




Antagonismo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *Nicotiana tabacum*

Antagonism of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on isolates of *Fusarium* spp. from *Nicotiana tabacum*

Antagonismo de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* em isolados de *Fusarium* spp. de *Nicotiana tabacum*

Wilson Geobel Ceiro-Catasú^{1*}, Yusel Vega-González¹, María Eulalia Taco-Sánchez², Ramiro Remigio Gaibor-Fernández³, Oandis Sosa-Sánchez¹

¹Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba. Carretera a Manzanillo Km 17^{1/2} Peralejo - Apartado 21 - Bayamo M. N. CP 85100. Correo electrónico: (WC) wceiroc@gmail.com,  (OS) oandis.sosa@gmail.com, . ²Empresa JATUNCUY, Ecuador. Provincia Cotopaxi. Correo electrónico: eulaliataco@gmail.com, .

³Docente de la Carrera de Agronomía, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. Ave. Carlos J. Arosemena 38, Quevedo, Ecuador. Correo electrónico: rgaibor@uteq.edu.ec,

.

Resumen

La producción tabacalera es un renglón fundamental en la economía cubana y genera el mayor ingreso en el sector agrícola. Dentro de los fitopatógenos que afectan a esta planta, *Fusarium* spp., constituye una plaga de interés, debido a las afectaciones vasculares que provocan deterioro del valor comercial de la hoja. Por tanto, la investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad antagonista *in vitro* de cepas autóctonas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* sobre aislados de *Fusarium oxysporum* y *F. phyllophylum*, procedentes de *Nicotiana tabacum* L. en la provincia Granma, Cuba. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, Universidad de Granma. Se preparó medio agar papa dextrosa para establecer los cultivos duales de *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. Una vez establecidos los tratamientos y transcurrido el

Recibido: 07-12-2020 • Aceptado: 22-02-2021

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: wceiroc@gmail.com

tiempo de incubación se procedió a determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, la capacidad antagonica y la actividad micoparasítica. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro réplicas por tratamiento y para el procesamiento estadístico se usó un ANOVA bifactorial y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Se evidenció que las cepas de *Trichoderma* spp., registraron valores intermedios de inhibición del hongo, la competitividad del antagonista se ubicó mayoritariamente en la clase dos de la escala de Bell y se constató que, penetración, enrollamiento, vacuolización, deformación y granulación constituyen las principales formas de micoparasitismo. Lo cual señala a este método de biocontrol como una alternativa a tener en cuenta para el manejo de *Fusarium* spp., en agroecosistemas tabacaleros.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., antagonismo, antibiosis, micoparasitismo, tabaco, fusariosis.

Abstract

Tobacco production is a key line in the Cuban economy and generates the largest income in the agricultural sector. Within phytopathogens affecting this plant, *Fusarium* spp., constitutes a pest of interest, due to vascular involvements that cause deterioration of the commercial value of the leaf. Therefore, the research was carried out with the aim of determining the antagonistic activity *in vitro* of native strains of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* on isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. phyllophylum*, from *Nicotiana tabacum* L. in Granma province, Cuba. The work was carried out at the Laboratory of Agricultural Microbiology, University of Granma. Half dextrose potato agar was prepared to establish the dual crops of *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. Once the treatments were established and the incubation time had elapsed, the percentage inhibition of mycelial growth, antagonistic capacity and mycoparasitic activity was determined. A fully randomized design with four replicas per treatment was used and a two factorial ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$) were used for statistical processing. It was shown that the strains of *Trichoderma* spp., recorded intermediate values of phytopathogenic inhibition, the competitiveness of the antagonist was mostly located in class two of the Bell scale and it was found that penetration, winding, vacuolization, deformation and granulation constitute the main forms of mycoparasitism. Which points to this biocontrol method as an alternative to consider for the management of *Fusarium* spp., in tobacco agroecosystems.

Key words: *Trichoderma* spp., antagonism, antibiosis, mycoparasitism, tobacco, fusariosis.

Resumo

A produção de tabaco é uma linha-chave na economia cubana e gera o maior rendimento do sector agrícola. Dentro dos fitopógenos que afetam esta planta, a *Fusarium* spp., constitui uma praga de interesse, devido a envolvimento

vasculares que causam a deterioração do valor comercial da folha. Por conseguinte, a investigação foi realizada com o objetivo de determinar a atividade antagónica *in vitro* de estirpes nativas de *Trichoderma harzianum* e *T. viride* em isolados de *Fusarium oxysporum* e *F. phyllophylum*, de *Nicotiana tabacum* L. na província de Granma, Cuba. O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade de Granma. Metade dextrose batata agar estava preparado para estabelecer as duplas culturas de *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. Uma vez estabelecidos os tratamentos e decorrido o tempo de incubação, foi determinada a percentagem de inibição do crescimento micémico, da capacidade antagónica e da atividade micoparasitótica. Foi utilizado um desenho totalmente aleatório com quatro réplicas por tratamento e um teste de ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$) para processamento estatístico. Foi demonstrado que as estirpes de *Trichoderma* spp., registaram valores intermédios de inibição fitopogénica, a competitividade do antagonista situava-se principalmente na classe dois da escala de Sino e verificou-se que a penetração, o enrolamento, a vacuolização, a deformação e a granulação constituem as principais formas de micoparasitose. O que aponta este método de biocontrolo como uma alternativa a considerar para a gestão da *Fusarium* spp., nos agroecossistemas de tabaco.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp., antagonismo, antibiose, micoparasitismo, tabaco, fusariose.

Introducción

La provincia Granma es un territorio eminentemente agropecuario ubicado al este de Cuba, donde se establecen diferentes cultivos de interés económico como caña azúcar, arroz, café, pastos, tabaco, entre otros. En el caso específico del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), una parte considerable de sus producciones se destinan a la fabricación y la exportación del puro cubano, reconocido internacionalmente por su excelente calidad. No obstante, esta planta puede ser afectada por diferentes organismos plagas, entre ellos destacan los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *F. phyllophylum* Nirenberg & O'Donnell, causante de infecciones vasculares que afectan el valor comercial del tabaco, el cual radica en la calidad de

Introduction

The province of Granma is an eminently agricultural territory located in the east of Cuba, where different crops of economic interest are established such as, sugar cane, rice, coffee, pastures, and tobacco, among others. In the specific case of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), a considerable part of its productions are destined to the manufacture and the exportation of Cuban cigars, internationally recognized for their excellent quality. However, this plant can be affected by different pest organisms, among them the phytopathogenic *Fusarium oxysporum* Schltdl. and *F. phyllophylum* Nirenberg & O'Donnell, which cause vascular infections that affect the commercial value of tobacco, which depends on the quality of its

sus hojas y por tanto, todo aquello que las afecte es importante investigarlo y ofrecerle una solución localmente viable (Berruezo *et al.*, 2018).

Fusarium spp., posee una amplia distribución, su presencia es cosmopolita y sobrevive saprófitamente en el suelo, aire, agua y diversos sustratos. Muchas especies tienen una gran capacidad para infectar a las plantas de interés económico y ciertos biotipos pueden causar infecciones oportunistas a los animales y al hombre, atribuidas fundamentalmente por la producción de micotoxinas (Chiotta *et al.*, 2015). Debido a las estructuras de resistencia que posee, denominadas clamidosporas, persisten largos periodos de tiempo en el suelo, lo cual hace inefectiva la alternativa de manejo basada en la rotación de cultivos (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016). *F. oxysporum* es un organismo muy polífago a nivel de especie, se cuantificaron más de 120 formas especiales, las cuales se basan en la infección que produce sobre la planta hospedera. Dichas formas a su vez se subdividen en razas, las que se describen según la habilidad para infectar diferentes variedades de una misma especie (Retana *et al.*, 2018).

Para el manejo del marchitamiento vascular del tabaco se recomienda el biocontrol como una medida que no afecta el ambiente. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* destacan como las más utilizadas. Las mismas presentan diferentes mecanismos de acción, entre ellos, la competencia, la antibiosis, el micoparasitismo y la activación de mecanismos de defensa en las plantas.

leaves and therefore, everything that affects them is important to investigate and offer a locally viable solution (Berruezo *et al.*, 2018).

Fusarium spp., possess a wide distribution, its presence is cosmopolitan and survives saprophytically in soil, air, water and various substrates. Several species have a big capacity to infect the plants of economic interest and certain biotypes can cause opportunistic infections to the animals and human being, mainly attributed by the production of mycotoxins (Chiotta *et al.*, 2015). Due to the structures of the resistance that it has, denominated chlamydo spores, they persist for long periods of time in the soil, which makes ineffective the management alternative based on the crops rotations (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016). *F. oxysporum* is a very polyphagous organism at specie level; 120 special forms were quantified, which are based on the infection that it produces on the host plant. These forms are subdivided into races, which are described according to the ability to infect different varieties of the same specie (Retana *et al.*, 2018).

For the management of tobacco vascular wilt, the biocontrol is recommended as a measurement that does not affect the environment. In this sense, the species of the genus *Trichoderma* highlight as the most used. They present different mechanisms of action, among them, the competition, the antibiosis, the mycoparasitism, and the activation of defense mechanisms in the plants. It is known that the higher is the probability of *Trichoderma*

Se conoce que mientras mayor sea la probabilidad de que *Trichoderma* spp., manifieste varios modos de acción; más eficiente y duradero será el efecto de biocontrol sobre el fitopatógeno (Infante *et al.*, 2009; Cruz-Triana *et al.*, 2017). Las especies de *Trichoderma* actúan por medio de una combinación de competencia por nutrientes, la producción de metabolitos antifúngicos, la síntesis de enzimas hidrolíticas y el micoparasitismo, así como, pueden inducir la estimulación del crecimiento vegetal (Carvajal *et al.*, 2015). Como hongo saprófito del suelo tiene la característica de fácil multiplicación y rápido crecimiento en condiciones controladas, lo cual favorece su utilización como biofungicida (Rivera *et al.*, 2016). Los productos basados en este hongo comprenden más de 50 formulaciones, algunas disponibles como productos comerciales en el mercado (Gato, 2010). Sin embargo, no se constataron estudios sobre el manejo de *Fusarium* spp., con cepas nativas de *T. harzianum* y *T. viride* en tabaco, lo cual sería novedoso investigar para el biocontrol local de este hongo.

Teniendo en cuenta lo expuesto, se propuso como objetivo de esta investigación determinar la actividad antagónica *in vitro* de cepas autóctonas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* sobre aislados de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum* en la provincia Granma.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias

spp., manifiests various modes of action; the effect of biocontrol on the phytopathogen is more efficient and durable (Infante *et al.*, 2009; Cruz-Triana *et al.*, 2017). The species of *Trichoderma* act through a combination of competence for nutrients, the production of antifungals metabolites, the synthesis of hydrolytic enzymes and mycoparasitism, as well as, they can induce plant growth stimulation (Carvajal *et al.*, 2015). As saprophytic soil fungus, it has the characteristic of easy multiplication and rapid growth under controlled conditions, which favors its use as a biofungicide (Rivera *et al.*, 2016). The products based on this fungus include more than 50 formulations, some of them available as commercial products in the market (Gato, 2010). However, there were not studies on the management of *Fusarium* spp. with native strains of *T. harzianum* and *T. viride* in tobacco were found, which would be novel to investigate for the local biocontrol of this fungus.

Considering the above, it was proposed as the objective of this research to determine the *in vitro* antagonistic activity of autochthonous strains of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* on *Fusarium* spp. isolates from *N. tabacum* in Granma province.

Materials and methods

The research was carried out at the Agricultural Microbiology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, University of Granma, Cuba. Potato dextrose agar medium was prepared with antibiotic (PDA BioCen: 39 g.L⁻¹

Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba. Se preparó medio agar papa dextrosa con antibiótico [PDA BioCen: 39 g.L⁻¹ de H₂O destilada, más cloranfenicol, tetraciclina y estreptomycin (50 mg.L⁻¹) en matraces Erlenmeyer y pH ajustado a 6]. El medio se esterilizó y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 36 °C y se vertió en placas Petri de 80 mm de diámetro. Una vez solidificado, se procedió a establecer el enfrentamiento en cultivo dual (CD) según la metodología descrita por Bell *et al.* (1982).

Las cepas autóctonas A-53, A-34 de *Trichoderma harzianum* y TS-3 de *T. viride* fueron proporcionadas por el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LAPROSAV-Granma), las mismas fueron aisladas de cultivos hortícolas agroecológicos en la región este de Cuba y los aislamientos nativos de *Fusarium* spp. (cuadro 1) se obtuvieron del cultivo de tabaco (secciones de tallos) en áreas de producción comercial de esta planta, estos permanecían conservados en la colección de fitopatógenos del Laboratorio de Microbiología Agrícola, Universidad de Granma.

En las placas Petri con PDA se depositó en un extremo de la misma un disco de cinco mm de diámetro con micelio activo de colonias de *Fusarium* spp. (cuadro 1) y en el otro extremo se colocó un disco con las cepas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, ambas tenían 72 h de crecidas. Luego las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron a 28±2 °C, con intervalos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Fernández y Suárez, 2009).

of distilled H₂O, plus chloramphenicol, tetracycline and streptomycin (50 mg.L⁻¹) in Erlenmeyer flasks and pH adjusted to 6]. The medium was sterilized and left to cool to a temperature of 36 °C and poured into 80 mm diameter Petri dishes. Once solidified, the cooling dual culture (DC) was established according to the methodology described by Bell *et al.* (1982).

The A-53, A-34 autochthonous strains of *Trichoderma harzianum* and the TS-3 of *T. viride* were provided by the Provincial Laboratory of Plant Health (LAPROSAV-Granma), these were isolated from agroecological horticultural crops in the eastern region of Cuba and the native isolates of *Fusarium* spp. (Table 1) were obtained from tobacco cultivation (stem sections) in areas of commercial production of this plant, these remained preserved in the collection of phytopathogens of the Laboratory of Agricultural Microbiology, University of Granma.

In the Petri dishes with PDA, a disc of five mm of diameter with active mycelium of *Fusarium* spp. colonies was deposited at one end (Table 1) and at the other end a dish with *Trichoderma harzianum* and *T. viride* strains was placed; both had 72 h of growth. Then the dishes were sealed with parafilm and incubated at 28±2 °C, with intervals of 12 h of light and 12 h of darkness (Fernandez and Suarez, 2009).

The inhibition percentage of radial growth (PICR) was evaluated at 24, 72 and 168 h, using the formula $PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100$,

Cuadro 1. Procedencia de los aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium phyllophilum* obtenidos de tallos en cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en la provincia Granma, Cuba.

Table 1. Origin of the isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium phyllophilum* obtained from stems in tobacco cultivation (*Nicotiana tabacum*) in Granma province, Cuba.

Cepa	Localidad/Municipio	Cultivar	Coordenadas	Especies
A	Bueycito/Buey Arriba	SS-96	20°14'20.5"N 76°46'28.8"W	<i>F. oxysporum</i>
B	Bueycito/Buey Arriba	SS-96	20°14'11.4"N 76°46'27.4"W	<i>F. oxysporum</i>
C	Monjará/Guisa	Habana-92	20°17'51.9"N 76°36'08.7"W	<i>F. oxysporum</i>
D	Monjará/Guisa	Corojo-2006	20°18'07.3"N 76°36'42.6"W	<i>F. oxysporum</i>
E	El Dorado/Bayamo	SS-96	20°15'52.3"N 76°44'43.8"W	<i>F. phyllophilum</i>
F	El Dorado/Bayamo	Habana-92	20°15'55.7"N 76°44'35.8"W	<i>F. phyllophilum</i>
G	Corojito/Buey Arriba	Habana-92	20°11'05.2"N 76°43'21.7"W	<i>F. phyllophilum</i>
H	Santa Rita/Jiguani	Habana-92	20°20'11.9"N 76°29'24.1"W	<i>F. oxysporum</i>
I	Los Cayos/Yara	Habana-2000	20°18'20.2"N 76°50'00.6"W	<i>F. phyllophilum</i>

Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) a las 24, 72 y 168 h, empleándose para ello la fórmula $PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100$, donde R1 es el crecimiento radial del patógeno (testigo) y R2 el crecimiento radial del patógeno en CD (Esquivel *et al.*, 2019). Se consideró como el efecto antibiosis el PICR a las 24 h, momento en el cual los hongos no interactuaban físicamente. Al séptimo día se registró el antagonismo sobre el fitopatógeno, según la escala de capacidad antagonista de Bell *et al.* (1982), donde Clase 1: *Trichoderma* crece completamente sobre el medio

where R1 is the radial growth of the pathogen (control) and R2 the radial growth of the pathogen in CD (Esquivel *et al.*, 2019). The antibiosis effect was considered as the PICR at 24 h, at which time the fungi were not physically interacting. On the seventh day, antagonism on the phytopathogen was recorded, according to the antagonistic capacity scale of Bell *et al.* (1982), where Class 1: *Trichoderma* grows completely on the culture medium and the pathogen. Class 2: *Trichoderma* reaches 2/3 of the surface of the culture medium. Class 3: *Trichoderma* and the pathogen colonize half of the surface of the

de cultivo y el patógeno. Clase 2: *Trichoderma* alcanza 2/3 de la superficie del medio de cultivo. Clase 3: *Trichoderma* y el patógeno colonizan la mitad de la superficie del medio y ninguno de ellos domina sobre el otro. Clase 4: El organismo patógeno coloniza al menos 2/3 de la superficie del medio. Clase 5: El patógeno crece por encima del aislado de *Trichoderma* y ocupa casi toda la superficie del medio.

La actividad micoparasítica se determinó a partir del momento de la interacción física entre los hongos (antagonista vs. patógeno) en CD, entre las 72-96 h. para ello, se tomaron tres muestras por cada tratamiento del sitio de contacto y se observaron al microscopio óptico marca Novel, modelo N 200 M con cámara digital acoplada HDCE-X3, de este modo se evidenció el tipo de interacción hifal (penetración, enrollamiento, vacuolización, deformación y granulación).

Se utilizó un diseño completamente al azar con 27 tratamientos conformados a partir de la combinación de las tres cepas de *Trichoderma*, A-53 y A-34 (*T. harzianum*) y TS-3 (*T. viridae*) y nueve aislados de *Fusarium* (A, B, C, D, E, F, G, H, I), con cuatro réplicas por cada tratamiento, así como, los correspondientes controles del antagonista y fitopatógeno sin interactuar entre sí. Para el procesamiento estadístico se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0,05$), procesado con

medium and none of them dominates over the other. Class 4: The pathogen colonizes at least 2/3 of the surface of the medium. Class 5: The pathogen grows above the *Trichoderma* isolate and occupies almost all the surface of the medium.

The mycoparasitic activity was determined from the moment of physical interaction between fungi (antagonist vs pathogen) in CD, between 72-96 h. for that, three samples were taken for each treatment from the contact site and were observed under a Novel optical microscope, model N 200 M with HDCE-X3 coupled digital camera, in this sense the type of hyphal interaction (penetration, winding, vacuolization, deformation and granulation) was evidenced.

A completely randomized design was used with 27 treatments conformed from the combination of three strains of *Trichoderma*, A-53 and A-34 (*T. harzianum*) and TS-3 (*T. viridae*) and nine isolates of *Fusarium* (A, B, C, D, E, F, G, H, I), with four replicas by each treatment, as well as, the corresponding controls of the antagonist and phytopathogen without interacting with each other. For the statistical processing a bifactorial analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's multiple comparison means test ($p \leq 0.05$) were used, processed with the STATISTIC 2008 (StatSoft, 2007) statistical package. Prior to ANOVA the data expressed in percentage were transformed by $2 * [\text{RAÍZ}(X/100)]$, due to the same did not comply with the normality test.

el paquete estadístico STATISTIC 2008 (StatSoft, 2007). Previo al ANOVA los datos expresados en porcentaje fueron transformados por $2^*[\text{RAÍZ}(X/100)]$, debido a que los mismos no cumplieron con la prueba de normalidad.

Resultados y discusión

Al analizar la interacción entre las cepas se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$) para la variable PICR a las 24, 72 y 168 h de confrontación. A las 24 h, el rango de inhibición osciló entre 0,00 y 65,08 %, luego a las 72 h se registraron valores entre 1,25 y 136,79 % y finalmente a las 168 h se observó una inhibición intermedia de 40,96 a 57,22 %; donde el 59,25 % de las interacciones antagonista vs. fitopatógeno registraron un PICR superior a 50 %. Momento en el cual, las cepas de *Trichoderma* spp., estabilizaron su efecto de biocontrol sobre el hongo (cuadro 2). Lo expuesto, se atribuye a una menor variabilidad del efecto de biocontrol del antagonista, así como, a una cantidad mayor de interacciones con valores intermedios de PICR, posibilitando de este modo, un mayor crecimiento sobre las placas Petri de *T. harzianum* y *T. viride* en comparación con el fitopatógeno. Lo cual se relaciona con lo observado por Hoyos *et al.* (2019), donde *Trichoderma* spp. logró el mayor crecimiento *in vitro* sobre *F. oxysporum* aislado de *Capsicum annuum* L.

Results and discussion

When analyzing the interaction between the strains, significant differences between treatments ($p \leq 0.05$) were observed for the variable PICR at 24, 72 and 168 h of confrontation. At 24 h, the range of inhibition oscillated between 0.00 and 65.08 %, then at 72 h values between 1.25 and 136.79 % were recorded and finally at 168 h an intermediate inhibition of 40.96 to 57.22 % was observed; where 59.25 % of the antagonist vs. phytopathogen interactions registered a PICR higher than 50 %. Moment in which, the strains of *Trichoderma* spp. stabilized their effect of biocontrol on the fungus (table 2). The above is attributed to a lower variability of the biocontrol effect of the antagonist, as well as, to a greater quantity of interactions with intermediate values of PICR, making possible in this way, a greater growth on the Petri dishes of *T. harzianum* and *T. viride* in comparison with the phytopathogen. Which is related to what was observed by Hoyos *et al.* (2019), where *Trichoderma* spp. achieved the greatest *in vitro* growth on *F. oxysporum* isolated from *Capsicum annuum* L.

Suárez *et al.* (2008) demonstrated that the antagonism of *T. harzianum* against *F. solani*, associated with the wilt of *Passiflora edulis* Sims, at 240 h of confrontation in CD presented inhibition greater than 50 %. This result surpassed some of the treatments evaluated in the present investigation, which could be due to differences in the origin of the

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium phyllophilum* evaluados en cultivos duales con las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp.

Table 2. Percentage of radial growth inhibition (PICR) of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium phyllophilum* isolates evaluated in dual cultures with *Trichoderma* spp strains A-34, A-53 and TS-3.

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	PICR 24h (%)	PICR 72h (%)	PICR 168h (%)
A-53		40,00 bcde	42,63 defgh	53,89 abc
A-34	A	40,00 bcde	15,03 abcde	52,50 abc
TS-3		44,44 bcde	15,05 abcdef	50,00 abc
A-53		14,58 abcde	34,04 bcdefg	49,44 abc
A-34	B	18,75 abcde	29,42 cdefgh	57,22 c
TS-3		12,50 abcde	10,84 abcde	49,72 abc
A-53		57,14 de	55,62 fgghi	53,89 abc
A-34	C	65,08 e	70,77 ghij	54,44 abc
TS-3		57,14 de	44,56 fgghi	56,39 c
A-53		0,00 a	18,52 abcdef	46,94 abc
A-34	D	9,09 abcd	15,56 abcdef	52,50 abc
TS-3		3,03 ab	18,52 abcdef	49,17 abc
A-53		35,90 bcde	22,77 abcdefg	40,96 a
A-34	H	35,90 bcde	2,74 ab	52,71 abc
TS-3		35,90 bcde	2,82 abc	40,96 a
A-53		41,18 cde	57,12 fgghi	45,56 abc
A-34	E	37,25 bcde	85,88 ij	55,28 bc
TS-3		31,37 bcde	105,77 j	56,39 c
A-53		0,00 a	16,50 abcdef	43,89 abc
A-34	F	60,00 de	30,04 defgh	54,17 abc
TS-3		0,00 a	18,18 abcdef	50,56 abc
A-53		0,00 a	1,25 a	43,06 abc
A-34	G	5,56 abc	15,24 abcde	55,00 abc
TS-3		8,33 abc	6,42 abcde	48,89 abc
A-53		35,90 bcde	10,52 efgh	43,89 abc
A-34	I	25,54 abcde	38,13 defgh	55,28 bc
TS-3		61,54 de	136,79 j	54,44 abc
EE ²	-	0,12	0,22	0,17

Trichoderma spp.: *T. harzianum* (A-53 y A-34) y *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) y *F. phyllophilum* (E, F, G, I). ²: error estándar. Letras diferentes en las columnas señalan diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Trichoderma spp.: *T. harzianum* (A-53 and A-34) and *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) and *F. phyllophilum* (E, F, G, I). ²: standard error. Different letters in the columns indicate significant differences (Tukey, p<0.05).

Suárez *et al.* (2008) demostraron que el antagonismo de *T. harzianum* frente *F. solani*, asociado a la marchitez de *Passiflora edulis* Sims, a las 240 h de enfrentados en CD presentó inhibición mayor al 50 %. Dicho resultado superó algunos de los tratamientos evaluados en la presente investigación, lo que pudo estar dado por diferencias en cuanto a la procedencia de las cepas del antagonista, a la virulencia de estas, así como, por la poca cantidad de cepas evaluadas y el tiempo de duración del ensayo, entre otras.

Por otra parte, García (2016) al realizar una evaluación del antagonismo de cepas de *T. harzianum* y *T. viride*, frente a *F. oxysporum* y *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, aislados de *Aloe vera* (L.) Burm y *Vaccinium corymbosum* L., observó un porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp., de 72 % y 59 % en *C. coccodes*, superando lo alcanzado en este estudio. Mientras que, Vargas *et al.* (2012) evidenciaron que especies de *Trichoderma* pueden alcanzar PICR superior al 80% frente a aislados de *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp., evidenciándose un alto nivel de fitopatogenicidad del antagonista sobre las dos especies fúngicas analizadas. Recientemente Pérez *et al.* (2017) informaron que, *T. harzianum* cepa A-34 evaluada en este ensayo, alcanzó a las 120 h un 100 % de inhibición del crecimiento micelial del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc), lo cual se consideró como una acción hiperparasita de esta cepa sobre el fitopatógeno.

antagonist strains, their virulence, as well as the small number of strains evaluated and the duration of the trial, among others.

On the other hand, García (2016) when carrying out an evaluation of the antagonism of *T. harzianum* strains and *T. viride*, against *F. oxysporum* and *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, isolates of *Aloe vera* (L.) Burm and *Vaccinium corymbosum* L., a growth inhibition percentage of *Fusarium* spp., of 72 % and 59 % was observed in *C. coccodes*, exceeding what was achieved in this study. While, Vargas *et al.* (2012) evidenced that the species of *Trichoderma* can reach a PICR higher than 80% compared to the isolates of *Rhizoctonia* sp. and *Colletotrichum* sp., evidencing a high level of phytopathogenicity of the antagonist on the two fungal species tested.

Recently Pérez *et al.* (2017) reported that the strain A-34 of *T. harzianum* evaluated in this assay, reached at 120 h 100% mycelial growth inhibition of rice blight (*Pyricularia grisea* Sacc), which was considered as a hyperparasitic action of this strain on the phytopathogen.

This variability of results, in relation to the antibiosis effect of different evaluated strains of *Trichoderma* in previous researches such as those carried out by Mendoza *et al.* (2015), Hernández *et al.* (2016) and Ronnie-Gakegne *et al.* (2018), highlights that the PICR is a variable indicator and it can depend on different factors, such as, the phytopathogenic specie and the crop where it was isolated, the antagonist and its virulence, the

Esta variabilidad de resultados, con relación al efecto de antibiosis de diferentes cepas de *Trichoderma* evaluadas en investigaciones anteriores como las realizadas por Mendoza *et al.* (2015), Hernández *et al.* (2016) y Ronnie-Gakegne *et al.* (2018), pone de manifiesto que el PICR es un indicador variable y el mismo puede depender de diferentes factores, entre los que destacan, la especie fitopatógena y el cultivo donde fue aislada, el antagonista y su virulencia, el proceso de incubación y la duración del ensayo. Así mismo, es importante destacar que no se encontraron trabajos publicados que abordaran el antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium* spp., procedente de *N. tabacum*, lo que sustenta la novedad de estos resultados.

Al analizar el efecto de antibiosis (PICR 24 h) se observó variabilidad en las interacciones antagonista vs. fitopatógeno. Los valores de este indicador oscilaron en un rango de 0-65 %. Un 70,37 % de las interacciones registraron valores de antibiosis por encima del 10 %, a excepción de A-53 x G, D y F, A-34 x G y D y TS-3 x F, G y D (figura 1).

El resultado expuesto posee similitud con lo informado por Cruz-Triana *et al.* (2017), dichos autores registraron variabilidad entre 5-80 % de la antibiosis por efecto del antagonista *T. asperellum* Samuels sobre patógenos fúngicos que afectan a *Glycine max* (L.). Por su parte Sánchez *et al.* (2017) dieron a conocer que el efecto antibiosis es la síntesis de sustancias con actividad antifúngica, previo al contacto físico entre los hongos.

incubation process and the duration of the trial. Likewise, it is important to emphasize that there were not found published works that approached the antagonism of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* spp. from *N. tabacum*, which sustains the novelty of these results.

When analyzing the antibiosis effect (PICR24h) variability in this antagonist interaction vs phytopathogen was observed. The values of this indicator oscillated in a range of 0-65 %. A 70.37 % of the interactions registered values of antibiosis above 10 %, with the exception of A-53 x G, D and F, A-34 x G and D and TS-3 x F, G and D (figure 1).

The exposed result is similar to that reported by Cruz-Triana *et al.* (2017), these authors recorded variability between 5-80 % of antibiosis due to the effect of the antagonist *T. asperellum* Samuels on the fungal pathogens that affect to *Glycine max* (L.). For their part Sánchez *et al.* (2017) reported that the antibiosis effect is the synthesis of substances with antifungal activity, prior to the physical contact between the fungi.

Under the experimental conditions evaluated, in the first 24 h the isolates of F, G and D of the phytopathogen were the least inhibited by A-53 (*T. harzianum*) and TS-3 (*T. viride*), which noted that the said strains did not achieve an effective antibiosis at this moment. Showing that, in the first hours of interaction, the fungus can defend itself from the effect of antifungal substances synthesized by the antagonist, or these substances are produced in insufficient quantities for the inhibition (León *et al.* 2017).

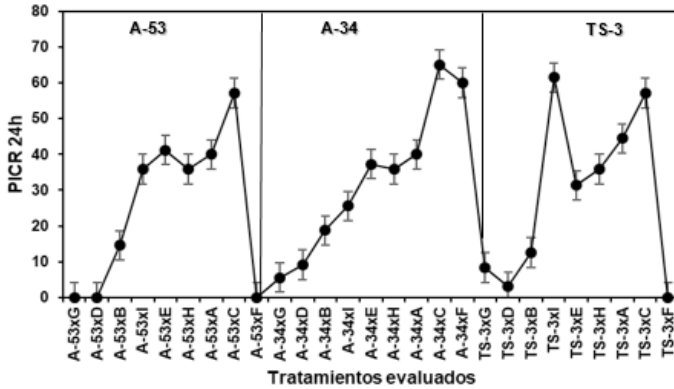


Figura 1. Antibiosis (PIRC 24h) ejercida por las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp., sobre aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium phyllophilum* en cultivos duales. Las barras sobre la línea muestran el error estándar.

Figure 1. Antibiosis (PIRC 24h) exerted by the strains A-34, A-53 and TS-3 of *Trichoderma* spp., on isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium phyllophilum* in dual crops. The bars above the line show the standard error.

Bajo las condiciones experimentales evaluadas, en las primeras 24 h los aislados F, G y D del fitopatógeno fueron los menos inhibidos por A-53 (*T. harzianum*) y TS-3 (*T. viride*), lo cual señaló que dichas cepas no lograron una antibiosis efectiva en este momento. Poniéndose de manifiesto que, en las primeras horas de interacción el hongo puede defenderse del efecto de las sustancias antifúngicas sintetizadas por el antagonista, o que dichas sustancias son producidas en cantidades insuficientes para la inhibición (León *et al.*, 2017).

Al analizar la interacción entre cepas de *Trichoderma* spp., y aislados de *Fusarium* spp., se registraron diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0,05$) para la variable antagonismo. A las 168 h un 77,77 % de las

When analyzing the interaction between the strains of *Trichoderma* spp., and the isolates of *Fusarium* spp., significant differences were recorded between the treatments according to the Tukey's multiple comparison means test ($p \leq 0.05$) for the variable antagonism. At 168 h 77.77% of the interactions corresponded to the class 2 of the scale and none isolate was placed in the class 4 or 5, considered of low antagonistic capacity, according to the described by Bell *et al.* (1982). This evidenced an intermediate antagonistic effect of the autochthonous strains of *Trichoderma* spp., on the *Fusarium* spp isolates evaluated (Table 3). The result suggests that the three strains of the antagonist can be evaluated in field to

interacciones correspondieron a la clase 2 de la escala y ningún aislado se ubicó en la clase 4 o 5, consideradas de baja capacidad antagonica, según lo descrito por Bell *et al.* (1982). Lo cual evidenció un efecto antagonista intermedio de las cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., sobre los aislados de *Fusarium* spp. evaluados (cuadro 3). El resultado sugiere que las tres cepas del antagonista pueden ser evaluadas en campo para determinar su potencial de biocontrol sobre especies *F. oxysporum* y *F. phyllophilum*. Además, como tendencia se observaron los valores menos deseados de antagonismo en A-53 (*T. harzianum*) x D (*F. oxysporum*), TS-3 (*T. viride*) x H (*F. oxysporum*), A-53 (*T. harzianum*) x G (*F. phyllophilum*), TS-3 (*T. viride*) x G (*F. phyllophilum*) y A-53 (*T. harzianum*) x I (*F. phyllophilum*), representando un 18,51 % del total de las interacciones.

Pérez *et al.* (2017), al evaluar el efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea* en CD logró una ubicación de clase 1 en la escala de capacidad antagonica, dicha cepa logró expresar su máximo potencial competitivo sobre el hongo. En un estudio anterior Reyes (2012) demostró que a las 48 h un 86,44 % de los aislados de *T. harsianum* y *T. asperellum* frente a *Rhizoctonia solani*, se ubicaron en la clase 2 de la escala y posteriormente a las 96 h se registró un incremento de un 93,22 %. Los resultados de esta investigación son ligeramente inferiores a los expuestos anteriormente, debido a que los mismos se realizaron bajo diferentes condiciones experimentales y de duración del ensayo, así como, se utilizaron especies antagonistas y fitopatógenas distintas. No obstante, se demostró el potencial competitivo y antagonico que caracteriza a *Trichoderma* spp., como agente de biocontrol.

determine their potential of biocontrol on the species of *F. oxysporum* and *F. phyllophilum*. Also, as a tendency the least desired values of the antagonism were observed in A-53 (*T. harzianum*) x D (*F. oxysporum*), TS-3 (*T. viride*) x H (*F. oxysporum*), A-53 (*T. harzianum*) x G (*F. phyllophilum*), TS-3 (*T. viride*) x G (*F. phyllophilum*) and A-53 (*T. harzianum*) x I (*F. phyllophilum*), representing 18.51% of the total interactions.

Pérez *et al.* (2017), when evaluating the effect of *T. harzianum* (Strain A-34) on *P. grisea* in CD achieved a location of class 1 on the scale of antagonistic capacity, the said strain achieved to express its maximum competitive potential on the fungus. In a previous study Reyes (2012) showed that at 48 h 86.44% of the isolates of *T. harsianum* and *T. asperellum* against *Rhizoctonia solani*, were located in the class 2 of the scale and later at 96 h an increase of 93.22% was recorded. The results of this research are slightly inferior to those previously presented, due to the same were carried out under different experimental conditions and duration of the assay, as well as, different antagonist and phytopathogen species were used. However, the competitive and antagonistic potential that characterizes *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent was demonstrated.

From the scientific point of view, it was possible to demonstrate the mycoparasitic activity of *T. harzianum* (strains A-34 and A-53) and *T. viride* (strain TS-3) on all the isolates of *Fusarium* spp., between 72 and 96 h of confrontation in CD. Five main forms of mycoparasitism were

Cuadro 3. Capacidad antagónica según la escala de Bell (1-5) ejercida por las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp., sobre los aislados de *F. oxysporum* y *F. phyllophilum* en cultivos duales.

Table 3. Antagonistic capacity according to the Bell scale (1-5) exercised by *Trichoderma* A-34, A-53 and TS-3 strains on *F. oxysporum* and *F. phyllophilum* isolations in dual crops.

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Clase
A-53		2,00 a
A-34	A	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		2,25 ab
A-34	B	2,00 a
TS-3		2,25 ab
A-53		2,00 a
A-34	C	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		4,00 c
A-34	D	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		2,25 ab
A-34	H	2,00 a
TS-3		3,25 bc
A-53		2,50 ab
A-34	E	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		2,50 ab
A-34	F	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		3,75 c
A-34	G	2,00 a
TS-3		3,00 abc
A-53		3,00 abc
A-34	I	2,00 a
TS-3		2,00 a
EE²	-	0,10

Trichoderma spp.: *T. harzianum* (A-53 y A-34) y *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) y *F. phyllophilum* (E, F, G, I). *: error estándar. Letras diferentes en las columnas señalan diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Trichoderma spp.: *T. harzianum* (A-53 and A-34) and *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) and *F. phyllophilum* (E, F, G, I). *: standard error. Different letters in the columns indicate significant differences (Tukey, p<0.05).

Desde el punto de vista científico se logró evidenciar la actividad micoparasítica de *T. harzianum* (cepas A-34 y A-53) y *T. viride* (cepa TS-3) sobre la totalidad de los aislados de *Fusarium* spp. entre las 72 y 96 h de confrontación en CD. Se constataron cinco formas principales de micoparasitismo, entre ellas, penetración (*T. harzianum*), enrollamiento (*T. harzianum*), vacuolización, deformación y granulación del contenido citoplasmático (*T. viride*) (figura 2).

observed, including penetration (*T. harzianum*), winding (*T. harzianum*), vacuolization, deformation and granulation of cytoplasmic contents (*T. viride*) (Figure 2).

According to Retana *et al.* (2018), when the direct interaction between the hyphas of the fungi (>24 h) is established, other mechanisms of action such as competition, mycoparasitism and hyperparasitism are manifested, which interrelated

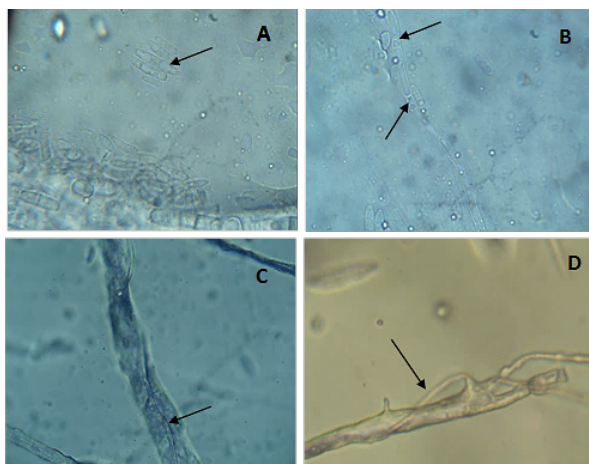


Figura 2. Actividad micoparasítica ejercida por las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp., sobre aislados de *F. oxysporum* y *F. phyllophilum* en cultivos duales. Vacuolización citoplasmática de macroconidios y deformación (A) y granulación citoplasmática de hifas (B) cepa TS-3 (*T. viride*). Hifas del antagonista en el interior de hifas del fitopatógeno (C) cepa A-34 (*T. harzianum*). Hifa del antagonista enrollando a una hifa del fitopatógeno (D) cepa A-53 (*T. harzianum*). 40X.

Figure 2. Mycoparasitic activity exercised by the A-34, A-53 and TS-3 strains of *Trichoderma* spp., on isolates of *F. oxysporum* and *F. phyllophilum* in dual crops. Cytoplasmic vacuolization of macroconidia and deformation (A) and cytoplasmic granulation of hyphae (B) strain TS-3 (*T. viride*). Antagonist hyphae inside phytopathogenic hyphae (C) strain A-34 (*T. harzianum*). Antagonist hypha by winding a phytopathogenic hypha (D) strain A-53 (*T. harzianum*). 40X.

De acuerdo a Retana *et al.* (2018), cuando se establece la interacción directa entre las hifas de los hongos (>24 h), se manifiestan otros mecanismos de acción como competencia, micoparasitismo e hiperparasitismo, que interrelacionados con la síntesis de enzimas líticas proteinasas y quitinasas, así como, la secreción de metabolitos secundarios como trichodermina, gliovirina y gliotoxina, posibilitan de forma efectiva el proceso de biocontrol.

La vacuolización citoplasmática de los macroconidios de *Fusarium* spp., observada en esta investigación es raramente documentada en la literatura científica especializada que aborda esta temática y se relaciona con una afectación directa sobre la viabilidad de estas esporas. Probablemente, la acción enzimática del antagonista posibilitó la penetración, deformación, desintegración y muerte de las estructuras fúngicas del fitopatógeno. Al respecto, se estableció que estas formas de micoparasitismo coinciden con las señaladas por García (2016) para el género *Fusarium* spp. aislado de sábila y arándano. Según Rivera *et al.* (2016) en su estudio sobre el antagonismo de *Trichoderma* spp., frente al fitopatógeno *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel en el cultivo de cebolla, la actividad micoparasítica estuvo caracterizada por la vacuolización y la penetración.

Los resultados expuestos en esta investigación poseen relación con lo evidenciado por Hoyos *et al.* (2019), los cuales informaron alteraciones citoplasmáticas con presencia de

with the synthesis of lytic proteinase and chitinase enzymes, as well as the secretion of secondary metabolites such as trichodermin, gliovirin and gliotoxin, effectively enable the biocontrol process.

The cytoplasmic vacuolization of the macroconidia of *Fusarium* spp. observed in this research is rarely documented in the specialized scientific literature that addresses this issue and is related to a direct effect on the viability of these spores. Probably, the enzymatic action of the antagonist made possible the penetration, deformation, disintegration and death of the fungal structures of the phytopathogen. In this regard, it was established that these forms of micoparasitism coincide with those reported by Garcia (2016) for the genus *Fusarium* spp. isolated from aloe and blueberry. According to Rivera *et al.* (2016) in their study on the antagonism of *Trichoderma* spp. against the phytopathogen *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel in onion crops, micoparasitic activity was characterized by vacuolization and penetration.

The results presented in this research have relation with that evidenced by Hoyos *et al.* (2019), which informed about cytoplasmic alterations with presence of vacuoles and granulations, as well as winding of hyphas of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* species that cause chili wilt in Mexico. Therefore, it was demonstrated in the study the effect of growth inhibition, antibiosis, antagonism and micoparasitism of the autochthonous strains of *Trichoderma*

vacuolas y granulaciones, así como enrollamiento de hifas de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium* causantes de la marchites del chile en México. Por tanto, quedó demostrado en el estudio el efecto de inhibición del crecimiento, antibiosis, antagonismo y micoparasitismo de las cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., A-34, A-53 y TS-3 sobre aislados nativos de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum* en la provincia Granma, Cuba.

A partir de un análisis integral de los resultados, se consideró que las cepas A-34 y TS-3 lograron las mejores tendencias de biocontrol; basado en los indicadores PICR, antibiosis y capacidad antagonista. Por tanto, se recomienda probar su uso en campo para el manejo de *F. oxysporum* y *F. phylophilum* en *N. tabacum*, mientras que, la cepa A-53 puede aplicarse de forma combinada con A-34 y TS-3 para potenciar su efecto. Lo anterior, señala la importancia práctica de estos resultados en la selección de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., para el desarrollo de un biofungicida de interés agrícola local.

Conclusiones

Se determina la actividad antagonista *in vitro* de cepas autóctonas de *T. harzianum* y *T. viride* sobre aislados de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum*. A los siete días de establecido el CD las cepas de *Trichoderma* spp., registran valores intermedios de inhibición del fitopatógeno, la competitividad del

spp., A-34, A-53 and TS-3 on native isolates of *Fusarium* spp. from *N. tabacum* in Granma province, Cuba.

From an integral analysis of the results, it was considered that the strains A-34 and TS-3 achieved the best biocontrol tendencies; based on the PICR indicators, antibiosis and antagonistic capacity. Therefore, it is recommended to test their use in the field for the management of *F. oxysporum* and *F. phylophilum* in *N. tabacum*, while strain A-53 can be applied in combination with A-34 and TS-3 to enhance their effect. The above, points out the practical importance of these results in the selection of autochthonous strains of *Trichoderma* spp. for the development of a biofungicide of local agricultural interest.

Conclusions

The *in vitro* antagonistic activity of autochthonous strains of *T. harzianum* and *T. viride* on isolates of *Fusarium* spp. from *N. tabacum* was determined. Seven days after the establishment of the CD, the strains of *Trichoderma* spp. register intermediate values of inhibition of the phytopathogen, the competitiveness of the antagonist is located mainly in class two of Bell's scale and it is found that penetration, winding, vacuolization, deformation and granulation constitute the main forms of micoparasitism. Which points to this biocontrol method as an alternative to be considered for the management of *Fusarium* spp. in tobacco agroecosystems and the possibility of obtaining

antagonista se ubica mayoritariamente en la clase dos de la escala de Bell y se constata que, penetración, enrollamiento, vacuolización, deformación y granulación constituyen las principales formas de micoparasitismo. Lo cual señala a este método de biocontrol como una alternativa a tener en cuenta para el manejo de *Fusarium* spp., en agroecosistemas tabacaleros y no se descarta la posibilidad de obtener nuevos aislamientos autóctonos de *Trichoderma* spp., con vistas a evaluar su efecto sobre especies de *Fusarium* spp., que afectan a *N. tabacum*.

new autochthonous isolates of *Trichoderma* spp. is not discarded, with a view to evaluate its effect on species of *Fusarium* spp. that affect to *N. tabacum*.

End of English Version

antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). Cult. Trop. 38(4):15-21.

Delgado-Ortiz, J., Y. Ochoa-Fuentes, E. Cerna-Chávez, M. Beltrán-Beache, R. Rodríguez-Guerra, L. Aguirre-Uribe y O. Vázquez-Martínez. 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. Rev. Argent. Microbiol. 48(3):222-228. doi: 10.1016/j.ram.2016.04.003.

Esquivel, G., A. Aranguré, O. Campos, C. Velasco, E. Crespo y C. Ayón. 2019. Evaluación *in vitro* de microorganismos antagonistas y fungicidas contra *Colletotrichum theobromicola* Delacr. causante de antracnosis en inflorescencias de guanábana (*Annona muricata* L.). Biocienc. 6:13.

Fernández, R. y C. Suárez. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. passiflorae en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 62(1):4743-4748.

García, L. 2016. Evaluación del antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. frente a cepas de *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. aisladas de cultivos orgánicos de sábila (*Aloe vera*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*). Rev. Teckne. 13(1):56-66.

Gato, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. Fitosanidad. 14(3):189-195.

Literatura citada

Bell, D., H. Wells and C. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72(4):379-382.

Berrueto, L., G. Cárdenas, E. Harries, S. Stenglein, R. Curti, M. Rodríguez and Galván M. 2018. Characterization of *Fusarium* species associated with tobacco diseases in Northwestern Argentina. Eur. J. Plant Pathol. 151(4):1065-1079. doi: 10.1007/s10658-018-1443-6.

Carvajal, J., S. Rosero y W. Orozco. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. Rev. Fac. Nac. Agron. 68(1):7441-7450. doi:10.15446/rfnam.v68n1.47830.

Chiotta, M., S. Chulze y G. Barros. 2015. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja. Rev. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. Cuyo. 47(2):171-184.

Cruz-Triana A., D. Rivero-González, B. Martínez-Coca, A. Echevarría-Hernández, y A. Tania-Rodríguez. 2017. Evaluación de la actividad

- Hernández, E., F. Castillo, R. Herrera, S. Fuentes, B. Drouaillet, y J. Santillán, A. 2016. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Investigación y Ciencia. 24(67): 5-11.
- Hoyos, P., A. Luna-Cruz, E. Hernández, E. Gayosso, N. Valenzuela y H. Cureño. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs. hongos asociados a la marchitez de Chile. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 10(6):1259-1272. doi:10.29312/remexca.v10i6.1326.
- Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 24(1):14-21.
- León, D., A. Cortés, y N. Sarmiento. 2017. Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. Rev. Colomb. Biotecnol. (Bogotá). 19(1): 63-70.
- Mendoza, J., M. Pérez, J. Prieto, J. Velásquez, J. Olivares y H. Langarica. 2015. Antibiosis de *Trichoderma* spp. cepas nativas del noreste de México contra el hongo patógeno *Macrophomina phaseolina*. Revista Brasileña de Microbiología. 46(4): 1093-1101.
- Pérez, E., A. Cabrera, P. Milanés, M. Leiva, Y. Sierra y R. Cupull. 2017. Actividad antagonista de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.). Ctro. Agr. 44(3):13-19.
- Retana, K., J. Ramírez, O. Castro, y M. Blanco. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agron. Costarricense. 42 (1):115-126.
- Reyes, Y. 2012. Aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios para el control biológico del tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn) en arroz. Rev. Protección Veg. 27(1):68.
- Rivera, W., K. Meneses, C. Zúñiga y J. Brenes. 2016. Antagonismo de *Trichoderma* sp. ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla. Tecnol. Marcha. 29(3):22-30. doi:10.18845/tm.v29i7.2702.
- Ronnie-Gakegne, E. y B. Martínez-Coca. 2018. Antibiosis y efecto de pH-temperatura sobre el antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* frente a *Alternaria solani*. Rev. Protección Veg. 33(2):1-9.
- Sánchez, B., E. Espinosa, E. Villordo, R. Rodríguez y M. Mora. 2017. Identificación molecular y evaluación antagonista *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrociencia. 51(1):63-79.
- StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (Data Analysis Software System), version 8.0. www.statsoft.com.
- Suárez, C., R. Fernández, N. Osvaldo, M. Gámez y A. Páez. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Colomb. Biotecnol. (Bogotá). 10(2):35-43.
- Vargas, H., E. Rueda y E. Gilchrist. 2012. Antagonist activity of *Trichoderma asperellum* (fungi: ascomycota) at different temperatures. Acta Biol. 34(96):103-112.