette *et al.*, 1993; Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2006; Núñez y Romero, 1980;

Scher y Baker, 1980). A diferencia de *Gliocladium* spp., los hongos del género *Trichoderma* son los que más se han estudiado en el biocontrol de hongos patógenos del suelo, debido a su amplia distribución en los suelos del mundo (Harman, 2006; Samuels, 1996; Woo *et al.*, 2006), y mayor rango de hospedantes (Paulitz y Bélanger, 2001).

Pruebas de antagonismo *in vitro*. Se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos para todas las variables-respuesta evaluadas en las pruebas de antagonismo. De las 48 cepas probadas, seis de *T. lignorum* invadieron claramente la colonia del patógeno durante la confrontación: T47 (aislamiento comercial Biotrol), T20, T22,

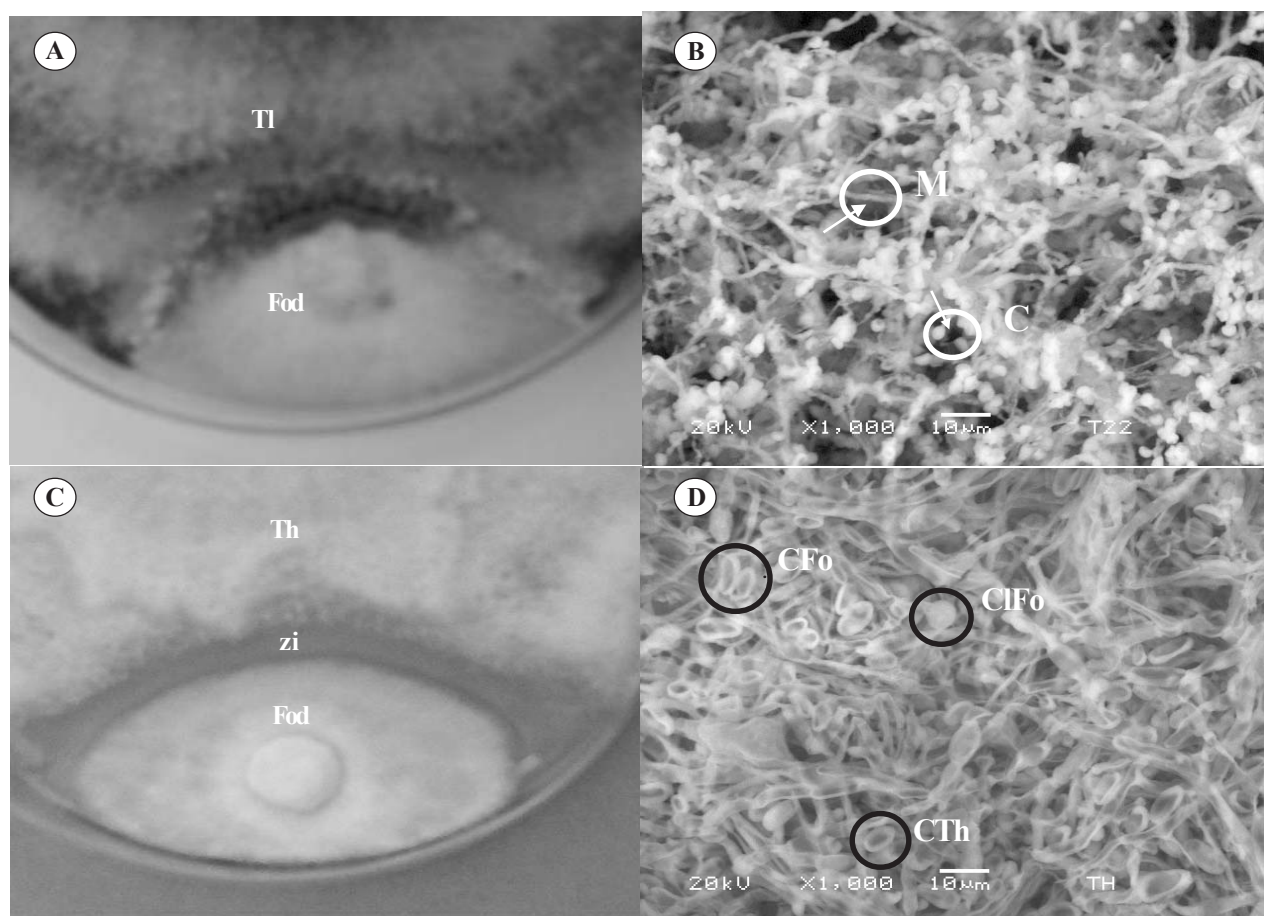


Fig. 1. A. Observación en microscopio estereoscópico de la invasión parcial de la colonia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) por *Trichoderma lignorum* (Tl) a los ocho días de cultivo en papa-dextrosa-agar (PDA) (10X). B. Observación en microscopio electrónico de barrido del crecimiento (M) y esporulación (C) de *T. lignorum* (T22) en la zona de invasión (1000X). C. Observación en microscopio estereoscópico del antagonismo mutuo y zona de inhibición (zi) entre las colonias de Fod y *Trichoderma harzianum* (Th) a los ocho días de cultivo en PDA (10X). D. Observación en microscopio electrónico de barrido de la esporulación de *T. harzianum* PHC T-22 (CTh), presencia de conidios (CFo) y clamidosporas (ClFo) de Fod (1000X).

Fig. 1. A. Observation under a dissecting microscope of partial invasion of a colony of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) by *Trichoderma lignorum* (Tl) after eight days in potato-dextrose-agar (PDA) cultures (10X). B. Observation under a scanning electron microscope of growth (M) and sporulation (C) by *T. lignorum* (T22) in the invasion zone (1000X). C. Observation under a dissecting microscope of the mutual antagonism and the inhibition zone (zi) between colonies of Fod and *Trichoderma harzianum* (Th) after eight days in PDA cultures (10X). D. Observation under a scanning electron microscope of sporulation by *T. harzianum* PHC T-22 (CTh), presence of conidia (CFo) and chlamydospores (ClFo) of Fod (1000X).

Cuadro 3. Valores promedio de crecimiento radial de las cepas nativas y comerciales de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp., y eficiencia de biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* a los ocho días de cultivo en papa-dextrosa-agar.

Table 3. Average radial growth values of native and commercial isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., and their biocontrol efficiency of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* after eight days in potato-dextrose-agar cultures.

Tratamiento	Cepa	CRA (cm) ^y	CRP (cm)	DC (cm)	EB (%)
T23	<i>T. lignorum</i>	6.28 a ^z	2.21 k	4.06 a	64.81
T25	"	6.27 a	2.17 k	4.11 a	65.39
T22	"	6.22 a	2.27 jk	3.62 c	63.50
T20	"	6.20 a	2.29 ijk	3.93 ab	63.06
T24	"	6.16 a	2.33 hijk	3.86 b	62.17
T45	<i>Trichoderma</i> spp.	5.95 b	2.55 fghij	3.44 cd	57.14
T19	<i>Gliocladium</i> spp.	5.92 bc	2.56 efghi	3.38 d	56.76
T21	<i>T. lignorum</i>	5.87 bcd	2.36 ghijk	3.96 ab	59.79
T46	<i>T. harzianum</i> (T-22)	5.87 bcd	2.62 defghi	3.25 de	55.37
T13	<i>Gliocladium</i> spp.	5.82 bcde	2.66 cdefghi	3.18 ef	54.29
T44	<i>Trichoderma</i> spp.	5.79 cdef	2.71 cdefgh	3.11 efg	53.19
T48	<i>T. harzianum</i> Metepec	5.52 lmnpqrs	2.99 bcd	2.56 stuv	45.83
T43	<i>T. harzianum</i>	5.52 lmnpqrs	2.95 bcdef	2.67 opqrstuv	46.56
T08	<i>Trichoderma</i> spp.	5.52 lmnpqrs	2.98 bcd	2.60 rstu	46.01
T31	"	5.51 mnopqrs	2.98 bcd	2.62qrst	45.92
T32	"	5.50 nopqrs	2.98 bcd	2.71 mnop	45.82
T02	"	5.50 nopqrs	2.96 bcde	2.58 stuv	46.18
T41	<i>T. harzianum</i>	5.47 opqrs	2.99 bcd	2.48 uv	45.34
T05	<i>Trichoderma</i> spp.	5.43 qrs	3.09 a	2.65 opqrs	43.09
T42	<i>T. harzianum</i>	5.43 qrs	3.06 ab	2.50 tuv	43.65
T29	<i>Trichoderma</i> spp.	5.41 rs	3.08 ab	2.48 v	43.07
T30	"	5.37 s	3.11 a	2.57 v	42.08

^yCRA = crecimiento radial del antagonista; CRP = crecimiento radial del patógeno; DC = diferencia de crecimiento; EB = eficiencia de biocontrol.

^zLetras iguales en la columna no difieren estadísticamente (DMS, $p = 0.05$).

T23, T24 y T25 (Cuadro 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Guigón-López y González-González (2004), Michel-Aceves *et al.* (2001 y 2006) y Sánchez *et al.* (2007), quienes observaron inhibición de crecimiento de micelio y sobreposición de las colonias de *Phytophthora capsici* Leonian, *F. oxysporum* y *F. subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas, y *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn. por el crecimiento de las cepas nativas de *Trichoderma* spp., respectivamente, atribuyendo este modo de acción al micoparasitismo; pero, difieren parcialmente de lo consignado por Guigón-López y González-González (2004), que encontraron invasiones totales de las colonias del patógeno por el antagonista, situación que no se dio en este estudio, ya que la invasión fue parcial en los tratamientos sobresalientes a los ocho días de la prueba (Fig. 1A), sólo en algunos casos se notó cubrimiento total de la colonia del patógeno a los 12 días de incubación. Dado que la observación microscópica de la zona de sobreposición únicamente mostró la presencia de micelio y conidios de *T. lignorum* (Fig. 1B), el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas de Fod fueron suprimidos por el antagonista (Guigón-López y González-González, 2004), o bien, degradados por la acción de enzimas líticas de la pared celular

como las quitinasas y celulasas (Graham y Mitchell, 1999; Lorito *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 2002). Otro mecanismo de antagonismo fue la competencia por espacio y nutrientes en el medio de cultivo por la velocidad de crecimiento de la colonia de *T. lignorum* (Benhamou y Chet, 1993; Elad *et al.*, 1999; Graham y Mitchell, 1999; Weller *et al.*, 2002). Un comportamiento diferente se observó en algunas cepas nativas de *Gliocladium* spp., *T. harzianum* y *T. harzianum* Metepec y la cepa comercial PHC T-22, que promediaron pocas pruebas con esta respuesta (Cuadro 2). El aislamiento de *T. harzianum* Metepec (T48) fue significativamente mejor en la detención del crecimiento de las colonias del patógeno, seguido de *T. harzianum* (T41 y T42) y *Gliocladium* spp. (T10, T11 y T13). En éstos se observó un rápido crecimiento del micelio como consecuencia del mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio de cultivo, ocupando mayor espacio en la placa, lo cual detuvo el crecimiento del patógeno; el mecanismo de antagonismo fue de competencia tal como lo mencionan Benhamou y Chet (1993), Elad *et al.* (1999), Graham y Mitchell (1999) y Weller *et al.* (2002). El tratamiento con mayor número de respuestas de antagonismo mutuo fue el aislamiento comercial de PHC T-22 (T46), seguido de *Trichoderma* spp. (T30, T01), y *T. harzianum* (T41, T43, T42)

Cuadro 4. Producción de D-Glucosa por la actividad celulolítica de cepas nativas y comerciales de *Trichoderma lignorum* y *T. harzianum* probadas para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavel (*Dianthus caryophyllus*) bajo invernadero.

Table 4. Production of D-Glucose by the cellulolytic activity of native and commercial isolates of *Trichoderma lignorum* and *T. harzianum*, evaluated for biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation (*Dianthus caryophyllus*) under greenhouse conditions.

Cepa/producto	D-Glucosa (ppm)	D-Glucosa (ppm)
	en suelo sin desinfección	en suelo con desinfección
T20 (<i>T. lignorum</i>)	4.04 ab	3.33 ab
T22 (<i>T. lignorum</i>)	3.93 ab	3.80 ab
T23 (<i>T. lignorum</i>)	4.31 ab	4.10 ab
T24 (<i>T. lignorum</i>)	4.39 ab	4.60 ab
T25 (<i>T. lignorum</i>)	4.45 a	4.36 ab
TM (<i>T. harzianum</i> Metepec)	3.76 ab	3.05 b
Biotrol (<i>T. lignorum</i>)	4.55 a	4.80 a
T-22 (<i>T. harzianum</i>)	4.26 ab	4.43 ab
Tiofanato metílico pH 70	3.35 ab	2.99 b
Testigo	3.21 b	4.43 ab

Letras iguales en la columna no difieren estadísticamente (DMS, $p = 0.05$).

(Cuadro 2). El crecimiento de estas cepas fue menor que el de las sobresalientes en sobreposición y detención de crecimiento, dando origen a la formación de un halo de inhibición entre los crecimientos del antagonista y el patógeno, y degradación del micelio del primero (Fig. 1C). La observación microscópica mostró escasa producción de conidios de *T. harzianum*, y presencia de microconidios y clamidosporas de Fod en la periferia de la zona de inhibición (Fig. 1D). Esta respuesta pudo deberse al desarrollo de mecanismos de defensa del patógeno, el antagonista, o ambos (Dennis y Webster, 1971; Elad *et al.*, 1999; Howell y Stipanovic, 1995). Aunque, la degradación del micelio del antagonista indicó actividad lítica de Fod, el cual tiene la capacidad de parasitar a *T. harzianum* liberando enzimas como quitinasas y celulasas; también libera toxinas como el ácido fusárico que inhiben el crecimiento micelial del antagonista (Duffy *et al.*, 2003).

Crecimiento radial y biocontrol. Los mayores crecimientos radiales correspondieron a los tratamientos T20, T22, T23, T24 y T25 de *T. lignorum* (Cuadro 3), los cuales provocaron un menor crecimiento radial de Fod y lograron eficiencias de biocontrol del patógeno que oscilaron entre 62.17 y 65.39%; estos tratamientos presentaron mayor cantidad de pruebas con invasión de colonia, debido a su velocidad de crecimiento y mecanismos de antagonismo como micoparasitismo y competencia (Benhamou y Chet, 1993; Elad *et al.*, 1999; Graham y Mitchell, 1999; Harman, 2006). Por el contrario, los tratamientos que permitieron mayor crecimiento radial del patógeno fueron tres aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. (T30, T05 y T20) y uno de *T. harzianum* (T42); éstos tuvieron mayor número de pruebas con antagonismo mutuo

y menor eficiencia de biocontrol de Fod (42.08 a 43.65%), debido posiblemente a los mecanismos de defensa del patógeno (Duffy *et al.*, 2003).

Actividad enzimática de los antagonistas en el suelo. El aislamiento de Biotrol mostró actividad celulolítica en la rizósfera de la planta de clavel con producción de D-glucosa significativamente mayor al testigo, tanto en suelo sin desinfección como en suelo desinfectado; la cepa nativa T25 de *T. lignorum* sobresalió únicamente en suelo sin desinfectar. La actividad celulolítica de las cepas restantes fue estadísticamente igual a la del testigo en ambas condiciones. En suelo desinfectado, la producción de D-glucosa en los tratamientos de *T. harzianum* Metepec y el fungicida tiofanato metílico fue estadísticamente menor a la producida por las cepas nativas y comerciales de *T. lignorum* y la cepa comercial PHC T-22 (Cuadro 4). Estos resultados se relacionan parcialmente con los reportados por Sánchez *et al.* (2007), quienes observaron la producción de glucanasas por las cepas nativas de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai probadas contra el patógeno *Thielaviopsis paradoxa*; dicha producción contribuyó a la degradación de las hifas del hongo en condiciones de laboratorio. En nuestro estudio, existió actividad enzimática en el testigo y el tratamiento fungicida en las dos condiciones de suelo, lo cual puede atribuirse a la contaminación de las unidades experimentales de estos tratamientos con los propágulos de los antagonistas aplicados, a causa de la distribución aleatoria de los tratamientos; o bien, a la actividad celulolítica de otros microorganismos competidores en la rizósfera por el alto contenido de materia orgánica (4.5%) del suelo del invernadero, que puede soportar una abundante población

microbiana lítica (Graham y Mitchell, 1999; Weller *et al.*, 2002). Esto enmascara la verdadera producción extracelular de enzimas líticas por los antagonistas en el suelo del invernadero, condición que es más fácil de probar *in vitro* (Guigón-López y González-González, 2004; Sánchez *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos confirman la producción de enzimas líticas por las cepas nativas y comerciales de *T. lignorum* y *T. harzianum* en la rizósfera de las plantas de clavel, mecanismo importante para el biocontrol de Fod. Lo anterior demuestra que a pesar del uso indiscriminado de plaguicidas en la zona florícola de Villa Guerrero, los suelos cultivados con clavel contienen especies de hongos antagonistas, que pueden jugar un importante papel en la sanidad de las plantas y productividad de los cultivos. Los estudios de laboratorio e invernadero probaron la habilidad de las cepas nativas de *T. lignorum*: T20, T22, T23, T24 y T25, para desarrollar actividad antagónica y enzimática que les permitió actuar sobre Fod. La capacidad de estas cepas para invadir y sobrecrecer al patógeno es de importancia para nuevas investigaciones en el manejo de la “dormilona”. La confirmación de la presencia de hongos antagonistas en el suelo y rizósfera de clavel y su capacidad de biocontrol del patógeno, abre la posibilidad del uso de las cepas sobresalientes en la protección del cultivo contra la enfermedad, así como fomentar el control biológico de los patógenos del suelo y contribuir en la reducción de la aplicación de plaguicidas en la zona. Pero, es necesario continuar con el estudio de estos agentes de biocontrol para conocer aspectos como sobrevivencia en suelo, colonización de la raíz y eficiencia de control de la enfermedad en invernadero, para asegurar su éxito en campo, ya que son microorganismos cuya actividad y eficiencia de control de los patógenos están sujetas a las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo.

Agradecimientos. Esta investigación fue financiada por la Fundación Produce Estado de México y forma parte del proyecto interdisciplinario “Control biológico de la pudrición del tallo del clavel en el municipio de Villa Guerrero” con No. de Folio 15-2005-0650.

LITERATURA CITADA

- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M.J., De la Cruz, J., Monte, E., and Llobell, A. 2001. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5833-5839.
- Alavouvette, C. 1986. *Fusarium* wilt-suppressive soils from the Chateurenard region: revive of a 10-year study. *Agronomie* 6:273-284.
- Alavouvette, C., Lemanceau, P., and Steinberg, C. 1993. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticide Science* 37:365-373.
- Alef, K., and Nannipieri, P. 1999. Chitinase activity. pp. 360-361. In: K. Alef and P. Nannipieri (eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. New York, USA. 462 p.
- Aquino, M.J.G. y Sánchez, M.G. 2006. Distribución, incidencia y severidad de la “dormilona” del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en la zona florícola de Villa Guerrero, México. Informe de Investigación. ICAMEX. Metepec, Edo. de México. 15 p.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1978. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th. ed. MacMillan Publishing Co. New York, USA. 217 p.
- Bell, D.K., Wells, H.D., and Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
- Benhamou, N., and Chet, I. 1993. Cytology and histology. Hiphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83:1062-1071.
- Cook, R.J., and Baker, K.F. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 539 p.
- Cooney, J.M., Lauren, D.R., and Di Menna, M.E. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:522-526.
- Dennis, C., and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotic. *Transactions of the British Mycological Society* 57:25-39.
- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.H. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Vol. I. London Academic, London, UK. 859 p.
- Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41:501-538.
- Elad, Y., Hadar, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1981. Biological control of *Trichoderma harzianum* in carnation. *Plant Disease* 65:675-677.
- Elad, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A., and Kirshner, B. 1999. *Trichoderma harzianum* T-39 -mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. pp. 459-467. In: H. Lyr (ed.). *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*. Andover, Hants, UK. 505 p.
- González, S.C.H., Puertas, A.A., Fonseca, F.M., Suárez, S.E. y Blaya, G.R. 1999. Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* Sor. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 16:167-173.
- Graham, J.H., and Mitchell, D.J. 1999. Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes. pp. 427-46. In: D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P. G. Hartel, and D.A. Zuberer (eds.). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall Upper Saddle River. New Jersey, USA. 550 p.

- Guadarrama, G.R. 1999. Monografía Municipal de Villa Guerrero. Gobierno del Estado de México, Instituto Mexiquense de Cultura. Toluca, Edo. de México. 160 p.
- Guigón-López, C. y González-González, P.A. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 22:117-124.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.
- Hayano, K. 1987. Characterization of a phosphodiesterase component in a forest soil extract. Biology and Fertility Soils 3:159-164.
- Howell, C.R., and Stipanovic, R.D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. Phytopathology 85:469-472.
- Lorito, M., Woo, S.L., D'Ambrosio, M., Harman, G.E., and Hayes, C.K. 1996. Synergistic interactions between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. Molecular Plant-Microbe Interactions 9:206-213.
- Lumsden, R.D., Ridout, C.J., Vendemia, M.E., Harrison, D.J., Waters, R.M., and Walter, J.F. 1992. Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Canadian Journal of Microbiology 38:1274-1280.
- Mishra, P.K., Mukhopadhyay, A.N., and Fox, R.T.V. 2000. Integrated and biological control de gladiolus corm rot and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Annals of Applied Biology 137:361-364.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Díaz-Castro, A. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19:154-167.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Díaz-Castro, A. 2006. *Trichoderma harzianum* y *T. lignorum* en el control biológico de la escoba de bruja del mango. pp. 407-409. En: XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, México. 581 p.
- Núñez, C.R.D. y Romero, C.S. 1980. Estudio sobre control biológico de *Fusarium roseum* (LK) Snyder y Hansen, causante principal de la "dormilona del clavel" en Villa Guerrero, Estado de México. Agrociencia 39:25-33.
- Paulitz, T.C., and Bélanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39:103-133.
- Paulitz, T.C., Nowat-Thompson, B., Gamard, P., Tsang, E., and Loper, J. 2000. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. Journal of Chemical Ecology 26:1515-1524.
- Rhee, Y.H., Hah, Y.C., and Hong, S.W. 1987. Relative contributions of fungi and bacteria to soil carboxymethylcellulase activity. Soil Biology and Biochemistry 19:479-481.
- Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma* ; systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195-206.
- Sánchez, V., Rebolledo, O., Picaso, R.M., Cárdenas, E., Córdova, J., González, O., and Samuels, G.J. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. Mycopathologia 163:49-58.
- SAS. 1999. Statistical Analysis System version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Scher, F.M., and Baker, R. 1980. Mechanism of biological control in *Fusarium*-suppressive soil. Phytopathology 70:412-417.
- Schinner, F., and Von Mersi, W. 1990. Xylanase-, CM-cellulase- and invertase activity in soil: and improved method. Soil Biology and Biochemistry 22:511-515.
- Seifert, K. 1996. Fuskey. *Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada. Ottawa, Ontario. 65 p. <http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>.
- Secretaría de Desarrollo Agropecuario. 2007. Cierre Agrícola 2006. Principales Indicadores Básicos Florícolas 2006. Gobierno del Estado de México. Metepec, Edo. de México. 10 p.
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw-Hill. México, D.F. 622 p.
- Unterstenhofer, G. 1976. The Basic Principles of Crop Protection Field Trials. Pflanzenschutz-Nachrichten. Bayer 29:83-180.
- Van Thilburg, A.U.B., and Thomas, M.D. 1993. Production of extracellular proteins by the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Applied and Environmental Microbiology 59:236-242.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden, G.B.B., and Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 40:309-348.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology 96:181-185.