



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A
Lasiodiplodia pseudotheobromae CAUSANTE DE
LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN
“PERSA” (*Citrus latifolia*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
DESARROLLO RURAL**

**P R E S E N T A:
AZUCENA LUCENA CUEVAS**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNANDEZ**



Cuernavaca, Morelos, a 05 de marzo del 2024

ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSANTE DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMON “PERSA” (*Citrus latifolia*)

Tesis realizada por **Biol. Azucena Lucena Cuevas**, bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: _____

Dr. Edgar Martínez Fernández

Revisor: _____

Dr. Antonio Castillo Gutiérrez

Revisor: _____

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Revisor: _____

Dr. Guadalupe Peña Chora

Revisor: _____

Dra. Claudia Rueda Barrientos

Cuernavaca Mor., a 05 de marzo del 2024

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por brindarme todas las facilidades necesarias para llevar a cabo la investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada para el desarrollo de la maestría.

A mi mamá y hermanas, por todo su apoyo y amor.

Al Dr. Edgar Martínez Fernández, por haber confiado en mí y dirigir el proyecto de investigación, por su accesibilidad, sus conocimientos y su experiencia... ¡Muchas gracias!

A los Doctores Guadalupe Peña Chora, Antonio Castillo Gutiérrez, Oscar Gabriel Villegas Torres y María Claudia Rueda Barrientos, por formar parte del comité, por sus valiosos comentarios y sugerencias para el desarrollo del trabajo de investigación. Por su asistencia a cada uno de los seminarios... ¡Muchas gracias!

A la Maestra Paty, por apoyarme en la metodología en campo y laboratorio, por su paciencia y su conocimiento.

A mis amigas y compañeras por hacer un ambiente muy acogedor en el laboratorio, Denisse, Kass, Maru. Con agradecimiento especial a Gore, Miriam, por hacer los días más amenos y Adriana por ayudarme en los análisis estadísticos, por compartir tus conocimientos, por tu apoyo y paciencia.

A Jesús Sámano, por ser una pieza clave para realizar el posgrado, por su apoyo incondicional, por nunca dejarme sola, por darme ánimos cuando más los necesité, por sus consejos y aportaciones, por tu comprensión y amor. ¡Te amo!

DEDICATORIA

Para Juan Lucena †

Por ser un papá ejemplar.

Para Yachne, Juan, Joselyn, Janeth, Emmanuel, Nicole y Naomi.

Gracias por llenar mi vida de amor, mis queridos sobrinos. ¡Los amo!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1-INTRODUCCIÓN	1
2-OBJETIVOS	3
3. HIPÓTESIS.....	3
4. REVISION DE LITERATURA	4
4.1 Cítricos a nivel mundial	4
4.2 Importancia del limón en México	4
4.3 Enfermedades en cítricos.....	5
4.4 Enfermedades fúngicas en el limón	6
4.5 Características de <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	6
4.6 <i>Lasiodiplodia</i> spp. como agente causal de enfermedades en cultivos	7
5. Control de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	8
5.1 Control químico.....	8
5.2 Control biológico con microorganismos antagonistas.....	9
5.3 Generalidades de <i>Trichoderma</i> spp.	10
5.4 <i>Trichoderma</i> spp. como antagonista	11
5.5 Compatibilidad de fungicidas con <i>Trichoderma</i> spp.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Lugar de estudio	12
6.2 Aislamiento de especies de <i>Trichoderma</i> de las muestras de suelo	12
6.3 Colecta de ramas de limón “Persa” enfermas con síntomas de gomosis y muerte descendente de los municipios de Tepalcingo, Tlaltizapán y Villa de Ayala.....	12

6.4 Aislamiento del hongo patógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp.	13
6.5 Evaluación <i>in vitro</i> del antagonismo de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> hacia el patógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	14
6.6 Identificación morfológica de las especies de <i>Trichoderma</i> antagónicas a <i>Lasiodiplodia</i> sp.	16
6.7 Evaluación de la sensibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. hacia los fungicidas benomilo y clorotalonil	17
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1 Aislamiento de especies de <i>Trichoderma</i> de las muestras de suelo	20
7.2 Aislamiento de <i>Lasiodiplodia</i> sp.	22
7.3 Inhibición del crecimiento (PIC) y sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. hacia el patógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	22
7.4 Sensibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. hacia los fungicidas benomilo y clorotalonil	28
7.4.1 Sensibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. hacia el fungicida benomilo	29
7.4.2 Sensibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. hacia el fungicida clorotalonil.....	32
7.4.3 Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) del fungicida clorotalonil hacia <i>Trichoderma</i> spp.....	40
.....	45
8. CONCLUSIONES	49
9. PERSPECTIVAS	49
10.LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales entidades productoras del limón “Persa”	5
Cuadro 2. Escala utilizada para evaluar el grado de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Lasiodiplodia</i> sp. (Modificada por Ávila <i>et al.</i> , 2001).....	15
Cuadro 3. Descripción de los fungicidas químicos evaluados hacia <i>Trichoderma</i> spp.....	17
Cuadro 4. Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas según el valor de inhibición sobre el crecimiento de la colonia de los hongos de acuerdo con OILB.	19
Cuadro 5. Resultados de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. de los diferentes municipios.	21
Cuadro 6. Cepas de <i>Trichoderma</i> obtenidas de diferentes localidades del municipio de Tlaltizapán, Morelos.	21
Cuadro 7 . Resultados de los aislamientos de <i>Lasiodiplodia</i> sp. de los diferentes municipios	22
Cuadro 8. Sobrecrecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	25
Cuadro 9. Sobrecrecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	26
Cuadro 10. Efecto de las diferentes concentraciones de benomilo hacia T1	31
Cuadro 11. Efecto de las diferentes concentraciones de benomilo hacia T7.....	31
Cuadro 12. Efecto de las diferentes concentraciones de benomilo hacia T8.....	32
Cuadro 13. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. a las diferentes concentraciones de clorotalonil.	37
Cuadro 14 . Efecto del clorotalonil hacia la cepa T1	38
Cuadro 15. Efecto del clorotalonil hacia la cepa T7	38
Cuadro 16. Efecto del clorotalonil hacia la cepa T8.....	39
Cuadro 17 . Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) del clorotalonil sobre las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lasiodiplodia</i> sp. a) Conidios jóvenes y maduros b) Colonia a los 7 días de crecimiento a 25°C en medio de cultivo PDA.....	7
Figura 2. a) Muestras de suelo b) Dilución en placa con las muestras de suelo previamente mezcladas c) Cultivo de <i>Trichoderma</i> spp. con las diluciones obtenidas d) Colonias crecidas a las 48 horas de cultivo.	13
Figura 3. a-b) Material vegetal obtenido de árboles enfermos de limón “Persa” c) Crecimiento de cepas del patógeno en medio de cultivo PDA d) Hifas de <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	14
Figura 4. Cultivo dual de <i>Lasiodiplodia</i> (flecha negra) sobre <i>Trichoderma</i> (flecha verde).	16
Figura 5. Evaluación de sensibilidad de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes concentraciones del fungicida benomilo. a) rodaja de <i>Trichoderma</i> sp en medio tóxico b) tratamiento control a las 96 horas.....	19
Figura 6. Crecimiento radial a las 96 horas de las cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Lasiodiplodia</i> sp. en medio PDA incubadas a 25°C.....	23
Figura 7. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Lasiodiplodia</i> sp. *Las letras diferentes significan diferencias significativas entre las cepas (DMS P<0.05)	24
Figura 8. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Lasiodiplodia</i> sp. Las letras diferentes significan diferencias significativas entre las cepas (DMS P<0.05)	26
Figura 9. Cepas de <i>Trichoderma</i> que mostraron mayor grado de antagonismo...	29
Figura 10. Crecimiento de T1 en medio tóxico con diferentes concentraciones de clorotalonil a las 72 h después de la inoculación.	33
Figura 11. Crecimiento de T7 en medio tóxico con diferentes concentraciones de clorotalonil a las 72 h después de la inoculación.	34
Figura 12. Crecimiento de T8 en medio tóxico con diferentes concentraciones de clorotalonil a las 72 h después de la inoculación.	34

Figura 13. Crecimiento radial de T1 a las diferentes concentraciones de benomilo y clorotalonil.....	35
Figura 14. Crecimiento radial de T7 a las diferentes concentraciones de benomilo y clorotalonil.....	35
Figura 15. Crecimiento radial de T8 a las diferentes concentraciones de benomilo y clorotalonil.....	36
Figura 16. <i>T. koningiopsis</i> . a- crecimiento en PDA a 25°C, b- crecimiento en SNA a 25°C, c- pigmentación producida en medio PDA, d- pústulas, e-f conidióforos, g- fiálides y conidios, h- clamidosporas, i- cristales producidos en PDA.....	44
Figura 17. <i>T. atroviride</i> a- crecimiento en PDA a 25°C, b- crecimiento en SNA a 25°C, c- pústulas, d- conidióforo etiolado, e-f conidióforos y fiálides, g- conidios...	45
Figura 18. <i>T. pleuroti</i> . a- crecimiento en PDA a 25°C, b- crecimiento en SNA a 25°C, c- conidióforos, d- clamidosporas, e-f- fiálides y conidióforos, g- conidios.....	46

RESUMEN

En las zonas productoras de limón “Persa” del estado de Morelos, una de las enfermedades de mayor incidencia es la muerte descendente causada por el patógeno *Lasiodiplodia* spp. Actualmente el control biológico de fitopatógenos con microorganismos antagonistas representa una alternativa para el manejo de esta enfermedad. En el presente trabajo se evaluó *in vitro* la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. hacia el patógeno *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y su sensibilidad frente a dos fungicidas: benomilo y clorotalonil. Para el aislamiento de *Trichoderma* se colectaron muestras de suelo de cultivos de cítricos de Tepalcingo, Tlaltizapán y Villa de Ayala del estado de Morelos y el patógeno se aisló de plantas enfermas de limón “Persa”. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) mediante la confrontación dual de *Trichoderma* hacia *L. pseudotheobromae*, y la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de las mejores cepas de *Trichoderma* frente a los dos fungicidas. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron por medio de ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Para la obtención de la CI₅₀ se llevó a cabo un análisis de regresión logarítmica mediante el programa estadístico PROBIT. Las cepas de *Trichoderma* con mayor capacidad antagónica se identificaron morfológicamente con base en sus características macroscópicas y microscópicas.

Las cepas de *Trichoderma* que mostraron mayor grado de antagonismo hacia el patógeno fueron la T1 con 68.6 %, T8 con 62.2% y T7 con 61.1 %. Las cepas mostraron una sensibilidad diferente hacia los fungicidas evaluados, el benomilo inhibió completamente su crecimiento. Con el clorotalonil la CI₅₀ para la cepa T1 fue de 1.66 mg/ml, por lo que es moderadamente sensible, para la cepa T7 la CI₅₀ fue de 0.69 y para la cepa T8 fue de 0.49 mg/ml por lo que fueron altamente sensibles. Las cepas fueron identificadas a nivel morfológico como T1- *T.koningiopsis*, T7-*T. atroviride* y T8- *T. pleuroti*. Los resultados muestran que algunas cepas de *Trichoderma* spp. presentan gran potencial para el control biológico de *L. pseudotheobromae*.

Palabras clave: cítricos, *Trichoderma* spp., *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, clorotalonil, benomilo.

SUMMARY

In the “Persa” lemon producing areas of the state of Morelos, one of the most common diseases is dieback caused by the pathogen *Lasiodiplodia* spp. Currently, the biological control of phytopathogens with antagonistic microorganisms represents an alternative for the management of this disease. In the present study, the antagonistic capacity of native strains of *Trichoderma* spp. towards the pathogen *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and its sensitivity towards two fungicides was evaluated *in vitro*: benomyl and chlorotalonil. For the isolation of *Trichoderma*, soils samples were collected from citrus crops of Tepalcingo, Tlaltizapan y Villa de Ayala in the state of Morelos and the pathogen was isolated from diseased “Persa” lemon plants. The percentage of growth inhibition (PGI) of *Trichoderma* towards *L. pseudotheobromae* and the inhibitory concentration (IC₅₀) on the best *Trichoderma* strains against the two fungicides were evaluated. The experimental design was completely randomized with five repetitions per treatment, each repetition had a confrontation. Data were examined by analysis of variance and the means were compared with the Tukey test (p£0.5). To obtain the IC₅₀, a logarithm regression analysis was carried out using the PROBIT statistical program. The *Trichoderma* strains with the greatest antagonistic capacity were identified morphologically based on their macroscopic and microscopic characteristics.

The *Trichoderma* strains that showed the highest degree of antagonism towards the pathogens were T1 with 68.6%, T8 with 62.2% and T7 with 61.1%. These strains showed a different sensitivity towards the fungicides evaluated, benomyl completely inhibited their growth. With chlorotalonil the IC₅₀ for strain T1 was 1.66 mg/ml, so it is moderately sensitive, for strain T7 the IC₅₀ was 0.69 mg/ml and for strain T8 it was 0.49 mg/ml, so they were highly sensitive. The strains were identified by their morphology as *T. koningiopsis* (T1), *T. atroviridae* (T7) and *T. pleuroti* (T8). The results show that some *Trichoderma* stains have great potential for the biological control of *L. pseudotheobromae*.

Keywords: citrus, *Trichoderma* spp., *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, chlorothalonil, benomyl.

1- INTRODUCCIÓN

La citricultura es una de las actividades agrícolas de mayor relevancia, a nivel mundial se estima que se producen 143.7 millones de toneladas de cítricos; en donde los principales países con mayor producción son China, Brasil, Estados Unidos, India y México (FAO, 2021).

A nivel nacional los principales cítricos que se producen son: naranja (*Citrus sinensis*), limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), limón "Persa" (*Citrus latifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*) (SIAP, 2021). En el caso de limones, México a nivel mundial mantiene el segundo lugar en producción con 2,660,971 toneladas cosechadas al año, con un valor de 560,000 millones de dólares, esta producción está representada principalmente por dos especies: el limón "Persa" o sin semilla, y el limón mexicano o con semilla. Actualmente los estados con mayor producción nacional son: Michoacán, Veracruz, Colima, Oaxaca y Tamaulipas (SIAP, 2021).

En Morelos, se han establecido alrededor de mil hectáreas de cítricos, entre los cuales sobresalen el limón "Persa" y la naranja Valencia, con 60% y 30% de la superficie establecida (CESVMOR, 2018). Los principales municipios en los que se desarrollan dichos cultivos son Jojutla, Tepalcingo, Puente de Ixtla, Tlaltizapán y Yautepec. (SIAP, 2018; Alia *et al.*, 2011). Se considera que estos son una alternativa económicamente viable y que representan nuevas ventanas de oportunidad en el mercado interno y en el de exportación (Lugo *et al.*, 2009).

Los cultivos de limón "Persa" en ocasiones se ven afectados cuando hay presencia de enfermedades, una de ellas es la muerte descendente causada por *Lasiodiplodia* spp. Este hongo fitopatógeno disminuye la productividad hasta un 60% y la pérdida anual de árboles puede llegar hasta un 35% (Khanzada *et al.*, 2005; Naqvi *et al.*, 2015). Sin embargo, en la literatura disponible no existe un estudio que cuantifique las pérdidas monetarias de este patógeno (Picos *et al.*, 2015). En México, se reporta la presencia de *Lasiodiplodia* spp. en cultivos de cacao, aguacate, rambután, yaca, zapote, mango, uva, papaya, cítricos, entre otros. (Picos *et al.*, 2015).

En el 2019 se documentó por primera vez en el estado de Morelos, la presencia de *Lasiodiplodia* spp. en arboles de limón “Persa” con síntomas de gomosis, cáncer, muerte regresiva de ramas y muerte de árboles (Valle-de la Paz *et al.*, 2019), estos síntomas se le atribuían en un principio a varias especies de *Phytophthora*, agente causal de la gomosis en cítricos en otros estados de la República Mexicana (Acosta-Pérez *et al.*, 2012); sin embargo, mediante las pruebas de patogenicidad se comprobó que *Lasiodiplodia* spp. era el agente causal de estos síntomas (Valle-de la Paz *et al.*, 2019).

Para contrarrestar los daños que ocasionan estas enfermedades se han desarrollado métodos como el uso de inductores de defensa vegetal, control biológico o fungicidas bioquímicos, ARN de interferencia (ARNi) y fungicidas. Estos últimos, aunque son muy eficaces, son conocidos por sus efectos dañinos sobre los seres vivos, así como por su toxicidad ambiental (Rasgadle *et al.*, 1994; Steinhau *et al.*, 2008). Esto ha despertado el interés de desarrollar métodos más seguros para controlar enfermedades que a su vez sean efectivos y causen menos riesgos para la salud humana y el ambiente. Uno de los métodos viables es el uso de organismos benéficos, como los hongos antagonistas; *Trichoderma* es un género de hongos que ha sido ampliamente estudiado mostrando resultados prometedores en el control de enfermedades, ya que presenta características que lo hacen un buen candidato para el control biológico como es; la competencia por espacio o nutrientes, antibiosis y micoparasitismo, además está registrado que colonizan raíces, estimulan el crecimiento del sistema radial y actúan como biofertilizantes (Saba *et al.*, 2012; Leon *et al.*, 2018). Se ha documentado que en ocasiones el efecto antagónico de *Trichoderma* se ve reducido cuando no se tiene consideración sobre su afinidad o compatibilidad con fungicidas químicos sintéticos que son aplicados en el mismo cultivo, provocando la inhibición de los conidios y el crecimiento del hongo benéfico (Tapwal *et al.*, 2012).

En esta investigación se plantea la evaluación de la capacidad antagónica de especies de *Trichoderma* sobre *Lasiodiplodia* sp., así como determinar la

sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. hacia el clorotalonil y benomilo.

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* hacia el patógeno *Lasiodiplodia* sp. causante de la muerte descendente en el limón persa.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar cepas nativas de *Trichoderma* de la rizosfera de árboles de limón “Persa” del estado de Morelos.
2. Evaluar la capacidad de antagonismo de cepas de *Trichoderma* hacia el patógeno *Lasiodiplodia* en condiciones *in vitro*.
3. Determinar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. hacia los fungicidas clorotalonil y benomilo.

3. HIPÓTESIS

1. Una cepa de la rizosfera de *Trichoderma* mostrará antagonismo hacia el patógeno *Lasiodiplodia* sp.
2. Al menos una cepa de *Trichoderma* mostrará poca sensibilidad a los fungicidas benomilo y clorotalonil.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1 Cítricos a nivel mundial

Los árboles de cítricos (Familia Rutaceae) producen frutos que a nivel mundial tienen una alta demanda, esto se debe a que presentan una serie de características como su aroma y sabor que ha permitido que se integren a nuestra dieta, además de su sabor presentan propiedades nutritivas y suministro de energía como la vitamina C, vitamina B (tiamina, piridoxina, niacina, riboflavina, ácido pantoténico y folato), sacarosa, glucosa y fructosa (Liu *et al*, 2016; Bastías y Cepero, 2016). Las naranjas, limones, limas, toronjas y mandarinas son los cítricos más conocidos por su importancia comercial, cultivándose en más de 140 países, siendo China, Brasil, Estados Unidos, India, México y España los principales productores de cítricos del mundo, representando cerca de dos tercios de la producción mundial (FAO, 2021).

En México en el 2019 se produjeron 8.4 millones de toneladas de cítricos, predominando naranjas (4.7 millones de toneladas), limones y limas (2.7 millones de toneladas), seguidos de toronjas (488 mil toneladas), mandarinas y tangerinas (486 mil toneladas) (SIAP, 2020; FAO, 2021).

4.2 Importancia del limón en México

El limón se posiciona en el segundo lugar en importancia por su consumo en fresco y su uso industrial. México ocupa el segundo lugar en producción mundial de cítricos, siendo el limón “Persa” o sin semilla (*Citrus latifolia* Tanaka) y el limón mexicano o con semilla (*Citrus aurantifolia*) las principales especies que se producen. Datos obtenidos en el 2020 muestran que la producción del limón “Persa” ha aumentado en los últimos años, alcanzando un volumen de 2 millones 851 mil toneladas, 7.2% más respecto a 2019 y 19,8% más comparado con el promedio de los últimos 10 años, generando un valor de producción alrededor de 24.4 millones de pesos. Los estados con mayor producción de este fruto son Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Colima y Tamaulipas (Cuadro 1) (SIAP, 2021).

Cuadro 1. Principales entidades productoras del limón “Persa”

	Entidad federativa	Región	Volumen (toneladas)
1	Michoacán	Centro-Occidente	798,252
2	Veracruz	Sur-Sureste	788,555
3	Oaxaca	Sur-Sureste	281,559
4	Colima	Centro-Occidente	274,486
5	Tamaulipas	Noreste	116,853
6	Jalisco	Centro-Occidente	103,952
7	Tabasco	Sur-Sureste	86,097
8	Guerrero	Centro	80,064
9	Yucatán	Sur-Sureste	79,940
10	San Luis Potosí	Centro- Occidente	45,630
	Resto		196,039

Fuente: Elaboración propia basado de SIAP (2021).

4.3 Enfermedades en cítricos

Los cítricos como cualquier especie bajo condiciones de monocultivo no están exentos de ser atacados por diversas plagas y enfermedades. Desde el punto de vista agronómico, las enfermedades pueden disminuir los rendimientos de un 20 hasta un 40% y en ocasiones, las pérdidas pueden ser totales. Los agentes causales de enfermedades de las plantas son distintos tipos de microorganismos como hongos, bacterias, oomicetos, nematodos, virus, entre otros, conocidos como fitopatógenos. Estos patógenos pueden ocasionar, canchros, necrosis, pudriciones de raíces, pedúnculos y frutos, marchitez, lesiones en las hojas, muerte de ramas, disminución del vigor y la producción del árbol y muerte regresiva (McBride *et al.*, 2010; Orozco *et al.*, 2013; Adesemoye *et al.*, 2014; Showler, 2017).

4.4 Enfermedades fúngicas en el limón

Las plantas con enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos manifiestan marchitez, desfiguración y tejido dañado, reduciendo su valor comercial y por ende generan grandes pérdidas económicas en la producción agrícola (Lindsey *et al.*, 2020). Las principales enfermedades fungosas de mayor importancia en los cítricos, son la gomosis causada por *Phytophthora* spp.; la mancha grasienta, causado por *Mycosphaerella citri*; la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*; la roña causada por *Elsinoe fawcetti*; la melanosis causada por *Diaporthe citri* y la muerte descendente causada por especies de *Lasiodiplodia* spp. (Muñoz *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2016; García-Martín *et al.*, 2018).

4.5 Características de *Lasiodiplodia* spp.

El género *Lasiodiplodia* pertenece a la familia Botryosphaeriaceae, presentan picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros (Figura 1a). Estas características lo distinguen de otros géneros cercanamente relacionados. Los conidióforos son hialinos, simples. Las células conidiogénicas son hialinas, de pared gruesa, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticos, con una o dos anillaciones. Los conidios son subovoides a elipsoidales de paredes gruesas, en un principio hialino y aseptados, convirtiéndose a café oscuro una vez maduros, con un septo, presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada con medidas de 21.5-31.5 x 13-17 μm y una proporción de 1.9 Largo/Ancho (Phillips *et al.*, 2013). Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y a medida que pasa el tiempo se oscurecen (Figura 1b). La temperatura ideal para su crecimiento son 15 °C mínima, 28 °C como óptima y 40 °C como máxima (Alves *et al.*, 2008).

Clasificación del género *Lasiodiplodia* Ellis y Everh (1896):

Reino Fungi

División Ascomycota

Subdivisión Pezizomycotina

Clase Dothideomycetes

Orden Botryosphaariales

Familia Botryosphaariaceae

Género *Lasiodiplodia*

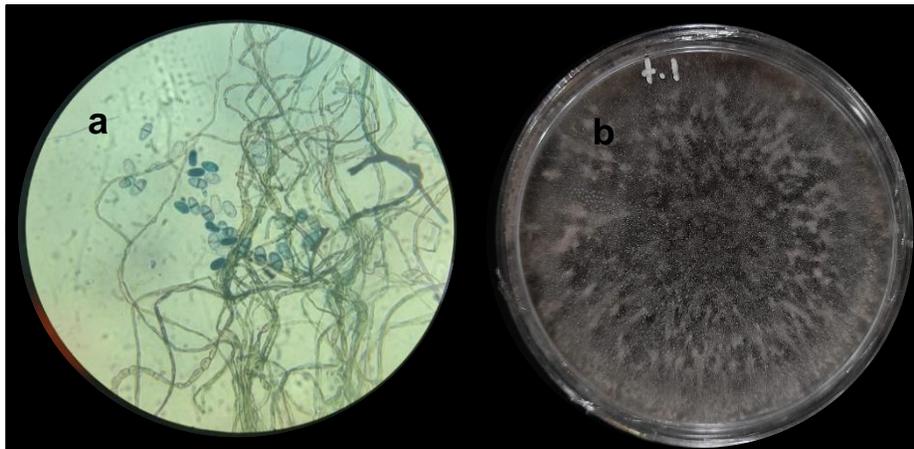


Figura 1. *Lasiodiplodia* sp. a) Conidios jóvenes y maduros b) Colonia a los 7 días de crecimiento a 25°C en medio de cultivo PDA.

4.6 *Lasiodiplodia* spp. como agente causal de enfermedades en cultivos

El género *Lasiodiplodia* spp. es conocido a nivel mundial por su asociación como causantes de enfermedades de varias especies vegetales, principalmente la muerte regresiva presentando exudación de goma, pudrición, momificación de frutos, entre otros. (Phillips *et al.*, 2013; Polanco *et al.*, 2019; Flores *et al.*, 2021).

En México se ha reportado la presencia de este patógeno en una gran diversidad de cultivos por toda la República Mexicana, como en los cultivos de cítricos *Citrus*

spp. en los estados de Tamaulipas, Morelos y Veracruz (Polanco *et al.*, 2019; Flores-Hernandez *et al.*, 2021; Leyva-Mir *et al.*, 2021), mango (*Mangifera indica* L.) en los estados de Michoacán y Guerrero (Sandoval *et al.*, 2013), zapote mamey (*Pouteria zapota*) en el estado de Guerrero (Tovar- Pedraza *et al.*, 2012), en vid (*Vitis vinífera*) L. en Baja California (Nieblas, 2012) y yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) (Medina-Tiznado *et al.*, 2018), en el estado de Nayarit, causando pérdidas económicas en las distintas etapas de la producción.

En el estado de Morelos, se tienen registros de varias especies de *Phytophthora* como agentes causales de la gomosis en cítricos (Acosta-Pérez *et al.*, 2012). Los síntomas causados por *Phytophthora* observados en árboles de limón “Persa” son similares con los causados por *Lasiodiplodia* spp. en varias especies de árboles (Abdollahzadeh *et al.*, 2010), por lo que es común confundirlos. Recientemente se identificó a *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, causando muerte descendente en arboles de limón “Persa” (Valle- de la Paz *et al.*, 2019). Este nuevo reporte sugiere que el impacto de las especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae sobre los cítricos no se ha investigado suficientemente, por lo que es posible, que la diversidad de hongos de esta familia en cítricos no se conoce con certeza y, es posible que causen más daño de lo que se conoce (Adesemoye *et al.*, 2014).

5. Control de *Lasiodiplodia* spp.

5.1 Control químico

El manejo de esta enfermedad consiste principalmente en aplicaciones de fungicidas de origen sintético como el metil tiofanato, tiabendazol, clorotalonil, mancozeb, entre otros. Se ha probado que el uso de tiabendazol combinado con tratamiento físico (lavado) para el control de la *L. theobromae* que ocasiona la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey, disminuye la incidencia de la enfermedad hasta un 81%. Otros fungicidas como la mezcla pre-formulada de ciprodinil + fludioxonil evaluados *in vitro* han mostrado inhibir el

crecimiento micelial de *L. theobromae* con valores de $EC_{50} = 0.0043 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido por piraclostrobina + boscalida, procloraz y tebuconazole con $EC_{50} < 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, e iprodiona y tiabendazol con valores $EC_{50} < 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. (Tovar-Pedraza *et al.*, 2013).

Aunque la aplicación de estos químicos para controlar el crecimiento de fitopatógenos ha sido satisfactoria, en la mayoría de los casos pueden causar efectos adversos para la salud de los seres humanos y del ambiente (Kleinstreuer *et al.*, 2013; Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Así, hoy en día se plantea la sustitución total o parcial del control químico con otras alternativas que no presenten estos daños colaterales y al mismo tiempo equilibren las perturbaciones ecológicas provocadas por los agroquímicos.

5.2 Control biológico con microorganismos antagonistas

El control biológico se puede definir como la acción para mantener a una población de organismos plaga en baja densidad disminuyendo sus efectos, con la ayuda de depredadores, parásitos, patógenos, microorganismos, o agentes de control que pueden estar presentes de manera natural o ser introducidos (Baron *et al.*, 2019).

En años recientes, se ha obtenido ventaja de los antagonismos biológicos naturales y se han desarrollado estrategias que permiten aplicar eficazmente el control biológico contra diferentes enfermedades de plantas, obteniendo resultados muy satisfactorios (Sánchez *et al.*, 2008). Las características que presentan estos microorganismos y por lo cual los hace excelentes agentes de control biológico es la capacidad que tienen de colonizar superficies y persistir; capacidad de adaptación y sobrevivencia; una mayor habilidad para adquirir nutrientes; estabilidad genética; eficacia en bajas concentraciones; bajos requerimientos de elementos nutricionales especiales y eficacia en una amplia gama de microorganismos patógenos (Ulloa-Ogaz *et al.*, 2015). Algunos hongos, nematodos, bacterias y virus han mostrado disminuciones significativas de las poblaciones de plagas y enfermedades. *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.,

Paecilomyces spp., y *Verticillium* spp., son los microorganismos de biocontrol más estudiados por su capacidad antagonista. (Boland y Kuykendall, 1998; Sánchez y Ramírez, 2022).

5.3 Generalidades de *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocreae*, Ascomycota, Hypocreales), fue descrito por Persoon hace más de 200 años. Actualmente incluye más de 400 especies en diversas regiones geográficas y zonas climáticas del mundo, (Bissett *et al.*, 2015; Cai y Druzhinina, 2021). En México se han reportado 42 especies de *Trichoderma* a nivel morfológico (Allende-Molar *et al.*, 2022) y es uno de los hongos más comunes que habitan en la madera en descomposición, en el suelo y también se pueden encontrar asociados con las plantas de manera endófitas. La temperatura ideal para su crecimiento abarca los 25-30°C (Sandle, 2014; Samuels y Hebbar, 2015). Algunas especies de *Trichoderma* son aprovechadas ampliamente por el ser humano como *T. reesei* que es utilizado como productor industrial de enzimas; *T. atroviride* utilizada para la producción de metabolitos secundarios, como el aroma de coco 6-pentil- α -pirona (Dodd *et al.*, 2003), mientras que *T. harzianum*, *T. virens*. *T. atroviride* y *T. asperellum* son utilizados ampliamente como agentes de biocontrol contra diferentes enfermedades de cultivos (Harman *et al.*, 2004). Aunado a esto, se ha documentado que este género promueve el crecimiento de las plantas, estimula su inmunidad y remedia los contaminantes del suelo (Degani y Dor, 2021).

Clasificación del género *Trichoderma*. Persoon (1794):

Reino Fungi

División Ascomycota

Subdivisión Pezizomycotina

Clase Sordariomycetes

Orden Hypocreales

Familia Hypocreaceae

5.4 *Trichoderma* spp. como antagonista

La fácil manipulación, versatilidad y la gran capacidad de adaptabilidad a diferentes ambientes, ha permitido el uso de *Trichoderma* spp. en el control biológico, especialmente contra fitopatógenos nativos del suelo como *Fusarium oxysporum* (Zhou *et al.*, 2020), *Phytophthora* spp.(Nath *et al.*, 2014) y *Pythium graminícola* (Dubey *et al.*, 2020), entre otros. *Trichoderma* spp. presenta múltiples mecanismos de acción, como la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios. (Verma *et al.*, 2007; Mesa-Vanegas *et al.*, 2020). Cabe destacar, que estos atributos pueden depender más de las cepas que de la especie, ya que pueden presentar modos de acción diferentes, aun perteneciendo a la misma especie. Por ello, es importante realizar una adecuada selección de los aislamientos con relación a sus dianas y ambientes, para tener resultados prometedores en condiciones de campo, debido a esto, los ensayos *in vitro* para determinar antagonismo son una herramienta buena y confiable para conocer el potencial como agente de biocontrol de las cepas evaluadas (Larralde *et al.*, 2008).

5.5 Compatibilidad de fungicidas con *Trichoderma* spp.

La actividad antagónica de los hongos, en ocasiones se ve afectada cuando hay presencia de agroquímicos en los agroecosistemas, esto se debe a que pueden presentar sensibilidad ante estos químicos, incidiendo en su desempeño como agentes de control. Se ha reportado que *Trichoderma* spp. ha mostrado tolerancia a la presencia de plaguicidas como CURACARB® (carbendazim) y MANZATE® (mancozeb) (Pineda-Zambrano y González-García, 2020) , sin embargo, esta capacidad al igual que sus mecanismos de acción, no pueden generalizarse; ya que depende de la cepa que se evalúe. Bajo este panorama es importante saber el nivel de sensibilidad de la cepa que deseamos utilizar, ya que la mayoría de los

agroecosistemas están contaminadas con residuos químicos utilizados en las prácticas convencionales de manejo de enfermedades (Saito y Suzuki, 2009).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en el estado de Morelos, México. Las muestras de suelo y plantas enfermas de limón “Persa” se colectaron en los municipios de Tepalcingo, Tlaltizapán y Villa de Ayala. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Entomología y Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos UAEM.

6.2 Aislamiento de especies de *Trichoderma* de las muestras de suelo

Para el aislamiento de cepas de *Trichoderma*, se colectaron 5 muestras de suelo de los tres municipios y se procesaron por medio del método de dilución en placa (Figura 2) (Khalili *et al.*, 2012). Los aislamientos se realizaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon™) adicionado con ácido láctico para inhibir el crecimiento de bacterias. Las colonias seleccionadas fueron las que presentaron las características propias del hongo *Trichoderma* (color y crecimiento de la colonia, forma de conidióforos, conidios, etc.), posteriormente, se obtuvieron cultivos monospóricos de *Trichoderma* y se almacenaron para su posterior uso en los bioensayos.

6.3 Colecta de ramas de limón “Persa” enfermas con síntomas de gomosis y muerte descendente de los municipios de Tepalcingo, Tlaltizapán y Villa de Ayala

Se colectaron muestras de ramas primarias, secundarias y troncos de árboles con síntomas de exudación de goma, canchros, manchas negras y muerte descendente.

Las ramas se colocaron en bolsas de polietileno limpias, se anotaron los datos de colecta y se llevaron al laboratorio de Entomología y Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM para su procesamiento (Figura 3a-b).

6.4 Aislamiento del hongo patógeno *Lasiodiplodia* sp.

De las muestras de ramas con síntomas de gomosis se tomaron fragmentos de 0.5 cm². Estos fragmentos se desinfectaron superficialmente por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril por 2 minutos cada uno. Después se secaron en papel filtro estéril con la finalidad de eliminar el exceso de agua. Una vez realizado esto, se colocaron seis fragmentos en cada caja Petri con medio de cultivo PDA. (Figura 3c) y se incubaron. Cuando comenzaron a crecer las colonias de los hongos se reaislaron y se purificaron. Los cultivos puros se obtuvieron sembrando puntas de hifas en PDA (Figura 3d).



Figura 2. a) Muestras de suelo b) Dilución en placa con las muestras de suelo previamente mezcladas c) Cultivo de *Trichoderma* spp. con las diluciones obtenidas d) Colonias crecidas a las 48 horas de cultivo.



Figura 3. a-b) Material vegetal obtenido de árboles enfermos de limón “Persa” c) Crecimiento de cepas del patógeno en medio de cultivo PDA d) Hifas de *Lasiodiplodia* sp.

6.5 Evaluación *in vitro* del antagonismo de los aislamientos de *Trichoderma* hacia el patógeno *Lasiodiplodia* sp.

Para esta evaluación se utilizó la técnica de cultivo dual (Dolatadabi *et al.*, 2012) que consistió en cortar discos de micelio de 5 mm de diámetro de *Lasiodiplodia* sp., se colocaron en un extremo de la caja Petri con medio de cultivo PDA y posteriormente se colocaron discos de micelio de 5 mm de *Trichoderma* en el extremo opuesto de la caja Petri (Figura 4). Cada 24 horas se midió con una regla milimétrica el crecimiento micelial de ambos hongos con la finalidad de registrar su crecimiento. El bioensayo se concluyó cuando el micelio del antagonista con el del patógeno se toparon.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de *Trichoderma* hacia *Lasiodiplodia* spp. se calculó por medio de la siguiente fórmula:

PIC= [(A-B/A)]*100 donde:

A: crecimiento radial de *Lasiodiplodia* sp. como testigo

B: crecimiento radial de *Lasiodiplodia* sp. junto con *Trichoderma* spp.

Los datos del PIC, expresados en porcentaje se transformaron con el angular arcoseno, para la comparación de los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y se utilizó una prueba de comparación de medias múltiples. Para el caso de porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) se utilizó la prueba de Diferencia mínima significativa (DMS) ($p \leq 0.05$). Dichos datos se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.0 para Windows.

En cuanto la evaluación cualitativa se realizó a los 13 días y se evaluó el grado de antagonismo de acuerdo con la clasificación propuesta por Bell *et al.*, (1982) y modificada por Ávila *et al.*, (2001). (Cuadro 2). Se realizó un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias de los tratamientos. El bioensayo se hizo por duplicado.

Cuadro 2. Escala utilizada para evaluar el grado de antagonismo de *Trichoderma* spp. hacia *Lasiodiplodia* sp. (Modificada por Ávila *et al.*, 2001)

Grado	Interpretación
1	El fitopatógeno ocupa completamente la superficie del medio y crece sobre <i>Trichoderma</i> .
2	El fitopatógeno coloniza el 75% de la superficie del medio entremezclándose con <i>Trichoderma</i> e inhibiéndolo.
3	El fitopatógeno y <i>Trichoderma</i> crecen el 50% deteniendo ambos su crecimiento.
4	<i>Trichoderma</i> sobrecrece al fitopatógeno inhibiéndolo y ocupando el 75% de la caja.
5	<i>Trichoderma</i> sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja.

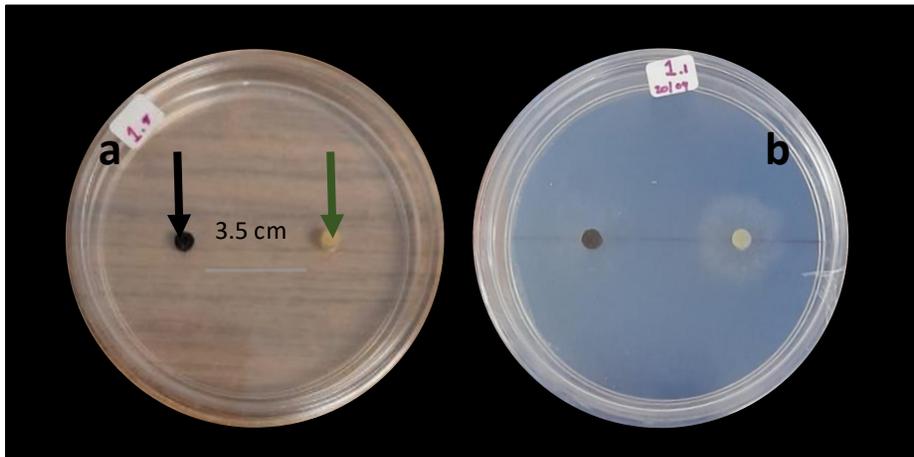


Figura 4. Cultivo dual de *Lasiodiplodia* (flecha negra) sobre *Trichoderma* (flecha verde).

a) día 1 b) día 2

6.6 Identificación morfológica de las especies de *Trichoderma* antagónicas a *Lasiodiplodia* sp.

Las cepas de *Trichoderma* con mayor capacidad antagónica se identificaron morfológicamente con base en sus características macroscópicas y microscópicas. Para la identificación a nivel de especie se utilizó el manual de Samuels y Heber (2015).

Las observaciones morfológicas se hicieron en diferentes medios de cultivo siguiendo el protocolo indicado por Samuels y Heber (2015), a saber, Agar Papa Dextrosa (PDA) Difco™ y Agar Sintético bajo en Nutrientes (SNA). Para obtener la tasa de crecimiento de las cepas se incubaron a 25 y 35°C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h durante 72 h, cada cepa tuvo 5 repeticiones. Cada 24 h se tomaron los datos de crecimiento del micelio., cuando las cepas cubrieron la superficie del medio se registraron las características de las colonias como el color, presencia o ausencia de olor, producción de pústulas, micelio aéreo y pigmentación del medio.

Para la observación microscópica de las estructuras fúngicas se realizaron preparaciones temporales con KOH (3%). Se utilizó un microscopio compuesto y se midieron 30 unidades de las siguientes estructuras: longitud (L) y ancho (A) de

conidios, fiálides (longitud, ancho y la base); ancho de la célula que da origen a la fiálide; y clamidosporas (longitud y ancho). Finalmente, se obtuvieron imágenes de las estructuras analizadas utilizando un microscopio óptico (Nikon H550L) equipado con cámara digital Lumenera 1.

6.7 Evaluación de la sensibilidad de *Trichoderma* spp. hacia los fungicidas benomilo y clorotalonil

De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp., hacia *Lasiodiplodia* sp. se seleccionaron las cepas que mostraron un mayor efecto antagónico, para la evaluación *in vitro* de la compatibilidad de los aislamientos de *Trichoderma* spp. hacia 9 concentraciones diferentes de ANTRAK® 50 PH y TITANIC® 72 PH, fungicidas utilizados para el control preventivo de enfermedades fungosas en plantas (Cuadro 3).

La variable evaluada fue la inhibición del crecimiento micelial del hongo *Trichoderma*. Para llevar a cabo estas evaluaciones los fungicidas se mezclaron con el medio de cultivo PDA, de manera similar al método descrito por Russel *et al.*, (2004), y se utilizaron las concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 mg/ ml, con 8 repeticiones para cada tratamiento con su respectivo control (sin fungicida).

Cuadro 3. Descripción de los fungicidas químicos evaluados hacia *Trichoderma* spp.

Producto comercial	Grupo químico	Ingrediente activo (i.a)	Concentración (i.a)	Características
ANTRAK® 50 PH	Bencimidazol	benomilo	50%	De amplio espectro que controla una gran cantidad de enfermedades, sistémico, preventivo y curativo.
TITANIC® 72 PH	Aromático policlorado	Clorotalonil	75%	De amplio espectro, de aplicación foliar y no sistémico, con un tipo de acción por contacto.

A las 24 horas de la preparación del medio, los discos miceliales (5 mm de diámetro) de cada aislado se colocaron boca abajo en el centro de cada caja de Petri, se sellaron con cinta Parafilm y posteriormente se incubaron a 25 ± 2 y fotoperiodo de 12 h durante siete días. Cada 24 h se midió el crecimiento de los dos diámetros perpendiculares con una regla milimétrica hasta que el crecimiento de la colonia del tratamiento control alcanzó el borde de la caja Petri (Figura 5). Para determinar el efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de cada cepa de *Trichoderma*, se tomaron los datos obtenidos de los crecimientos de las colonias control como referencia y se usó la siguiente fórmula descrita por Reza- Asef *et al.*, (2008).

Fuente: Ficha técnica productores

$$PI = (C - T) / C \times 100$$

Dónde:

PI: Porcentaje de inhibición

C: Diámetro del crecimiento de la colonia testigo

T: Diámetro del crecimiento de la colonia tratamiento

Posteriormente los porcentajes de inhibición (PI) fueron transformados a porcentajes de compatibilidad [PC=100-PI] (Khirallah *et al.*, 2016).

Donde:

PC: Porcentaje de compatibilidad

PI: Porcentaje de inhibición

Se utilizó un diseño completamente al azar con 8 repeticiones para cada tratamiento y su respectivo control. La unidad experimental fue una caja Petri adicionada con la concentración de fungicida e inoculada con una rodaja del aislamiento de *Trichoderma*. Los datos obtenidos del crecimiento micelial y los porcentajes de inhibición para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p < 0,05$), Dichos datos se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.0 para Windows.

Así también, se clasificó la toxicidad de cada concentración de los fungicidas con los valores de inhibición del crecimiento de las colonias a las 96 h, utilizando la escala de clasificación establecida por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) (Cuadro 4). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de regresión logarítmica mediante el programa estadístico PROBIT para obtener la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada fungicida, la cual inhibe el 50% del crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma*.

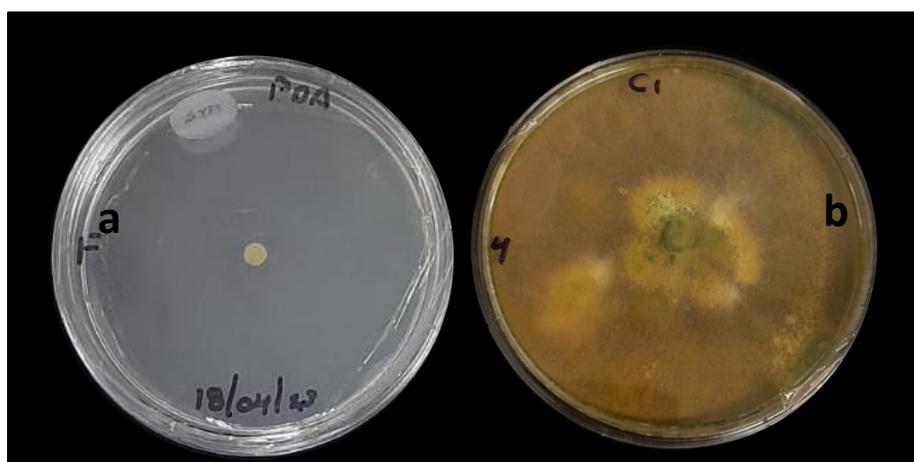


Figura 5. Evaluación de sensibilidad de *Trichoderma* sp. a diferentes concentraciones del fungicida benomilo. a) rodaja de *Trichoderma* sp. en medio toxicado b) tratamiento control a las 96 horas.

Cuadro 4. Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas según el valor de inhibición sobre el crecimiento de la colonia de los hongos de acuerdo con OILB.

Inhibición del crecimiento (%)	Clasificación
< 30%	Inofensivo
30-75 %	Ligeramente tóxico
75-90%	Moderadamente Tóxico
>90%	Tóxico

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento de especies de *Trichoderma* de las muestras de suelo

En este trabajo, se aislaron diferentes cepas de *Trichoderma* de la rizosfera de árboles de limón "Persa. Se ha reportado que este género es cosmopolita y que se encuentra naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición; no obstante, Michel Aceves *et al.*, (2001) mostró que las poblaciones de *Trichoderma* varían significativamente entre suelos y estados, esto concuerda con los resultados obtenidos en este bioensayo, ya que a pesar de que se procesaron varias muestras de suelo de tres municipios del estado del Morelos, las poblaciones de *Trichoderma* fueron bajas. En el Cuadro 5, se muestra el número de cepas aisladas de *Trichoderma* por cada municipio, aislándose un total de 15 cepas. Cabe mencionar que uno de los problemas que se nos presentó fue la contaminación de las cepas obtenidas de los municipios de Tepalcingo y Puente de Ixtla, por lo que se optó en realizar nuevamente aislamientos de *Trichoderma* spp., utilizando únicamente muestras de suelo del municipio de Tlaltizapán obtenidas de diferentes localidades. De este modo, se obtuvieron 10 cepas y se etiquetaron de la siguiente manera para su posterior evaluación (Cuadro 6).

Cuadro 5. Resultados de los aislamientos de *Trichoderma* spp. de los diferentes municipios.

Localidad	Municipio	Campo	Productor	Numero de muestras	Total de aislamientos	Colonias crecidas	Cepas de <i>Trichoderma</i>
Zacapalco	Tepalcingo, Morelos	Pochotillo	Enrique Leana Trejo	5	45	20	1
San Rafael	Tlaltizapán, Morelos	Peña de la virgen	Noel Perdomo García	5	45	57	2
Huatecalco	Tlaltizapán, Morelos	Acamilpilla	-----	5	45	13	4
Ticuman	Tlaltizapán, Morelos	-----	-----	5	45	11	4
-----	Puente de Ixtla, Morelos	Peña-Coco	Álvaro Villa	5	45	42	4

Cuadro 6. Cepas de *Trichoderma* obtenidas de diferentes localidades del municipio de Tlaltizapán, Morelos.

Cepas	Localidad
T1	Huatecalco
T2	Ticuman
T3	Ticuman
T4	San Rafael
T5	Huatecalco
T6	Ticuman
T7	Huatecalco
T8	Ticuman
T9	San Rafael
T10	Huatecalco

7.2 Aislamiento de *Lasiodiplodia* sp.

De los 88 fragmentos de tallos de árboles con síntomas de gomosis y muerte regresiva, solo se logró aislar a *Lasiodiplodia* sp. en las muestras obtenidas del municipio de Puente de Ixtla (Cuadro 7). Estos resultados difieren con los obtenidos por Valle de la paz *et al.*, (2019) donde aisló a *Lasiodiplodia* sp. en el municipio de Tlaltizapán. El aislamiento de este patógeno en un municipio del estado de Morelos, donde no se había aislado resulta relevante, Mullen *et al.*, (1991) mencionan que algunos factores que pueden influir para que la enfermedad se produzca es el estrés por sequía, por lo que es posible que algunas especies patógenas pueden estar presentes en los cultivos como saprófitas o endófitas sin causar ningún tipo de síntomas, hasta que se presentan las condiciones favorables para causar la enfermedad. Mohali *et al.*, (2015) mencionan que *Lasiodiplodia* spp. presenta estos comportamientos, por lo que, es posible que este patógeno este presente en más municipios del estado de lo que se estima, incluso podría estar dañando otros cultivos. Las características macroscópicas y microscópicas del aislamiento obtenido de los tejidos enfermos de limón “Persa” corresponden a la descripción de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* proporcionada por Chen *et al.* (2021).

Cuadro 7 . Resultados de los aislamientos de *Lasiodiplodia* sp. de los diferentes municipios

Municipio	Fragmentos de tallos aislados	Colonias crecidas	Fitopatógenos aislados
Tepalcingo	48	27	<i>Colletotrichum</i> spp.
Tlaltizapán	28	14	<i>Alternaria</i> spp.
Puente de Ixtla	12	5	<i>Lasiodiplodia</i> spp.

7.3 Inhibición del crecimiento (PIC) y sobrecrecimiento de *Trichoderma* spp. hacia el patógeno *Lasiodiplodia* sp.

Las pruebas de confrontación dual mostraron que las cepas de estudio tienen una respuesta antagónica de competencia por espacio y nutrientes, ya que el crecimiento de las colonias de fitopatógenos fue detenido por el desarrollo de las colonias de *Trichoderma* spp. Adicional a esto, las cepas se crecieron de manera individual y se incubaron a 25°C en PDA, con el objetivo de conocer el crecimiento que presentan cuando se cultivan individualmente. En la Figura 6 se puede ver que tanto las cepas de *Trichoderma* como las del patógeno presentaron un crecimiento exponencial, siendo el patógeno el que presentó el mayor crecimiento con alrededor de 70 mm a las 96 h después de la inoculación. En cuanto las tres cepas de *Trichoderma*, presentaron un crecimiento similar con alrededor de 60 mm a las 96 h. Estos datos comprueban el efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Lasiodiplodia* sp., ya que cuando el patógeno se inocula solo su crecimiento en la caja Petri es superior que las cepas del hongo antagonista, mientras que cuando se inoculan en la misma caja Petri su crecimiento es afectado por *Trichoderma* spp.

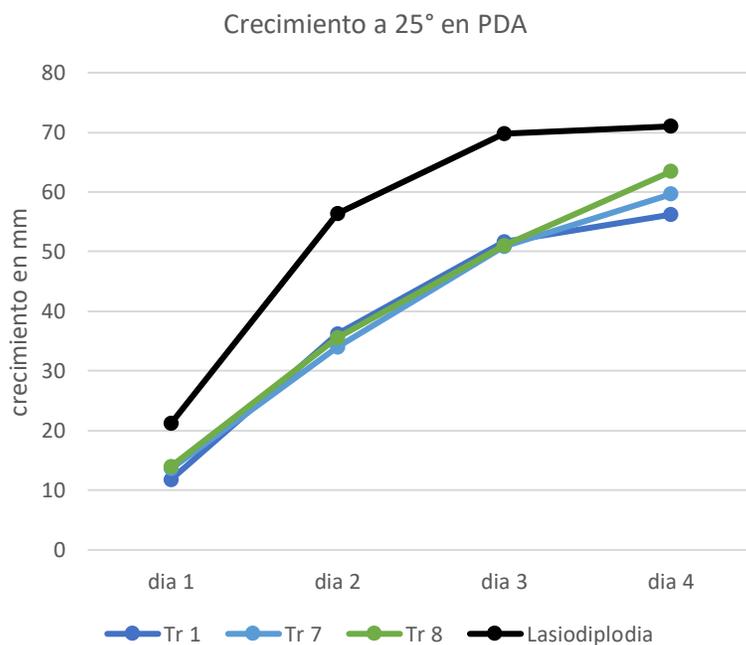


Figura 6. Crecimiento radial a las 96 horas de las cepas de *Trichoderma* y *Lasiodiplodia* sp. en medio PDA incubadas a 25°C

Lo que respecta del primer bioensayo de antagonismo, se observaron diferencias en el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia* sp. cuando se confrontó con las cepas de *Trichoderma*. El porcentaje de inhibición de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas de *Trichoderma* hacia el fitopatógeno fue del rango de 49.1 al 68% a las 72 h. En la Figura 7 se observa que las cepas que mostraron un mayor PIC fueron T1 -68%, T8 -62.2%, T7- 61.1%, T2 -60.5% y T6-60.3% siendo la T1 la única cepa que mostro diferencias estadísticamente significativas respecto a las demás (DMS $P<0.05$). La cepa que mostró menor porcentaje de inhibición fue la cepa T4 con 49.1 %. Se observó que el patógeno dejo de crecer cuando el micelio de *Trichoderma* entró en contacto con este y comenzó a sobrecrecerlo. En cuanto al sobrecrecimiento, las cepas que mostraron gran capacidad para sobrecrecer al patógeno de un 95 a 100% a los 13 días de la evaluación fueron las cepas T2, T4, T1, T6, T8 y T7 clasificándose en grado 5, en tanto las cepas T5, T3 y T10 se clasificaron en grado 4 al sobrecrecer al patógeno en un 80%, mientras que la cepa T9 presento menor capacidad para sobrecrecerlo con un 65% quedando de esta manera en grado 3 (Cuadro 8).

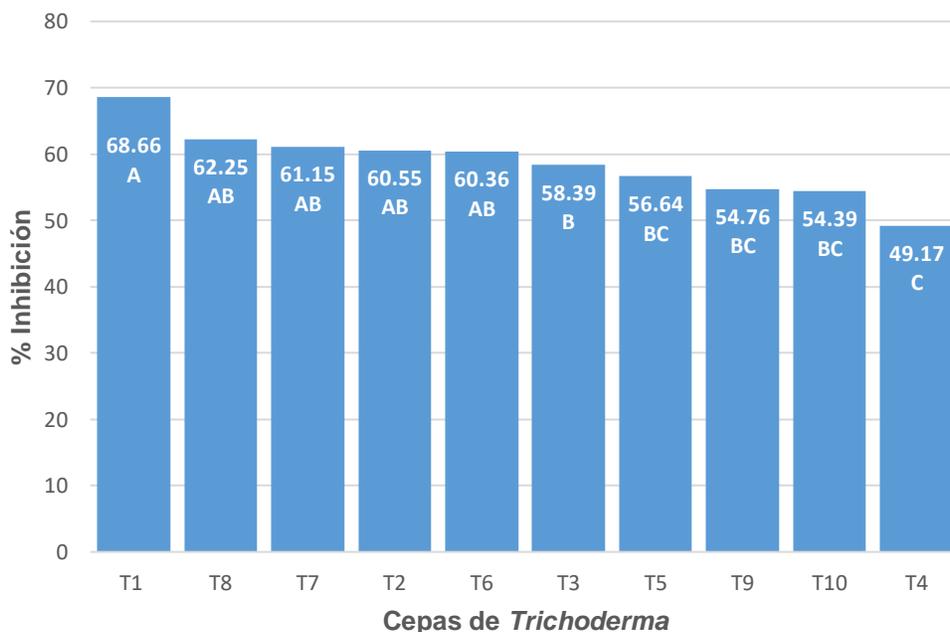


Figura 7. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp. hacia *Lasiodiplodia* sp. *Las letras diferentes significan diferencias significativas entre las cepas (DMS $P<0.05$)

Cuadro 8. Sobrecrecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. hacia *Lasiodiplodia* sp.

Cepa	%	N° de escala	Grupos
T2	100	5	A
T4	100	5	A
T1	95	5	A
T6	95	5	A
T8	95	5	A
T7	90	5	AB
T5	80	4	AB
T3	80	4	AB
T10	80	4	AB
T9	65	3	B

*Tiempo de observación 13 días. Las letras diferentes significan diferencias significativas entre los aislados (Tukey $P < 0.05$).

En el segundo bioensayo las cepas de *Trichoderma* mostraron un efecto inhibitorio de un 46.8 a 57.8%, siendo las cepas T8, T5, T6, T3 y T7, las que mostraron mayor capacidad para inhibir el crecimiento del patógeno, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas (DMS $P < 0.05$) (Figura 8). En cuanto al sobrecrecimiento las cepas evaluadas mostraron resultados más favorables con un 75 a 100% de sobrecrecimiento a los 13 días, siendo las cepas T3, T6, T8, T7 y T2, clasificadas en grado 5 (Cuadro 9), por su gran capacidad de colonizar y esporular sobre el patógeno. En lo que respecta a la cepa T10, fue la que mostro menor sobrecrecimiento con un 75%, clasificándose de esta manera en grado 4.



Figura 8. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp. hacia *Lasiodiplodia* sp. Las letras diferentes significan diferencias significativas entre las cepas (DMS $P < 0.05$)

Cuadro 9. Sobrecrecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. hacia *Lasiodiplodia* sp.

Cepa	%	N° de escala	Grupos
T3	100	5	A
T6	100	5	A
T8	100	5	A
T7	95	5	A
T2	95	5	A
T9	90	5	AB
T4	90	5	AB
T1	85	4	AB
T5	75	4	B
T10	75	4	B

*Tiempo de observación 13 días. Las letras diferentes significan diferencias significativas entre los aislados (Tukey $P < 0.05$)

Estos resultados muestran que las cepas evaluadas presentan gran capacidad para inhibir y sobrecrecer al patógeno. Estos resultados difieren con el trabajo realizado por Nieblas (2012) en donde mostró que *T. atroviride* tuvo un efecto inhibitorio de crecimiento alrededor del 30% sobre *L. theobromae*. Estos resultados de los autores mencionados son menores a los obtenidos en este trabajo, esto quiere decir que las cepas nativas de la rizosfera de árboles de limón “Persa” evaluadas en este trabajo presentan mayor capacidad de inhibir a *Lasiodiplodia* sp. En otro estudio similar realizado por Jagraj *et al.* (2018) se reportó un PIC de 55.6% para cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de plantas de jitomate frente a *T. koningiopsis*-. En cuanto al sobrecrecimiento Michel-Aceves *et al.*, (2019) obtuvieron un antagonismo grado II en la escala propuesta por Bell *et al.*, (1982) sobre *F. oxysporum* con *T. harzianum*, que fueron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

Andrade-Hoyos *et al.*, (2019) evaluaron el efecto antagónico de *Trichoderma* spp., en confrontaciones *in vitro* mediante cultivos duales, tres especies de *Trichoderma* provenientes de la rizósferas de árboles de aguacate, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. asperellum* y tres fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* obtenidos de las raíces de plantas de Chile con síntomas de la marchitez. Los tres hongos antagonistas presentaron alto porcentaje de inhibición, *T. asperellum* mostró el 88.25%, *T. viride* 87.22% y *T. harzianum* con 87.8%. Mostrando el efecto antagónico eficiente de *Trichoderma* spp. hacia los patógenos que causan la marchitez del Chile. De la misma manera, Halifu *et al.*, (2020) evaluaron a *T. virens* ZT05cual mostró un efecto antagónico significativo contra *R. solani*. Inhibiendo su crecimiento en un 42.82% a las 48 h. Otra investigación realizada por Barco *et al.*, (2020) al evaluar a *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. koningiopsis*, registró que estas especies fueron capaces de retrasar significativamente el desarrollo micelial de *L. theobromae in vitro*, con reducciones máximas de 75,4 y 64,1 % confrontadas con *T. asperellum* BRS-1 y *T. harzianum* BRS-respectivamente.

De la misma forma Langa-Lomba *et al.*, (2022) evaluaron la capacidad de dos cepas de *Trichoderma* aisladas de la vid frente a los patógenos *Neofusicoccum parvum* y

Rhizoctonia solani. Los resultados que obtuvieron en las confrontaciones en placa mostraron que los diferentes aislados de *T. harzianum* utilizados fueron más efectivos para inhibir el crecimiento micelial de *N. parvum* con valores de PIC entre 44,65 y 51,32% para *R. solani* para el cual se obtuvieron valores de PIC entre 20,57 y 28,04%.

En los trabajos analizados anteriormente se evidencia de manera notable que el porcentaje de inhibición es variable de acuerdo con la cepa de *Trichoderma* y al patógeno confrontado. Estos hallazgos sugieren que las especies de *Trichoderma* tienen una tasa de incorporación de nutrientes y un metabolismo superior a los patógenos confrontados, permitiendo aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos (Michel-Aceves *et al.*, 2005).

La importancia de realizar este tipo de evaluaciones en el laboratorio es que permite la selección adecuada de cepas antagónicas eficientes de *Trichoderma* para realizar su evaluación posterior en condiciones de campo y así tener resultados confiables para su aplicación.

7.4 Sensibilidad de *Trichoderma* spp. hacia los fungicidas benomilo y clorotalonil

Se sabe que la efectividad de los hongos benéficos habitantes del suelo depende de varios factores, como la sensibilidad ante la presencia de plaguicidas en los agroecosistemas. Por ello, se planteó evaluar la sensibilidad de cepas nativas de *Trichoderma* a dos fungicidas utilizados ampliamente para el control de *Lasiodiplodia* spp., en las huertas de cítricos del estado de Morelos, México.

Para esta etapa se seleccionaron las cepas de *Trichoderma* que mostraron mayor grado de antagonismo en los ensayos previos fueron la T1, T2, T3, T6, T7 y T8 (Figura 9), de las cuales se seleccionaron las tres mejores para esta evaluación, tomando en cuenta sus características culturales con la finalidad de evaluar cepas diferentes, debido a que algunas presentaron la misma coloración y crecimiento. Por lo tanto, para este bioensayo se utilizaron las cepas T1, T7 y T8.

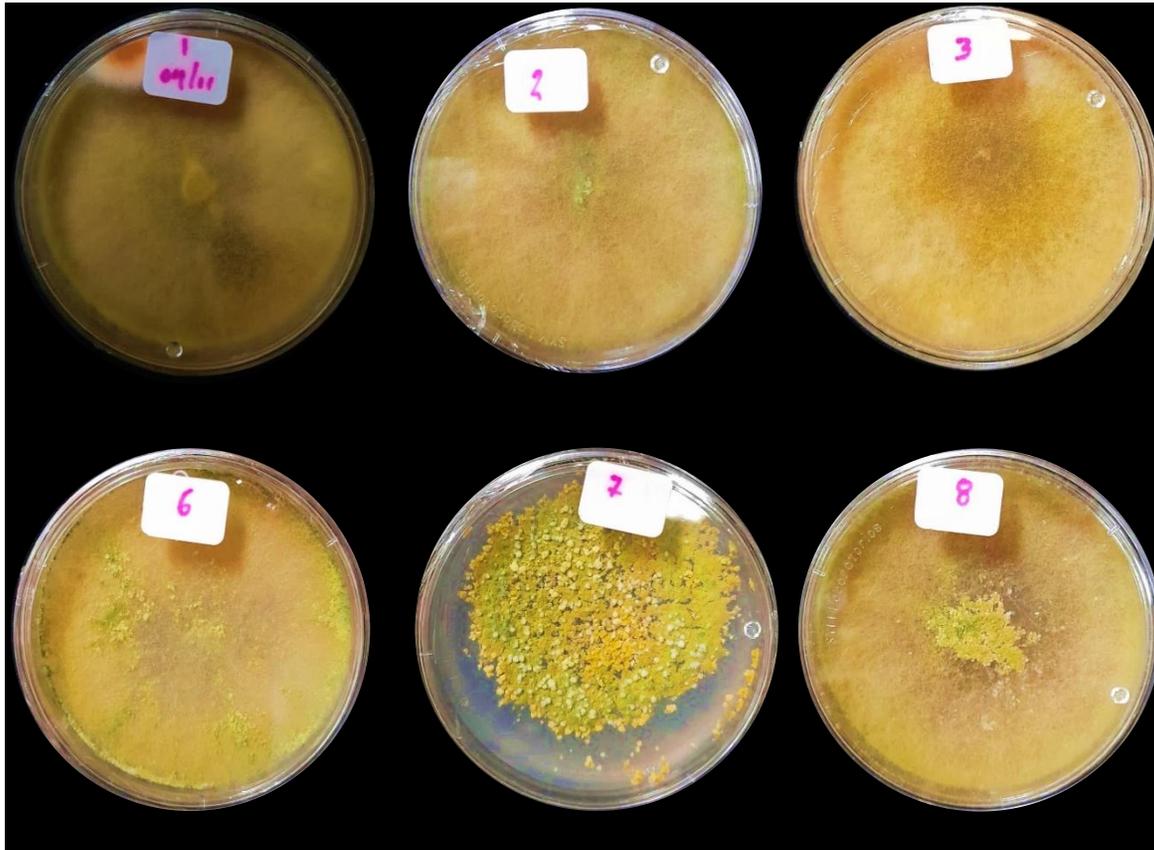


Figura 9. Cepas de *Trichoderma* que mostraron mayor grado de antagonismo

7.4.1 Sensibilidad de *Trichoderma* spp. hacia el fungicida benomilo

El fungicida benomilo en las diferentes concentraciones evaluadas inhibió el crecimiento micelial de las tres cepas de *Trichoderma* mostrando que estas cepas son altamente sensibles a este producto (Cuadros 10-12). Por lo que, de acuerdo con la Organización Internacional de Lucha Biológica OILB este fungicida se clasificó como tóxico a las diferentes concentraciones para *Trichoderma* spp.

El benomilo es un fungicida que actúa dentro de la célula fungosa interfiriendo en la síntesis del ADN, inhibiendo la formación de β -tubulina en la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN al RNA (De Liñán, 2012; FRAC, 2019).

La sensibilidad de *Trichoderma* spp. sobre benomilo ya ha sido probada en varios trabajos, por ejemplo, Muiño *et al.* (2001) reportó que el benomilo a las dosis de 50 y 10 mg i. a. L⁻¹ *Trichoderma* spp. presenta mortalidad del 100 %, por lo que se considera tóxico; esto concuerda con el presente estudio debido a que en la cepa T1, T7 y T8 su crecimiento fue nulo. Otro trabajo realizado por Nieblas (2012), donde evaluó la sensibilidad de cepas de *Trichoderma* sobre diferentes concentraciones de benomilo a saber 0.25, 0.5 y a 0.75 µg/ml. Las cepas lograron crecer en todas las concentraciones presentando rangos de inhibición en la concentración de 0.25 µg/ml de 40.3%, en 0.5 µg/ml de 30.6-57.6% y en la concentración más alta de 0.75 µg/ml la mayor inhibición con alrededor del 69 %. Si bien las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a las diferentes concentraciones, el porcentaje de inhibición en la concentración más baja utilizada esta por arriba del 30% y es probable que cuando se sometan a las concentraciones que utilizamos en estas evaluaciones, las cepas sean inhibidas en su totalidad por este fungicida. Asimismo, Rojas (2020) evaluó la sensibilidad de *Trichoderma* spp. hacia benomilo, utilizando la concentración mínima recomendada de la etiqueta (0.3g/l), registró que este fungicida tiene gran capacidad para inhibir el crecimiento de *Trichoderma asperellum* (TFR3) con 99.76%, *Trichoderma harzianum* (TA4) con 99.83%, *Trichoderma barbatum* (SS2) con 99.87% y *Trichoderma tomentosum* (SS1) con 100%; lo mencionado el referido autor concuerda con el presente estudio.

Cuadro 10. Efecto de las diferentes concentraciones de benomilo hacia T1

Concentración (mg/ml)	(% de inhibición de crecimiento)	Compatibilidad	Clasificación de la toxicidad (OILB)
0.01	100	0	Tóxico
0.05	100	0	Tóxico
0.1	100	0	Tóxico
0.5	100	0	Tóxico
1	100	0	Tóxico
5	100	0	Tóxico
10	100	0	Tóxico
50	100	0	Tóxico
100	100	0	Tóxico

Cuadro 11. Efecto de las diferentes concentraciones de benomilo hacia T7

Concentración (mg/ml)	(% de inhibición de crecimiento)	Compatibilidad	Clasificación de la toxicidad (OILB)
0.01	100	0	Tóxico
0.05	100	0	Tóxico
0.1	100	0	Tóxico
0.5	100	0	Tóxico
1	100	0	Tóxico
5	100	0	Tóxico
10	100	0	Tóxico
50	100	0	Tóxico
100	100	0	Tóxico

Cuadro 12. Efecto de las diferentes concentraciones de benomilo hacia T8

Concentración (mg/ml)	(% de inhibición de crecimiento)	Compatibilidad	Clasificación de la toxicidad (OILB)
0.01	100	0	Tóxico
0.05	100	0	Tóxico
0.1	100	0	Tóxico
0.5	100	0	Tóxico
1	100	0	Tóxico
5	100	0	Tóxico
10	100	0	Tóxico
50	100	0	Tóxico
100	100	0	Tóxico

7.4.2 Sensibilidad de *Trichoderma* spp. hacia el fungicida clorotalonil

Para el caso de las evaluaciones con el clorotalonil, los resultados fueron diferentes, como se observa en las Figuras 10,11 y 12 las cepas crecieron en la mayoría de las concentraciones resultando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) sobre el crecimiento micelial de las cepas evaluadas (Cuadro 13). Las cepas que mostraron menor sensibilidad a las concentraciones más bajas fueron la T7 a 0.01 mg con 4.6%, la T1 a 0.01 mg con 5.9%, la T1 a 0.05 mg con 7.3%, la T7 a 0.05 mg con 10.4% y la T8 a 0.05 mg con 15.3%, clasificando de esta forma al clorotalonil a concentraciones bajas como inofensivo para las cepas de estudio, de acuerdo con la OILB. Por otra parte, las cepas que presentaron mayor sensibilidad a las concentraciones más altas evaluadas fueron la T7 a 100 mg con 98.7%, la T7 a 50 mg con 96.1%, la T8 a 100 mg con 94.1% y la T8 a 50 mg con 90.4% quedando de esta manera clasificado el fungicida a concentraciones altas como tóxico. Así

mismo, se determinó que la concentración inhibitoria media (CI₅₀) para la cepa T1 fue de 1.66 mg/ml, para la cepa T7 fue de 0.69 mg/ml y para la cepa T8 la CI₅₀ fue de 0.49 mg/ml. (Cuadros 14, 15 y 16).

En las Figuras 13, 14 y 15, se observa el crecimiento de cada una de las cepas de *Trichoderma* hacia las diferentes concentraciones de los fungicidas. Se observó que a las concentraciones altas del clorotalonil las cepas fueron afectadas negativamente en su crecimiento y a medida que la concentración fue disminuyendo, las cepas tuvieron un mayor crecimiento, incluso en las concentraciones más bajas tuvieron el crecimiento similar a las del control (sin fungicida) a las 72h después de la inoculación.

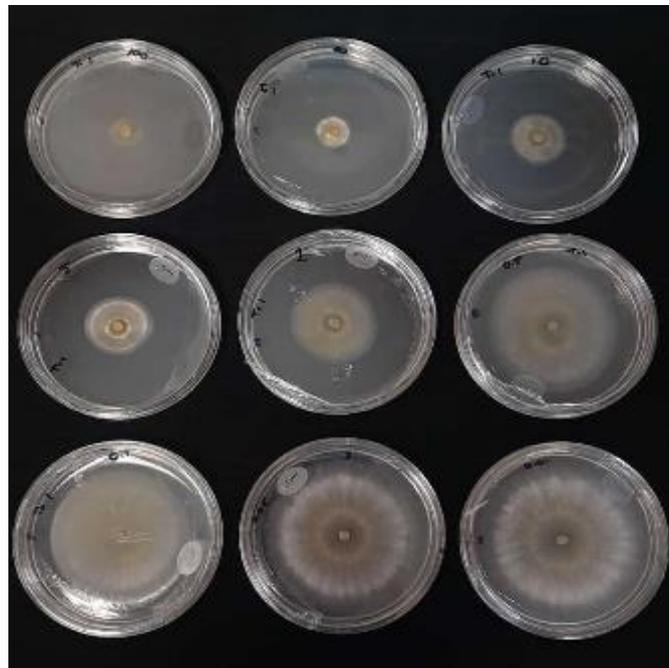


Figura 10. Crecimiento de T1 en medio toxicado con diferentes concentraciones de clorotalonil a las 72 h después de la inoculación.

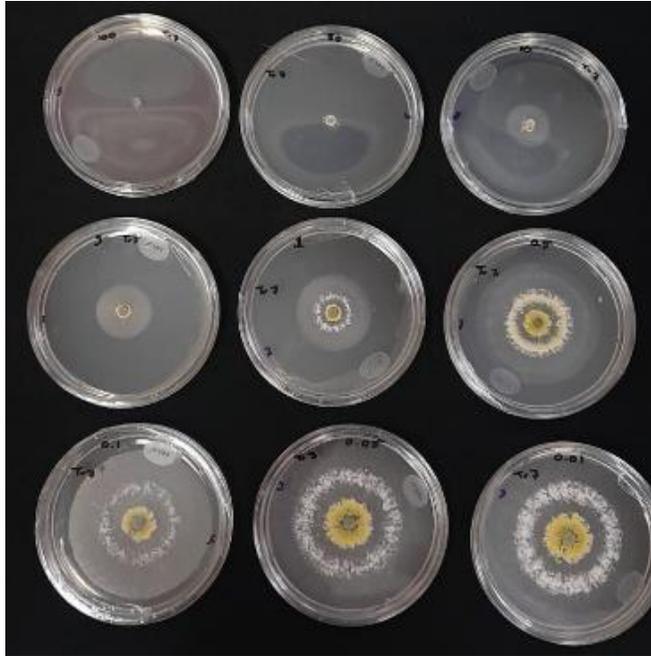


Figura 11. Crecimiento de T7 en medio toxicado con diferentes concentraciones de clorotalonil a las 72 h después de la inoculación.

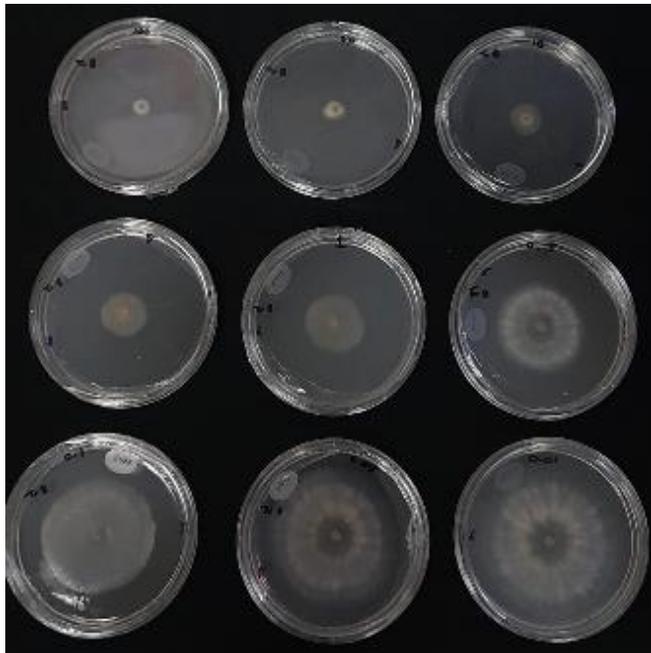


Figura 12. Crecimiento de T8 en medio toxicado con diferentes concentraciones de clorotalonil a las 72 h después de la inoculación.

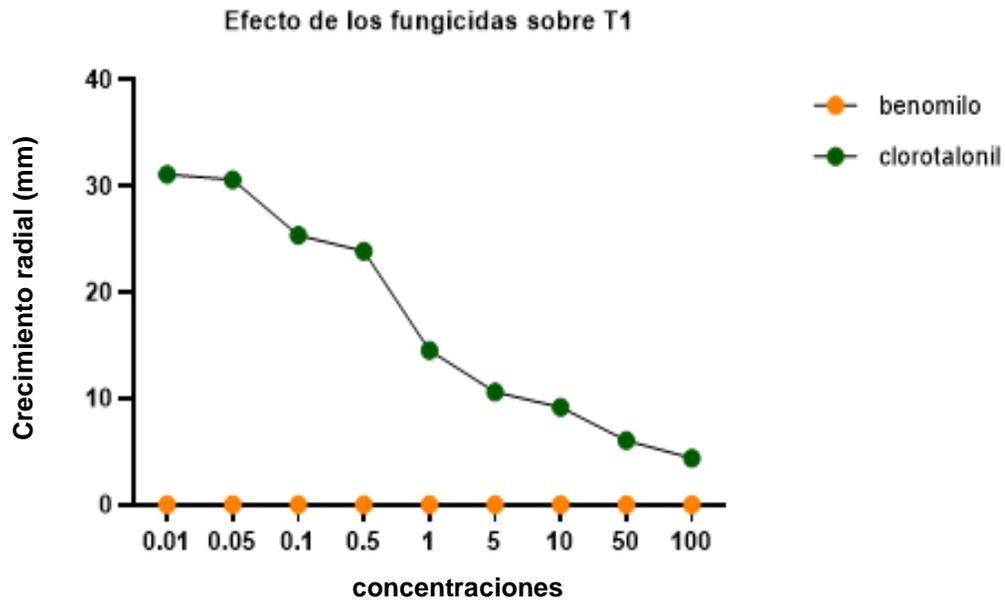


Figura 13. Crecimiento radial de T1 a las diferentes concentraciones de benomilo y clorotalonil

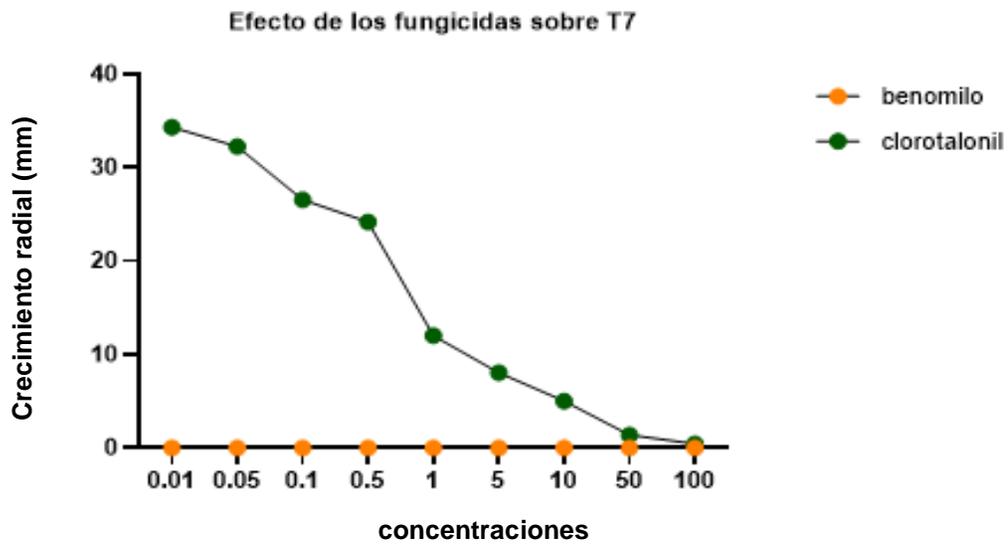


Figura 14. Crecimiento radial de T7 a las diferentes concentraciones de benomilo y clorotalonil

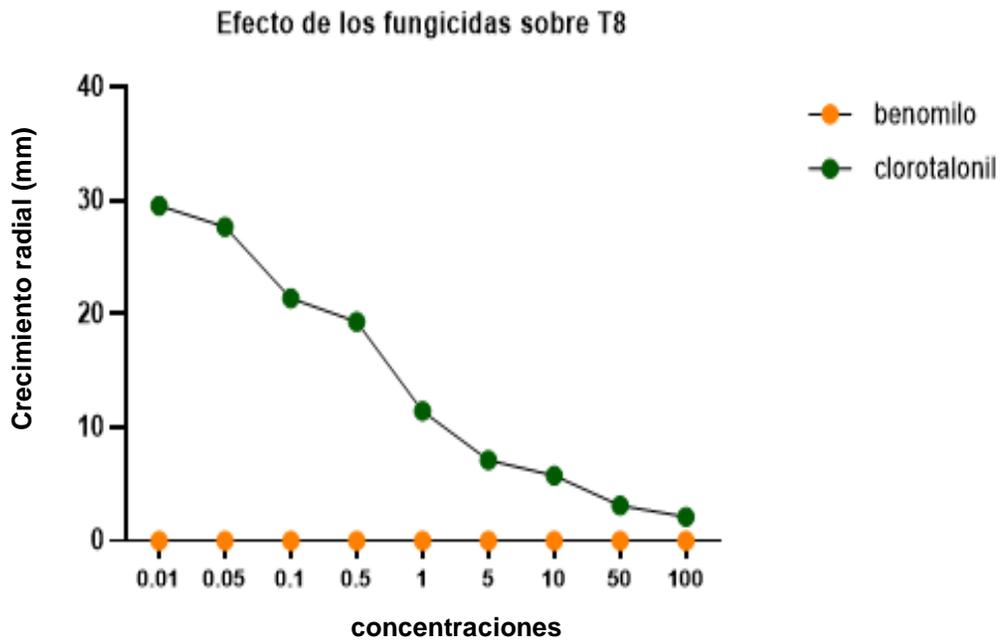


Figura 15. Crecimiento radial de T8 a las diferentes concentraciones de benomilo y clorotalonil

Cuadro 13. Inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. a las diferentes concentraciones de clorotalonil.

concentración	%inhibición	Grupo
T7100	98.7	A
T750	96.1	AB
T8100	94.1	ABC
T850	90.4	BC
T1100	86.7	BCD
T710	86.1	ED
T810	82.3	FE
T150	81.6	FE
T85	78.3	FG
T75	77.6	FG
T110	72.2	HG
T15	67.8	H
T71	66.6	H
T81	64.9	H
T11	55.9	I
T80.5	41.1	J
T80.1	34.7	JK
T70.5	32.8	KL
T10.5	27.8	KL
T70.1	26.2	L
T10.1	23.2	MN
T80.01	17.8	NO
T80.05	15.3	O
T70.05	10.4	P
T10.05	7.3	P
T10.01	5.9	P
T70.01	4.6	P

*Las letras diferentes significan diferencias significativas entre los aislados (Tukey $P < 0.05$)

Cuadro 14 . Efecto del clorotalonil hacia la cepa T1

Concentración (mg/ml)	% de inhibición de crecimiento	% Compatibilidad	Clasificación de la toxicidad (OILB)
0.01	5.91	94.09	Inofensivo
0.05	7.37	92.63	Inofensivo
0.1	23.26	76.74	Inofensivo
0.5	27.81	72.19	Inofensivo
1	55.95	44.05	Ligeramente tóxico
5	67.85	32.14	Ligeramente tóxico
10	72.25	27.74	Ligeramente tóxico
50	81.67	18.33	Moderadamente tóxico
100	86.78	13.21	Moderadamente tóxico

Cuadro 15. Efecto del clorotalonil hacia la cepa T7

Concentración (mg/ml)	% de inhibición de crecimiento	% Compatibilidad	Clasificación de la toxicidad (OILB)
0.01	4.6	95.4	Inofensivo
0.05	10.4	89.6	Inofensivo
0.1	26.2	73.8	Inofensivo
0.5	32.8	67.2	Ligeramente tóxico
1	66.6	33.4	Ligeramente tóxico
5	77.6	22.4	Moderadamente tóxico
10	86.1	13.9	Moderadamente tóxico
50	96.1	3.9	Tóxico
100	98.7	1.3	Tóxico

Cuadro 16. Efecto del clorotalonil hacia la cepa T8

Concentración (mg/ml)	% de inhibición de crecimiento	% Compatibilidad	Clasificación de la toxicidad (OILB)
0.01	17.8	82.1	Inofensivo
0.05	15.3	84.6	Inofensivo
0.1	34.7	65.2	Ligeramente tóxico
0.5	41.0	58.99	Ligeramente tóxico
1	64.9	35.0	Ligeramente tóxico
5	78.3	21.6	Moderadamente tóxico
10	82.3	17.6	Moderadamente tóxico
50	90.4	9.5	Tóxico
100	94.1	5.8	Tóxico

En relación con el clorotalonil García (2019) sostuvo que *Trichoderma* spp. presentan alta sensibilidad en presencia de este fungicida inhibiendo su crecimiento alrededor del 88% a las 120 h. Por otro lado, Douira *et al.*, (2016) evaluaron tres cepas de *T. harzianum* (Tcomp, TH1 y TH3) y una cepa de *T. viride* a las concentraciones 375, 500 750, 1125 pmm de clorotalonil. Registraron que después de la segunda semana a 500 ppm el fungicida mostró buena compatibilidad con Tcomp y TV1 (51,9 y 48,2 %) y todas las cepas probadas excepto TH1 se volvieron moderadamente compatibles (43,5 – 72,2 %) con las diferentes concentraciones después de 24 días. Estos datos coinciden con los de este trabajo, presentando alta compatibilidad en las concentraciones de 0.01,0.05,0.1 y 0.5 mg/ml respectivamente.

El uso combinado de antagonistas como control biológico, junto con productos químicos sintéticos, en la actualidad ha llamado mucho la atención como forma de obtener efectos sinérgicos o aditivos en el control de patógenos del suelo, por ello este tipo de evaluaciones nos permite determinar el comportamiento de las cepas

nativas de este género con la finalidad de buscar estrategias que integren el uso de agentes de biocontrol con los fungicidas más usados en el cultivo de cítricos.

7.4.3 Concentración inhibitoria media (CI₅₀) del fungicida clorotalonil hacia *Trichoderma* spp.

Los ensayos de concentración mínima inhibitoria de las cepas estudiadas para clorotalonil se muestran en la Cuadro 17. En reportes de otros autores se tienen datos diferentes de las CI₅₀ en cepas de *Trichoderma*. Maraschi *et al.* (2019) citan valores altos de CI₅₀ en nueve cepas de *Trichoderma* pertenecientes a la colección del Instituto Biológico de Sao Paulo, Brazil. De acuerdo con la escala de Edington *et al.* (1971) los autores mencionados encontraron que tres especies son resistentes al fungicida clorotalonil: *T. asperelloides* (CI 215), *T. asperellum* (CI 244) y *T. koningiopsis* (CI 215). En contraste, Xufei *et al.* (2023) en su estudio reportan especies moderadamente sensibles al clorotalonil: *T. citrinoviridae* (CI 8.9), *T. guizhouense* (CI 4.9), *T. ganodermatiderum* (CI 3.3) y especies altamente sensibles al clorotalonil: *T. asperellum* (CI 0.5), *T. virens* (CI 0.35), *T. amatum* (CI 0.04), *T. paratroviridae* (CI 0.04), *T. harzianum* (CI 0.008) y *T. koningiopsis* (CI 0.006). Estos últimos datos concuerdan a los que se obtuvieron en el presente estudio.

Cuadro 17 . Concentración inhibitoria media (CI₅₀) del clorotalonil sobre las cepas de *Trichoderma* spp.

Cepa	CI ₅₀	Intervalo confianza
T1	1.66 mg/ml	1.22-2.27 mg/ml
T7	0.69 mg/ml	0.35-0.88 mg/ml
T8	0.49 mg/ml	0.36-0.66 mg/ml

7.5 Identificación morfológica de las especies de *Trichoderma* con mayor capacidad antagónica hacia el fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp.

Las cepas seleccionadas para su identificación a nivel morfológico fueron la T1, T7 y T8. Todas las cepas evaluadas presentaron un crecimiento acelerado cubriendo la caja Petri en su totalidad a las 96 h después de la inoculación en los medios de cultivo PDA y SNA a 25°C, sin embargo, su crecimiento se vio afectado cuando se incubaron a 35°C en ambos medios de cultivo. La cepa T1, fue la única que produjo un pigmento de color amarillo en el reverso de la caja Petri en PDA y ninguna de las tres cepas estudiadas presentaron el aroma a coco. Sobre PDA las colonias fueron ligeramente algodonosas, con anillos concéntricos, los conidióforos y conidios crecieron agregados en diminutas pústulas. En cuando la esporulación sobre SNA fue escasa, formando diminutas pústulas de color verde oscuro.

La cepa T1 (Figura 16). Presentó un crecimiento de 56.2 mm a 25°C en PDA Difco™ y a 35°C no hubo crecimiento. En SNA a 25°C su crecimiento fue de 70.8 mm y a 35°C su crecimiento fue de 1.4 mm.

La colonia presentó una coloración blanca en un principio y a medida que transcurrieron los días se tornó de color amarilla, presentando anillos (2-3) concéntricos y esporulación abundante en PDA. Los conidióforos presentaron una ramificación tipo piramidal con un eje principal conspicuo con ramas laterales cortas, frecuentemente apareadas, ramas laterales más largas con la distancia desde la punta, volviéndose a ramificar y produciendo fiálides directamente hacia la punta. Las fiálides en SNA presentaron forma lageniforme, observándose más cortas e hinchadas cuando están aglomeradas, a menudo muy poco espaciadas formando un pseudoverticilo. Sus medidas fueron 7.72 μm de largo, 2.44 μm de ancho, L/A 3.16 μm . Célula soporte 2.22 μm de ancho; proporción de la longitud de la fiálide a la anchura de la célula de soporte 3.4 μm ; relación entre el ancho de la fiálide y el ancho de la celda de soporte 1.09 μm . Los conidios elipsoidales, 3.18 μm de largo y 2.54 μm de ancho, L/A 1.24 μm , con coloración verde y consistencia lisa. Clamidosporas escasas en medio SNA con 10 días de crecidas y abundantes en

PDA en medios de cultivo con 30 días de crecimiento, globosas, subglobosas, intercalares y terminales. Se observó formación de cristales en cepas cultivadas en PDA con 30 días de crecidas. Las características macroscópicas y microscópicas de esta cepa corresponden a la especie *T. koningiopsis* de acuerdo con las descripciones de Samuels y Hebbar (2015).

La cepa T7 (Figura 17). Presentó un crecimiento a 25°C de 59.6 mm en PDA Difco™ y a 35°C no hubo crecimiento. En SNA a 25°C su crecimiento fue de 58.4 mm y a 35°C su crecimiento fue nulo.

La coloración de la colonia en los primeros días fue hialina y a medida que transcurrieron los días tomo una coloración verde oscuro y amarillento, con anillos concéntricos (3-4) bien definidos en toda la caja Petri. El patrón de ramificación que presentaron los conidióforos fue tipo piramidal con fiálides sostenidas en verticilos divergentes de tres o cuatro surgiendo individualmente cerca de la punta del eje principal, se pudieron observar conidióforos etiolados con ramas muy espaciadas. Las fiálides presentaron forma ampuliforme cuando están muy cerca entre sí y lageniformes cuando están más distantes. Sus medidas fueron 8.55 um de largo, 2.80 um de ancho, L/A 3.05 um. Célula soporte 2.62 um de ancho; proporción de la longitud de la fiálide a la anchura de la célula de soporte 3.25 um; relación entre el ancho de la fiálide y el ancho de la celda de soporte 1.06 um. Los conidios formados en pústulas que se forman alrededor de los anillos concéntricos de 1-2mm de diámetro, algodonosas a compactas, de color verde oscuro. La forma de los conidios fue subglobosa a ovoide, 4.12 um de largo y 3.34 um de ancho, L/A 1.24 um, con coloración verde y consistencia lisa. No se observaron clamidosporas (Figura 17). Las características macroscópicas y microscópicas de esta cepa corresponden a la especie *Trichoderma atroviridae* de acuerdo con las descripciones de Samuels y Hubber (2015).

Finalmente, la cepa T8 (Figura 18). Presentó un crecimiento de 63.4 mm a 25°C en PDA Difco™ y a 35°C no hubo crecimiento. En SNA a 25°C su crecimiento fue de 69.8 mm y a 35°C no hubo crecimiento.

La coloración de la colonia fue blanquecina en los primeros días y a medida que transcurrieron los días presento una coloración verduzca, con anillos concéntricos (2-3) y esporulación abundante en PDA. El patrón de ramificación de los conidióforos fue tipo *Gliocladium*; más o menos discretos, con un pie bien ramificado, cada rama terminando en una cabeza de fiálides. Se observo que los conidióforos produjeron de tres a cuatro ramas fértiles cortas o fiálides solitarias desde la punta. Las fiálides presentaron forma de lageniforme a ampuliforme, con medidas de 8.72 μm de largo, 3.19 μm de ancho, L/A 2.72 μm . Célula soporte 2.66 μm de ancho; proporción de la longitud de la fiálide a la anchura de la célula de soporte 3.2 μm ; relación entre el ancho de la fiálide y el ancho de la celda de soporte 1.19 μm . Los conidios elipsoidales, 5.01 μm de largo y 3.72 μm de ancho, L/A 1.34 μm , con coloración verde y consistencia lisa. Se observaron clamidosporas a los 10 días de crecimiento en SNA con forma subglobosa, terminales e intercalares (Figura 18). Las características macroscópicas y microscópicas de esta cepa corresponden a la especie *Trichoderma pleuroti* de acuerdo con las descripciones de Samuels y Hubber (2015).

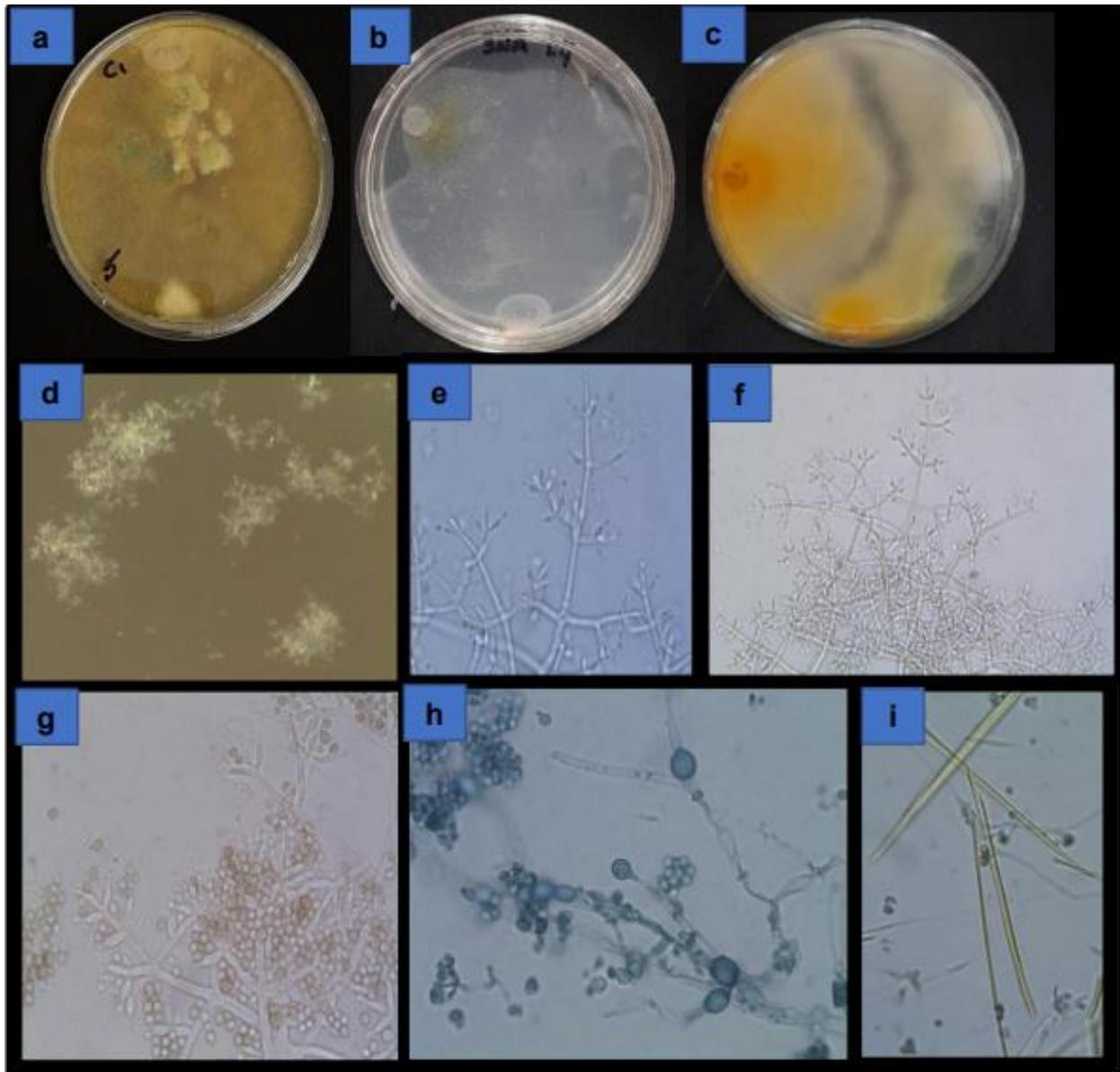


Figura 16. *T. koningiopsis*. **a-** crecimiento en PDA a 25°C, **b-** crecimiento en SNA a 25°C, **c-** pigmentación producida en medio PDA, **d-** pústulas, **e-f** conidióforos, **g-** filíides y conidios, **h-** clamidosporas, **i-** cristales producidos en PDA.

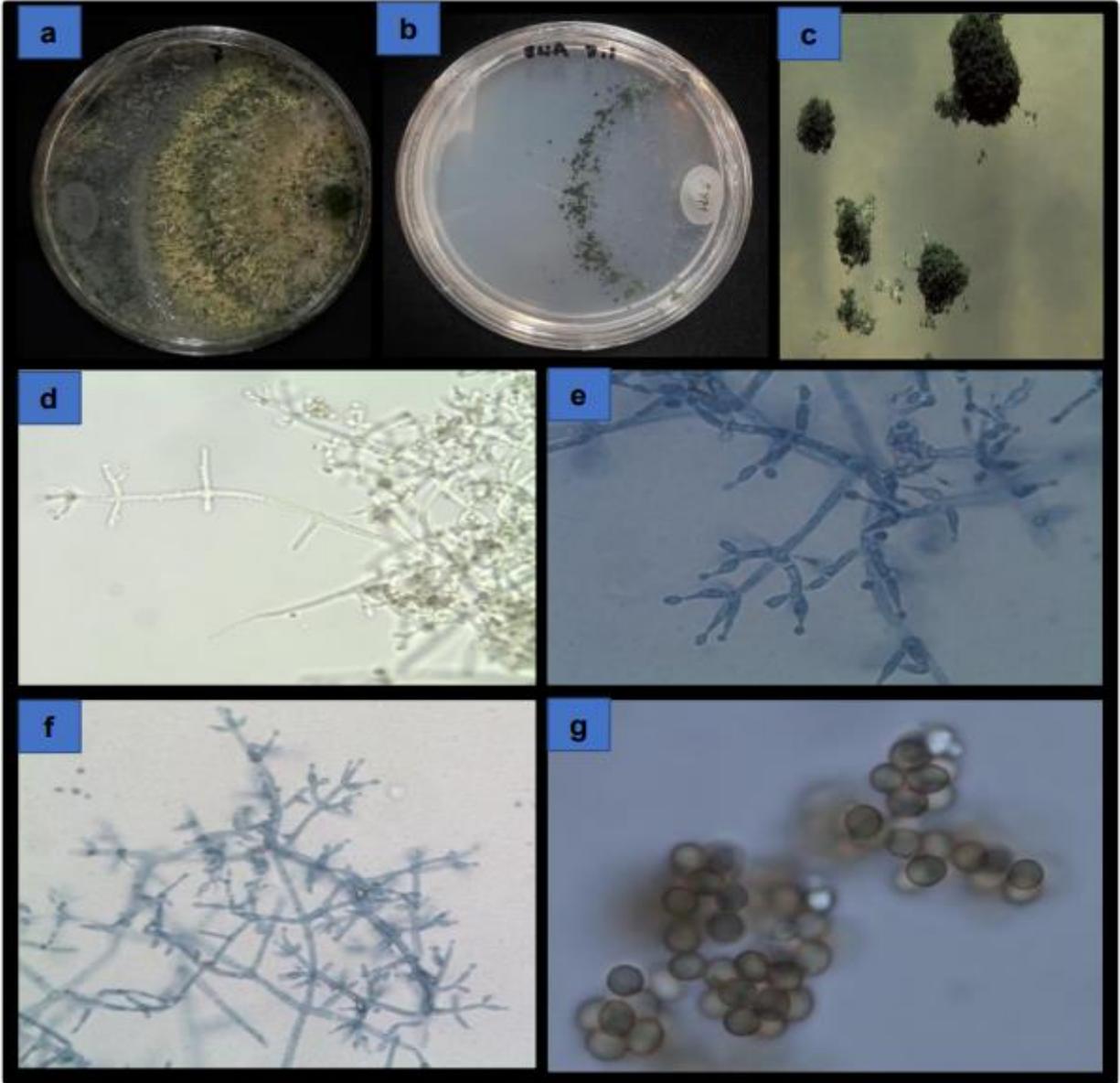


Figura 17. *T. atroviride* **a-** crecimiento en PDA a 25°C, **b-** crecimiento en SNA a 25°C, **c-** pústulas, **d-** conidióforo etiolado, **e-f** conidióforos y fiálides, **g-** conidios.

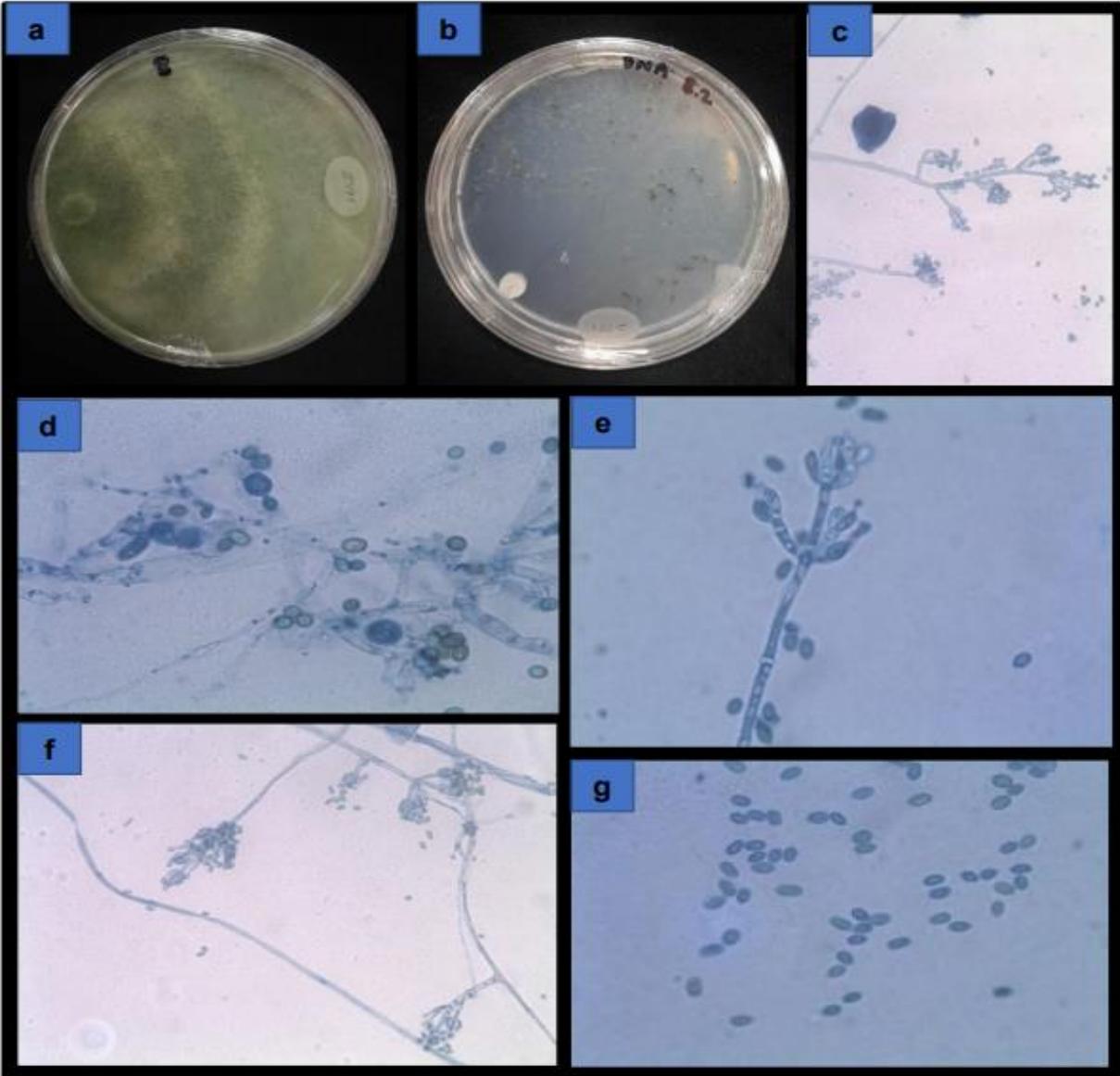


Figura 18. *T. pleuroti*. **a-** crecimiento en PDA a 25°C, **b-** crecimiento en SNA a 25°C, **c-** conidióforos, **d-** clamidosporas, **e-f-** fiálides y conidióforos, **g-** conidios.

Trichoderma es un género que se puede identificar fácilmente por su morfología distintiva, como el rápido crecimiento, pigmentos conidiales con coloración verde brillante o blanco y un conidióforo ramificado (Kubicek y Harman, 2002.). En esta investigación las características observadas para las tres cepas de *Trichoderma* concuerdan con los criterios de identificación de Samuels y Hebbler (2015).

Las características macroscópicas y microscópicas observadas para *T. koningiopsis* fueron similares con las obtenidas por Kumar *et al.*, (2020). En su trabajo reportaron que *T. koningiopsis* presentó en PDA pigmentación amarilla al reverso de la caja Petri y no percibieron algún aroma. La coloración de los conidios fue verde claro con forma elipsoidal y sus medidas de 3.1-3.4x 2.8-3.1 μm . Las características macroscópicas, así como las medidas de las diferentes estructuras están dentro del rango a las obtenidas en este trabajo para esta especie, de la misma forma Samuels *et al.*, (2006) mencionan que las colonias de *T. koningiopsis* cultivadas en SNA en la oscuridad o en la luz durante 96 h producen abundante micelio aéreo, en nuestro trabajo no observamos estas características en SNA, esto se puede deber a que no todas las cepas aun sean la misma especie se comportan de la misma manera, aunado a esto mencionan que en SNA no se difunde pigmento a través del agar y no presentan olor distintivo, estas características macroscópicas coinciden con las observadas en este trabajo. En cuanto a las características microscópicas registraron medidas de las fiálides de 7.2-7.5 μm de largo, 3.1-3.2 μm de ancho, conidios elipsoidales con medidas de 3.9-4 de largo y 2.6-2.7 de ancho μm . Las medidas de las fiálides son muy parecidas a las que obtuvimos, esto significa que estas estructuras pueden presentar más homogeneidad en su tamaño en comparación con los conidios que presentan diversos tamaños influyendo en las medias, sin embargo, entran dentro del rango para esta especie.

En contraste Samuels y Hebbler (2015). Mencionan que *T. atroviride* presenta un aroma similar al coco, en el trabajo realizado no percibimos ningún olor para todos los aislados de la cepa, esto concuerda con Kumar *et al.*, (2020) donde menciona que las cepas no presentaron el olor característico de esta especie.

Esto se debe a que no todas las cepas son capaces de producir dicho aroma (6 - pentil - α - pirona). En cuanto a las características microscópicas registraron que las fiálides presentaron la forma de ampuliforme con medidas de 6.2-11.2x2.4-3.1 μm , forma de los conidios subglobosos con medidas de 2.8-3.1x2.4-3.1 μm , esto concuerda con los criterios de identificación utilizados por Samuels y Hebber (2015).

En cuanto *Trichoderma pleuroti*, es fácilmente reconocible por los conidióforos tipo gliocladium ramificados peniciliadamente, sin embargo, se puede confundir con *T. virens*. Samuels y Hebber (2015) mencionan que una de las características que los diferencia es que *T. pleuroti* no forma clamidosporas en SNA y presenta conidios más pequeños, además a temperatura de 35°C en PDA y SNA su crecimiento puede ser afectado, en comparación con *T. virens* de la misma forma Talavera-Ortiz *et al.*, (2020) documentaron fiálides con medidas de (11.5-)11.9-12.0(-12.2) \times (2.5 -)2.6-2.7(-2.8) μm y conidios en forma elipsoidal con coloración verde y consistencia lisa, lo que coincide con las características que presentó la cepa T8 identificada como *T. pleuroti*.

8. CONCLUSIONES

- Las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizosfera de árboles de limón “Persa” del municipio de Tlaltizapán, Morelos, presentaron capacidad antagónica al inhibir el crecimiento y sobrecrecer a *Lasiodiplodia* sp. *in vitro* en las confrontaciones duales.
- Las cepas de *Trichoderma* presentaron alta sensibilidad hacia el benomilo a todas las concentraciones evaluadas. En cuanto al clorotalonil presentaron menos sensibilidad a las concentraciones más bajas (0.01,0.05,0.1,0.5 mg/ml)
- Las cepas con mayor grado de antagonismo se identificaron como T1- *Trichoderma koningiopsis*, T7- *Trichoderma atroviride* y T8-*Trichoderma pleuroti*.

9. PERSPECTIVAS

Para tener un conocimiento más amplio de las cepas de *Trichoderma* evaluadas será necesario hacer su identificación molecular, así como realizar evaluaciones de antagonismo *in vivo* y realizar más estudios en conjunto con los fungicidas, para determinar su compatibilidad y permitir la propuesta de estrategias para que en un futuro se pueda minimizar los impactos ambientales negativos que ocasionan el uso excesivo de fungicidas.

10. LITERATURA CITADA

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi-Goltapeh, E., Zare, R and Phillips A.J.L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10
- Acosta-Pérez, J. A., Ortiz-García, C. F., Zaldívar-Cruz, J. M., Rodríguez-Cuevas, M., Bautista-Muñoz, C. C. and Castillo-Aguilar, de la C. (2012). Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y ciencia*, 28(3): 245-258. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792012000300004&lng=es&tlng=es
- Adesemoye, A.O., Mayorquin, J.S., Wang, D.H., Twizeyima, M., Lynch, S.C., and Eskalen, A. (2014). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease* 98: 55 – 61
- Agrios, GN. (2005). *Plant Pathology*. 5th ed. San Diego, Elsevier Academic Press.
- Alia -Tejacal, A., Lugo-Alonso, A., Ariza- Flores, R., Alonso -Valdez, L., López-Martínez, V y Pacheco- Hernández, P. (2011) . Manual de tecnología de producción en limón ‘persa’ y naranja ‘valencia’ en el estado de Morelos, folleto técnico, núm. 57.
- Alía-Tejacal, A. R., López-Martínez, I., Juárez-López, V., Martínez-Fernández, P., Hernández-Arenas, E., & Ariza-Flores, M. (2019). Species of *Lasiodiplodia* in lima “Persa” (*Citrus latifolia* Tanaka. *Revista Bio Ciencias*, 6, 595. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.e595>
- Allende-Molar, R., Báez-Parra, K. M., Salazar-Villa, E., & Rojo-Báez, I. (2022). BIODIVERSITY OF Trichoderma SPP.. IN MEXICO AND ITS POTENCIAL USE IN AGRICULTURE. In *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (Vol. 25, Issue 3). Universidad Autonoma de Yucatan. <https://doi.org/10.56369/TSAES.4297>
- Álvarez, L. A. (2015). Eficacia fungicida en el control de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas de palto (*Persea americana*) con el uso del bioestimulante a base de algas Fertimar. *Plagas y Enfermedades*. VIII Congreso Mundial de la Palta 135-140. www.wacperu2015.
- Alves, A., Crous, P., Correia, A., y Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28 (1), 1-13.

- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., y Barrales-Cureño, H.J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Arnold, A.E., MEJÍA, L.C., Kylló, D. E., ROJAS, I., Maynard, Z., Robbins, N and Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15649–15654
- Atlas-Agroalimentario-2020*. (n.d.).
- Badii, M. H. y Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience*. 1(1):82-89.
- Baron, N.C., Rigobelo, E.C., Zied, D.C. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean Journal of Agricultural Research* 79(2): 307-315. [https:// dx.doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307](https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307)
- Bastías J, M. y Cepero, Y. (2016). “La vitamina C como eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos”. *Revista Chilena de Nutrición*. Vol. 43:81-86, <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000100012>.
- Bell, D.K., Well, H.D and Markham, C.R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., & Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6(2), 263–295. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>
- Boland, G.J and Icuycendall, L.D. (1998). *Plant-microbe Interactions and biological control*. New York, Marcel Dekker, 442 p.
- Borroto, N. C. y Borroto de la T, A. (1991). *Citricultura Tropical*. Tomo I y II. Ediciones ENPES. La Habana, Cuba.
- Botella, L., and Diez J. (2011). Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity* 47: 9–18.

- CESVMOR. (2018). Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos. Campaña contra huanglongbing de los cítricos. Primer reporte de enero del 2018. <https://cesvmor.org.mx/informes-mensuales-sanidad-vegetal-2018/>
- CITRUS FRUIT FRESH AND PROCESSED *Statistical bulletin* 2020. (n.d.).
- Colombo, A. (2005) Cultivar los cítricos ornamentales y de fruto. Editorial de Vecchi, S.A.U. pp. 141.
- Cook, R.J and Granados R.R. (1991) .Biological control: making it work. In: MacDonald MJF, editor. Agricultural biotechnology at the crossroads. Ithaca (NY). National Agricultural Biotechnology Council. 213–227
- Cortes, M. (1990). Fruticultura general. Ed. Limusa. México.
- Crous , P.W and Palm, M.E. (1999). Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 52:167-175
- Curti, D.A., Loredó, S.X., Díaz, Z.U., Sandoval, R.J y Hernández, H.J. (2000). Tecnología para producir limón “Persa”. INIFAP-CIRGOC. Campo Experimental Ixtacuaco. Libro Técnico Num. 8. Veracruz, México. 144p.
- Degani, O., & Dor, S. (2021). Trichoderma biological control to protect sensitive maize hybrids against late wilt disease in the field. *Journal of Fungi*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/jof7040315>
- Delgadillo, V.I. (2016). Cancro de los cítricos. *Xanthomonas citri*. SAGARPA-SENASICA. Ficha Técnica No. 33.
- Deng, X., Gao, Y., Chen, J., Pu, X., Kong, W., and Li, H. (2012). Current situation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Guangdong, China, where citrus Huanglongbing was first described. *Journal of Integrative Agriculture* 11: 424-429.
- Díaz, C. (2010). “Naranja dulce, limón partido”. *Revista Claridades Agropecuarias*. Recuperado de <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/197/ca197-32.pdf>
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E., Samuels G.J. (2003) *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* ;**95**(1):27–40. doi: 10.2307/3761959. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P.

- (2011). Trichoderma: The genomics of opportunistic success. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 749–759). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Yadav, M., Samal, S., & Upadhyay, R. S. (2020). Isolation, identification, carbon utilization profile and control of *Pythium graminicola*, the causal agent of chilli damping-off. *Journal of Phytopathology*, 168(2), 88–102. <https://doi.org/10.1111/jph.12872>
- Edgington, L.V., Khew, K.L., Barrow, G.L (1971.) Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 61, p. 42- 44, 1971.
- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. In *Crop Protection* (Vol. 19).
- FAO (2021). Citrus Fruit Statistical Compendium 2020. Rome.
- FAO. (2017) *Faostat. Datos sobre Alimentación y Agricultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- FAOSTAT (2011). Producción. Cultivos. En línea. <http://faostat.fao.org>.
- Flores- Hernández, H., Flores Gracia, J., Varela Fuentes, S.E., Pérez- Rodríguez, A., Azuara Domínguez, A y Monteon-Ojeda, A. (2021). Reporte De *Lasiodiplodia Theobromae* (Pat.) Griffon Y Maubl. En árboles cítricos De Tamaulipas». *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 12 (3). México, ME:499-511. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2640>.
- Flores-Pacheco, J.A. (2017). Antagonismo in vitro de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales. *Revista Científica de FAREM-Estelí. Medio ambiente, tecnología y desarrollo humano*.
- Gan, H and Wickings K. (2017). Soil ecological responses to pestmanagement in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 246: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.014>
- Gao, F.K., Dai, C.C and Liu, X.Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens *Af r. J. Microbiol. Res.*, 4 (13) pp. 1346-1351
- Garcia-Martin, J. F., Olmo, M. and García, J. M. (2018). Effect of ozone treatment on postharvest disease and quality of different citrus varieties at laboratory and

- at industrial facility. *Postharvest Biol. Technol.* 137(3):77-85. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.11.015.
- Halifu, S., Deng, X., Song, R., & Liang, X. (2020). Inhibitory mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. *Plants*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/plants9070912>
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev Microbiol.*;(1):43–56. doi: 10.1038/nrmicro797.
- Hernández, F. L. M., Gómez, J. R., y Agustín, J. A. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. Libro técnico número 1. 87 p.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Howell, C.R. (2003). A case in point is that of *T. virens*–treated root segments taken from soil heavily infested with propagules of *Macrophomina phaseolina*, the pathogen that causes charcoal rot in a wide range of crops *Biological Control of Plant Diseases: the history and* . *Plant Disease* 87: 4–10.
- IPPC. (2017). International Standards for Phytosanitary Measures (ISP.M) 8. Determination of pest status in an area. International Plant Convention (IPPC). En línea:https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/06/ISP.M_08_1998_Es_2_017-04-22_PostCPM12_InkAm.pdf Fecha de consulta: enero de 2022
- Jagraj, C., Vipul, K., Seweta, S., Adesh, K and Vinit, P.S. (2018). In vitro evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causing tomato wilt. *Plant Pathology Journal* 17: 59-64. <https://doi.org/10.3923/ppj.2018.59.64>
- Juhásová, G., Adamčíková, K., and ROBIN, C. (2005). Results of biological control of chestnut blight in Slovakia. *Phytoprotection* 86: 19–23.
- Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S and Khosravi, V. (2012). Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Braz. J. Microbiol.* 297-305.

- Khirallah, W., Mouden, N., Selmaoui, K., Achbani, E.L., Benkirane, R., Ouazzani-Touhami, A., Douira, A. (2016). Compatibility of *Trichoderma* spp.. with some fungicides under in vitro conditions. *International Journal of Recent Scientific Research* 7(2): 9060-9067.
- Kleinstreuer, N. C., Dix, D. J., Houck, K. A., Kavlock, R. J., Knudsen, T. B., Martin, M. T., Paul, K. B., Reif, D. M., Crofton, K. M., Hamilton, K., Hunter, R., Shah, I., & Judson, R. S. (2013). In vitro perturbations of targets in cancer hallmark processes predict rodent chemical carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 131(1), 40–55. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs285>
- Langa-Lomba, N., Martín-Ramos, P., Casanova-Gascón, J., Julián-Lagunas, C., & González-García, V. (2022). Potential of Native *Trichoderma* Strains as Antagonists for the Control of Fungal Wood Pathologies in Young Grapevine Plants. *Agronomy*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy12020336>
- Leon -Ttacca, B., Ortiz -Calcina, N., Condori-Ticono, N y Chura-Yupanqui E. (2018). Cepas de *Trichoderma* con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(1), 19-30. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2018.327>
- Leyva-Mir, S.G., Bautista-Cruz, M.A., Almaguer- Vargas G., Colinas-Leon, M.T. (2021). Efectividad de fungicidas y *Trichoderma* spp. para el control de *Lasiodiplodia* spp.. en huertos de limón “Persa” en Veracruz. [Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas](https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2551) 12(2):345-353DOI:[10.29312/remexca.v12i2.2551](https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2551)
- Liu, Y., Heying, E. and Tanumihardjo, S.A. (2012). History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 530-545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- Lucena, S.A., Osorio, D.U., Chópita, M. E. S y Tamayo, M.J. (2011). Compatibilidad in vitro de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* sacc. y *Sclerotium cepivorum* berk. *Boletín Del Centro de Investigaciones Biológicas*, 45(3), 217–236..
- Lugo Alonso, A., Ariza Flores, R., Alia- Tejacal, A., Ambriz- Cervantes, R y López-Martínez, V. (2009). Manejo agronómico para la producción de naranja ‘valencia’ en el estado de Morelos, INIFAP, México DF.

- Malo, S., Campbell, C., Crane, J., y Balerdi, C. (2015). El limón "Persa" en Florida. Recuperado de Universidad de Florida: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS27300.pdf>
- Marraschi, R., Monteiro-Ferreira, A. B., Silva-Bueno, R. N., Leite . A., Montovanello-Lucon, C. A., Harakava, L., Garrigós-Leite, L., Padovani, C. A., Bueno, C. L. 2019. A protocol for selection of *Trichoderma* spp.. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. Brazilian Journal of Microbiology 50: 213-221.
- Maryori, P.-Z. C., & Hebandreyna, G.-G. (2020). *Artículo de investigación Ciencia y Tecnología Agropecuaria (ISSN: 1900-0863)* (Vol. 5, Issue 2).
- McBride, S., French, R., Schuster, G. y Ong, K. (2010). Guía de enfermedades de los cítricos. AgriLife Extension. Texas A&M System. pp. 12
- Medina -Tiznado, M.A., Luna- Esquivel, G., Cambero Campos, O.J., Ramírez Guerrero, L.G., y Rios-Velsaco, C (2018). *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la pudrición blanda de frutos de *Artocarpus heterophyllus lam.* en Nayarit, México. Revista Brasileira de Fruticultura. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/0100-29452018018>
- Mesa- Vanegas, A. M., Marín Pavas, D. A., y Calle- Osorno, J. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1–13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Michel-Aceves, A. C., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, M. E., Mesina-Escamilla, J. C., y Samuels, G. J. (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(2),154-160. [fecha de Consulta 14 de Noviembre de 2022]. ISSN: . Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219204>
- Michel-Aceves, A.C., Hernández-Morales, J., Toledo-Aguilar, R., López, J.E.S y Romero-Rosales, T. (2019). Capacidad antagonica de *Trichoderma* spp., nativa contra *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de Jamaica. Revista Fitotecnia Mexicana 42(3): 235-241. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.235-241>

- Michel-Aceves, A.C., Otero- Sánchez, M.A., Rebolledo-Dominguez, O., Lezama-Rodriguez, R., Ariza-Flores, R., Barrios- Ayala, A. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *F. subglutinans* y *F. oxysporum* in vitro. R. C. S. H. 11:273–278. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60911213.pdf>. (2005). *REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA* (Vol. 11, Issue 2). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60911213>
- Montesino, M., López, H., Hernández, J., de Zayas, E. (2009). Insecticidas botánicos como alternativas para el manejo de plagas en sistemas agroforestales. *Agricultura orgánica* pp.24-26.
- Morán-Diez, M. E., Martínez de Alba, Á. E., Rubio, M. B., Hermosa, R., y Monte, E. (2021). *Trichoderma* and the plant heritable priming responses. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof7040318>
- Mullen, J. M., Gilliam, C. H., Hagan, A. K. and Morgan, J. G. (1991). Cancer of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant Disease*. 75:886-889.
- Muñoz, P., García-Estrada, R., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. y Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(1): 54-74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687004>
- Naqvi, S. A. H.; Latif, M. R.; Khan, S. A.; Malik, M. T. and Freed, S. 2015. Emerging resistance against different fungicides in *Lasiodiplodia theobromae*, the cause of mango dieback in Pakistan. *Serbian Archives Biol. Sci.* 67(1):241-249. <https://doi.org/10.2298/ABS140904030R>. [[Links](#)]
- Narayanasamy, P. (2013). *Biological Management of Diseases of Crops: Vol. 1: Characteristics of Biological Control Agents*. India: Springer Science y Business Media.
- Nath, V. S., John, N. S., Anjanadevi, I. P., Hegde, V. M., Jeeva, M. L., Misra, R. S., & Veena, S. S. (2014). Characterization of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Phytophthora colocasiae* associated with leaf blight of taro. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1513–1522. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0794-7>
- Nieblas, N. (2012). Evaluación del potencial de *Trichoderma* sp. y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los agentes

causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Tesis de posgrado. pp.1-2. Ensenada, Baja California, México.

Orozco, S.M., Robles, G.M., Velázquez, M.J.J., Manzanilla, R.M.A., Hernández, F.L.M., Manzo, S.G. y Nieto, A.D. (2013). Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en limón mexicano y limón "Persa". Memorias IX Simposio Internacional Citrícola pp. 113-171

Perez- Parcia, B. (2002). EcuRed. Obtenido de Morfología vegetal: https://www.ecured.cu/Morfolog%C3%ADa_vegetal

Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Micology*. 76:51-167. Doi:10.3114/sim0021..

Picos-Muñoz, P.A., García-Estrada, R.S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A y Allende Molar R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1),54-74. [fecha de Consulta 10 de Octubre de 2021]. ISSN:. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687004>

Ploetz, R.C. (2003). *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp 76-77.

Polanco- Florián, L.G., Alvarado -Gómez, O.G., Pérez -González, O., González Garza, R y Olivares-Sáenz, E. (2019). Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 757-764. Disponible en: <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>

Ragsdale, N y Sisler, H. (1994). Implicaciones sociales y políticas del manejo de enfermedades de las plantas con una menor disponibilidad de fungicidas en los Estados Unidos. *Rev. Fitopatol*, 32 , 545–557. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Ramón-Hidalgo e Ider Moran-Caicedo, A (2020): "Trichoderma: hongo fungicida usado en tratamientos foliares del suelo y el control de diversas enfermedades producidas por hongos", *Revista Caribeña de Ciencias Sociales* (abril 2020). En línea: <https://www.eumed.net/rev/caribe/2020/04/trichoderma-hongo-fungicida.html> <http://hdl.handle.net/20.500.11763/caribe2004trichoderma-hongo-fungicida>

- Reyes, Y., Infante, D., García-Borrego, J., Pozo, E del., Crua, A., y Martínez, B. (2012). Compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz (en línea). *Revista de Protección Vegetal*. 27(1): 45-53.
- Reza-Asef, M., Mohammadi- Goltapeh, E., Razaeei-Danesh, Y. (2008). Antagonistic effects of *Trichoderma* species in biocontrol of *Armillaria mellea* in fruit trees in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 48(2):213-222.
- Rivera-Méndez, W., Obregón, M., Morán-Diez, M. E., Hermosa, R., and Monte, E. (2020). *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104145>
- Rodríguez, G. E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W. and Alves, A. (2016). Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*. 121:1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>.
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E and Redman, R. (2009). Fungal endophytes: Diversity and ecological roles *New Phytol.*, 182, pp. 314-330.
- Roiger, D.J., Jeffers, S.N. and Caldwell, R.W. (1991). Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 23:353-359
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P.A, Ramírez-Lepe. M., Cuervo-Parra, J.A. (2015). Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal Agricultural Animal Sciences* 31(3): 32-45. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000100004>
- Russel, P.E. (2004). Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Cambridge.
- Saba, H., Vibhash, M., Manisha, K.S., Prashant., Farhan, H and Tauseef, A. (2012). *Trichoderma*- a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* 3: 524-531.
- Sáenz-Pérez, C., Hernández, A., Osorio, Estrada- Drouaillet, B., Poot., W.A, Delgado- Martínez, R., & Herrera,-Rodríguez, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(7), 1653-

1665. Epub 04 de diciembre de 2020.<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>

- Sáenz-Pérez, C.A., Hernández- Osorio, E., Benigno- Estrada, D., Poot, W. A., Delgado- Martínez, R y Rodríguez- Herrera, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(7), 1653-1665. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>
- Saito, S and Suzuki, S. (2009). "Fungicide Resistant Profiles of *Botrytis cinerea* in a Vineyard," *J. Asev Jpn*, vol. 20, no. 1, pp. 8–14.
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E and Nirenberg, H. I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 51: 71-88
- Samuels, G.J. and Hebbbar, P.K., (2015). *Trichoderma*: Identification and agricultural applications. St. Paul, Minnesota. APS Press: The American Phytopathological Society.
- Sánchez- Carrillo, R., y Guerra-Ramírez, P. (2022). *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(4), 715-725. Epub 22 de agosto de 2022.<https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2799>
- Sánchez, R., y Guerra, P. (n.d.). *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2799>
- 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
- Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, K.M., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C. Y Macías-Rubalcava, M.L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2). pp.132-146.
- Sandoval, S. M., Nieto, A. D., Sandoval, I. S., Téliz, O. D., Orozco, S. M. y Silva, R. H. V. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia*. 47:61-73
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., Hermosa, R., & Monte, E. (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma*

biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics*, 46(5), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0532-6>

SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP). (2020). Panorama Agroalimentario 2020. En línea www.gob.mx/SIAP

Shahbaz, M.; Iqbal, Z.; Saleem, A. and Anjum, M. A. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). Pakistan. Pak. J. Bot. 41(1):359-368. <http://www.pakbs.org/pjbot/>. [Links]

Sharma, V., Salwan, R and Sharma, P.N. (2017). The comparative mechanistic aspects of *Trichoderma* and probiotics: scope for future research. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100:84-96.

Showler, A. T. (2017). Suppression of greasy spot disease caused by *Mycosphaerella citri* Whiteside on grapefruit trees in an organic orchard using an aqueous organic mixture of composted cornmeal, humic acid, molasses, and fish oil versus vegetable oil. *Crop Protection*. 99(9):137-143. doi:10.1016/j.cropro.2017.05.016.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms *J. Nat. Prod.*,67, pp. 257-268

Talavera-Ortiz, A., Chaverri, P., Díaz-Godínez, G., Acosta-Urdapilleta, Ma. de L., Villegas, E., y Téllez-Téllez, M. (2020). Mycelial inhibition of *Trichoderma* spp. (Hypocreaceae) isolated from the cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) with an extract of *Pycnoporus* sp. (Polyporaceae). *Acta botánica mexicana*, (127), e1537. Epub 30 de mayo de 2020. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1537>

Tanzini, M.R., Setten, A., y Augusto, N.T. (2001). Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, (59), 15–18.

Tapwal, A., Kumar, R., Gautam, N., y Pandey, S. (2012). Compatibility of *Trichoderma viride* for Selected Fungicides and Botanicals. <https://doi.org/10.3923/ijpp.2012.89.94>

Tilman, D., Cassman, K., Matson, P., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Sostenibilidad agrícola y prácticas de producción intensiva. *Nature*. 418:671-677

- Timmer, L.W., Agostini, J.P., Zitko, S. E. and Sulfiqar, M. (1994). Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease*. 78: 329-333.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, P.N., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J.A., Ávalos-Contreras, N y Cappello-García, S. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:947-961.
- Tovar, P. J. M., Mora, A. J. A., Nava, D. C., Téliz, O. D., Villegas, M. A and Leyva, M. S. G. (2013). Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stern] grafts in Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:233-238. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61028975007>.
- Trakunyingcharoen, L., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., To-anum, C. and Crous, P. W. (2015). *Caulicolus Botryosphaerales* from Thailand. *Persoonia*. 34:87-99. <http://dx.doi.org/10.3767/003158515X685841>.
- Ulloa-Ogaz, A.L., Muñoz-Castellanos, L.N y Nevárez-Moorillón, G.V. (2015). Biocontrol of phyto patho - gens: Antibiotic production as mechanism of control. En: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (Ed. Méndez-Vilas A), pp. 305-309. Formatex, Badajoz, España
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J and Gubler, W.D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92:519-529.
- Valle-de la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Gijón-Hernández, A.R., Alía-Tejacal, I. , López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández-Arenas, M and Ariza-Flores, R. (2019). Especies of *Lasiodiplodia* in lima “Persa” (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. *Revista Bio Ciencias* 6, e595. doi: <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.e595>
- Vásquez-López, A., Mora-Aguilera, J. A., Cárdenas-Soriano, E y Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia*, 43(7), 717-728. Recuperado en 15 de enero de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000700006&lng=es&tlng=es.

- Ventura, J.A, Costa, H and Tatagiba, J. (2004). Papaya diseases and integrated control. p. 201-268. In: Naqvi SAMH (ed.). Diseases of Fruits and Vegetables: Diagnosis and Management. Volume II. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, United States of America. 704 p
- Verma, M., Brar, S. K., Tyag, R.D., Surampalli, R.Y y Valero, J.R. (2007). Review: Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.
- Vinale, F.K., Sivasithamparam, E.L., Ghisalberti, R., Marra, S.L., and Lento, M. (2008) *Trichoderma* plant pathogens interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40:1-10.
- Wang, F., Zhao,L., Li, G., Huang, J and Hsiang, T.(2011). Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. *Plant Disease* 95:1378-1384
- Xuefei, L., Sossah, F. L., Tuo, Y., Hu, J., Wei, Q., Li, S., Rong, N., Wiafe-Kwagyan, M., LI, C., Zhang, B. Li, X., Li, Y. 2023. Characterization and fungicide sensitivity of *Trichoderma* species causing green mold of *Ganoderma sichuanense* in China. *Frontiers in Microbiology* 14: 1-15
- Zadocks, J.C and Schein R. (1979). *Epidemiology and plant disease management*. New York: Oxford University Press, pp 427.
- Zhou, C., Guo, R., Ji, S., Fan, H., Wang, J., Wang, Y., y Liu, Z. (2020). Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. *Microbiological Research*, 231. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126371>



Jefatura de Programas de Estudios de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 24 de noviembre de 2023

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

Mtro. Jesús Eduardo Licea Resendiz
Titular de la Dirección de la Facultad
de Ciencias Agropecuarias, UAEM
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSANTE DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN "PERSA" (*Citrus latifolia*)** que presenta la **Biol. Azucena Lucena Cuevas**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Edgar Martínez Fernández
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 7046. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2023-12-06 10:48:00 | Firmante

AMfzeakFRyXVwXabXQYxTLsyeQw0+vFGfB7AizbdM+PU9DmAXZBZKrYEtlQDXZ86DwziOkTzh03DnW00xFHWTf1IDR6MgxaOZzXO+U9bZvOjUo8oxTuyJTC0GdBmXnCSoW
hIBnr3SyWF/QSO+ov1wjI8uuIOR6IQBsvzXgOO/tzQ6q9II6NbtGpFFVDSYWORPS/yi6xbzX62aZ3FTXUI+YTiNaKOnpotMGV0t25MWQDcZTh9AzKAHcOO+Vad/xfrSMEOR05LI
MZhoKoBHaq+2j5ijT0XuuatHGVOq3hgXq5I42W9Idihww4IZ28qrkqP/7ALU0MAoOoPI6WcboA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



9S1mYC8r5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/q43Ax63aStedc4q5UvMIHNqPYdRJ1eSy>





Jefatura de Programas de Estudios de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 24 de noviembre de 2023
Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

Mtro. Jesús Eduardo Licea Resendiz
Titular de la Dirección de la Facultad
de Ciencias Agropecuarias, UAEM
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSANTE DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN "PERSA" (*Citrus latifolia*)** que presenta la **Biol. Azucena Lucena Cuevas**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Antonio Castillo Gutiérrez
Comité Evaluado

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 7046. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANTONIO CASTILLO GUTIERREZ | Fecha:2024-02-08 01:34:22 | Firmante

nzhFxmXtGwSi/LRdRkSg2d6Ees30IHPPDzqHyIIUO1oq9EKxGbFAlqeOkUIUSNagV+01otFKEnhvHFeR4yN0t/F26EuD3ZD2h20UgFXf0a4sau0mfDGPkBxnfYCu5FdFD9OFH6Q2A9lyr4GxTRcy89w6i0ixsjATM8ygp1mb9FbVPqdSx4IZDC/MVvX3NPg5ZTyTbGIwb7Uo36hHNCqHIBT3YOUP4POq5QykjryDjZCBejTaNJRtv7sa0sUKX8cwwy5CwHxQJlHolxk mK5Uppyjzlc6y/G2iPLJcjlQZyccLkKhtYPukb7zypkf98EpgCQOZHs6cUXGWNc0zxrvd0KQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SekM0rWU3](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/f9d2k650INUj0VY1jIwcfE2Y19Bfz93X>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Jefatura de Programas de Estudios de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 24 de noviembre de 2023

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

Mtro. Jesús Eduardo Licea Resendiz
Titular de la Dirección de la Facultad
de Ciencias Agropecuarias, UAEM
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSANTE DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN "PERSA" (*Citrus latifolia*)** que presenta la **Biol. Azucena Lucena Cuevas**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **Dr. Edgar Martínez Fernández**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres
Comité Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES | Fecha:2023-12-11 11:22:08 | Firmante

HmuTsf/mDxtYKV4HnwC69i89HmYt9yG6sUQC4yEg8kykaziDNyulDdZXzylzRG35h5JDCrLxecQVHho7/lwuyznuelXwqBbwdbss/E/cGbcL+Ww3PY0qqFsKWfNL0VMiHAACHx+s
iMmxekZ+w5LkaKwo1k7VCgfp1btIhnauNCn0B2EbnZpcjkT+ZzmHEGbmURfZiCOVSKIQWfG690Dqo7dA4Sfli7K/ioR1Ce/LtNjXLgM/Jnr9JFI/Xmx3hLQyLwdc8m31GZesPTjtAYlz
0xqtd6dADRZHZYqkWd3JBI7zQVL+K4JnptPzUNG+flke76XAN0Ba+nO6g8aidT/22Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[YWqpJ5T2x](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a1HzpupEFjJKDqpbI7G9uTpBwoqmRvwN>



Jefatura de Programas de Estudios de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 24 de noviembre de 2023

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

Mtro. Jesús Eduardo Licea Resendiz
Titular de la Dirección de la Facultad
de Ciencias Agropecuarias, UAEM
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSANTE DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN "PERSA" (*Citrus latifolia*)** que presenta la **Biol. Azucena Lucena Cuevas**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **Dr. Edgar Martínez Fernández**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Guadalupe Peña Chora
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 7046. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-12-04 07:08:57 | Firmante

CB6Wgpwnl0TqJ6mr8V1ZJTe7mfl67/dFTfWFwPRWDRqqoHvjiTT91Zo/f4mOHZ3nlfphuuaaijTlpNk6e3vOJBWWcasaAAJhNZg2NnXzysKmKrUS6FS77RhcomlHZo2LbHWMCzy+f
gAiycxh9RM1XNZRtO+3otzkrdgjEW9b4KnS4C8GBiXkNHX/+lx9eHQRiPUcEmWYRy/+de4n0VZbOdB0AvOB4GDxiQy0qldaPL4kDPCsOOyzlpJjggIPv4ET5gWOT4nXllwOjQnr
mNAGnOSMegjQw8htW0f9Yrr5ksQall4pZKIBfkFnaTVtjlwpieOM5SBZfunXer+yTtHCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[6maqLfnDd](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1qcoc2iRZQziYxMI5GLVI7uYMVEiKKNQF>





Jefatura de Programas de Estudios de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 24 de noviembre de 2023

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

Mtro. Jesús Eduardo Licea Resendiz
Titular de la Dirección de la Facultad
de Ciencias Agropecuarias, UAEM
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **ESPECIES DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS A *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSANTE DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN "PERSA" (*Citrus latifolia*)** que presenta la **Biol. Azucena Lucena Cuevas**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **Dr. Edgar Martínez Fernández**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. María Claudia Rueda Barrientos
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 7046. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA CLAUDIA RUEDA BARRIENTOS | Fecha:2023-12-04 19:29:50 | Firmante

SNF9qJSq5o5A24maFFye7q9eSlnCOVFoCJ/BywdhLRPZZbru1SWFHj1/jo7Uaf5YYsmwe4Y8jVe3di0p7FLFVtUGujcS2GZ8hqQMU1fPVa11Hu/sF5327gCF0VAJjhTjXmOW/ml/cal1dRal30pU2f3zPrqxTeOaw1n3S69AzhMLuvSzCbZaelgd7ZXEphb6EtqM1adyLbvnFsecW67OAVkCx/en+RnkVAXqhBcrmsSQcfoAUtZtYjelnnIXd5pjWOZAUDFdR2lw6/54/ieDo93Ztcc+vd5CxhmfBt8E6XptFgbdA1OBg9Ca/NRWWIIFOjj0pulbwZNshA1LbZIQRUA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[L8frzCwcZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/u6ZHkASRIyJfKAitObkNqKSIoa6fdeB>

