

Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings

Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco

Leydi Miguel-Ferrer, Omar Romero-Arenas*, Petra Andrade-Hoyos, Primo Sánchez-Morales, Centro de Agroecología, José Antonio Rivera-Tapia, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias (ICUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); Edificio VAL 1, Km 1,7 carretera a San Baltazar Tetela, San Pedro Zacachimalpa, C.P. 72960, Puebla, México; Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Laboratorio de Patología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5, Tarímbaro, Michoacán. C.P. 58880. *Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Recibido: 25 de Enero, 2021.

Aceptado: 18 de Marzo, 2021.

Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA and Fernández-Pavía SP. 2021. Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. Mexican Journal of Phytopathology 39(2).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>

Primera publicación DOI: 13 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 13, 2021.

Resumen. El chile es la segunda hortaliza de mayor producción en México. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antagónica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma harzianum* (T-H4)

Abstract. Chili is the second largest vegetable in Mexico. The objective of the investigation was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* (T-H4) and *T. koningiopsis* (T-K11) versus *Fusarium solani* (MX-MIC 798) in the germination and establishment of seedling of chili Miahuateco. The dual culture technique was used to determine the percentage of radial growth inhibition (PRGI) of the MX-MIC 798 strain. In addition, the germination percentage in Miahuateco chili seeds was analyzed in nursery, as well as the mortality of seedlings and degree of severity at 40 days after transplantation (dat) in Santa María Tecomavaca, Oaxaca, through biocontrol and chemical control (Mancozeb 80®). The T-H4 strain presented the highest PIRG antagonistic level (53.3%) *in vitro* and class II on

y *T. koningiopsis* (T-K11) versus *Fusarium solani* (MX-MIC 798) en la germinación y establecimiento de plántula de chile Miahuateco. Se utilizó la técnica de cultivo dual para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de la cepa MX-MIC 798. Además, se analizó el porcentaje de germinación en semillas de chile Miahuateco en vivero, así como la mortalidad de plántulas y grado de severidad a los 40 días después del trasplante (ddt) en Santa María Tecomavaca, Oaxaca, a través de biocontrol y control químico (Mancozeb 80®). La cepa T-H4 presentó el nivel antagónico PICR más alto (53.3%) *in vitro* y clase II en la escala de Bell, asimismo obtuvo 82% de germinación en semillas de chile Miahuateco en vivero y 48% de mortalidad en campo; de manera que igualó al control químico y superó a *T. koningiopsis* T-K11. La actividad antifúngica de *Trichoderma* spp., ofrecen una alternativa para el biocontrol de la marchitez y necrosis en raíz del cultivo de chile Miahuateco causada por *F. solani* MX-MIC 798.

Palabras clave: Antagonismo, crecimiento micelial, PICR, mortalidad, *Capsicum*.

La diversidad genética de los diferentes tipos de chiles en México es poco estudiada, encontrando que gran variedad de estos son nativos, como los denominados Poblanos (Toledo-Aguilar *et al.*, 2016). En el año 2018, el chile Poblano (*Capsicum annuum*) presentó un área de siembra de aproximadamente 17,729.80 ha, con una producción de 391,133.26 t dejando una derrama económica de \$ 3'038,997.37 millones de pesos (SIAP, 2020). El chile poblano tiene gran importancia gastronómica, económica y social por ser un ingrediente básico de platillos tradicionales e influencia culinaria de otros alimentos en el mundo, representando uno de los ejes de desarrollo o aglutinadores de empleo

Bell's scale, also obtained 82% germination in Miahuateco chili seeds in nursery and 48% of field mortality; So, he matched chemical control and beat *T. koningiopsis* T-K11. The antifungal activity of *Trichoderma* spp., They offer an alternative for the biocontrol of the wilt and necrosis as a root in the cultivation of Miahuateco chili caused by *F. solani* MX-MIC 798.

Key words: Antagonism, mycelial growth, PRGI, mortality, *Capsicum*.

The genetic diversity of the different types of chilies in Mexico has been scarcely studied, and a large variety have been found to be native, such as the Poblanos (Toledo-Aguilar *et al.*, 2016). In the year 2018, the Poblano chili (*Capsicum annuum*) was found to have been planted in an area of approximately 17,729.80 ha, with a production of 391,133.26 t and an income of \$ 3'038,997.37 pesos (SIAP, 2020). The Poblano chili has great gastronomic, economic and social importance, since it is a basic ingredient of traditional dishes and has a culinary influence on other foods worldwide, being one of the cornerstones of development or providers of jobs and income in the areas (Rodríguez *et al.*, 2007; Pérez-Carrasco *et al.*, 2017).

In the town of Santa María Tecomavaca, in the state of Oaxaca, Mexico, the Miahuateco chili is grown, which is a variety of Poblano chili and the current production in the region is jeopardized by the presence of fungal diseases. The genus *Capsicum* presents a higher fungal incidence in the seedling stage. These diseases are caused by pathogens such as *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* spp., which lead to the loss of over one third of the production of the crop. The main symptom is the premature death of the plants, since it causes the

e ingreso en las regiones (Rodríguez *et al.*, 2007; Pérez-Carrasco *et al.*, 2017).

En la comunidad de Santa María Tecomavaca, en el estado de Oaxaca, México, se cultiva el chile Miahuateco, que es una variedad de chile Poblano y actualmente la producción en la región se ve comprometida por la presencia de enfermedades fungosas. El género *Capsicum* presenta mayor incidencia fungosa en la etapa de plántula, estas enfermedades son causadas por patógenos como *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* spp., que provocan la pérdida de más de un tercio de la producción del cultivo. El principal síntoma es la muerte prematura de las plantas, al causar la obstrucción y desequilibrio del funcionamiento de los haces vasculares, además de presentar defoliación, cambios de color, rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, maduración adelantada e irregular pudrición de la raíz y necrosis en el tallo (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Guenoun *et al.*, 2019). *Fusarium oxysporum* y *F. solani* se han aislado de la pudrición de la corona y la base del tallo de plantas maduras de chile Poblano en vivero, además *F. solani* es el agente causal de marchitez y necrosis en raíz y tallo de chile Chilaca en Queréndaro, Michoacán, México (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Reyes-Tena *et al.*, 2019).

Los productos de síntesis química se han empleado por décadas para el control de estas enfermedades (Gan y Wickings, 2017). Sin embargo, su uso está relacionado con la generación de resistencia en fitopatógenos, daños al ambiente y salud humana (Chen *et al.*, 2014; Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Ante esta situación, el control biológico se considera una práctica eficiente y ecológicamente viable para el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* contiene a las especies antagonistas más relevantes para el biocontrol de hongos fitopatógenos, utilizado principalmente

obstruction and imbalance in the functioning of the vascular bundles, defoliation, color changes, curling of the foliage, damage to reproductive structures, early maturation and irregular rot of the root and necrosis in the stem (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Guenoun *et al.*, 2019). *Fusarium oxysporum* and *F. solani* have been isolated from the rot of the crown and the base of the stem of mature Poblano chili plants in nursery. In addition, *F. solani* is the causal agent of wilting and necrosis in the root and stem of the Chilaca chili in Queréndaro, Michoacán, Mexico (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Reyes-Tena *et al.*, 2019).

The products of chemical synthesis have been used for decades to control these diseases (Gan and Wickings, 2017). However, their use is related to the generation of resistance in phytopathogens, damages to the environment and to human health (Chen *et al.*, 2014; Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). In the light of this situation, biological control is considered an efficient practice and environmentally feasible for the development of sustainable agriculture (Pérez-Torres *et al.*, 2018). The genus *Trichoderma* contains the most relevant antagonistic species for the biocontrol of phytopathogenic fungi, used mainly by organic farmers and in good agricultural practices for the management of diseases and as a compost enhancer (Romero-Arenas *et al.*, 2017; Launio *et al.*, 2020). Its use and success in agriculture is due to action mechanisms such as competition for space, mycoparasitism, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018) and the production of volatile compounds (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). In previous investigations, *T. harzianum* T-H4 presented a higher percentage of inhibition (78.3%) against *Phytophthora cinnamomi* than *T. koningiopsis* T-K11 *in vitro* (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). Likewise, the strain T-H4 presented 63.6% of PICR and class III of the Bell scale against *Fusarium* sp.

por productores orgánicos y de buenas prácticas agrícolas para el manejo de enfermedades y potenciador de compost (Romero-Arenas *et al.*, 2017; Launio *et al.*, 2020). El éxito y uso en la práctica agrícola, se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio, micoparasitismo, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018) y la producción de compuestos volátiles (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). En trabajos previos, *T. harzianum* T-H4 presentó el mayor porcentaje de inhibición (78.3%) contra *Phytophthora cinnamomi* que *T. koningiopsis* T-K11 *in vitro* (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). Así mismo la cepa T-H4 presentó 63.6% de PICR y clase III de la escala de Bell contra *Fusarium* sp. (Morales *et al.*, 2020). En consecuencia, el objetivo de este trabajo de investigación fue: Evaluar la actividad antagonica de dos cepas de *Trichoderma* (T-H4 y T-K11), *versus* *F. solani* MX-MIC 798 en la germinación de semilla y vigor de plántulas de chile Miahuateco para la comunidad de Santa María Tecomavaca, Oaxaca, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antagonismo de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* ante *F. solani* en cultivos duales. La evaluación del antagonismo se realizó con las cepas T-H4 de *T. harzianum* y T-K11 de *T. koningiopsis*, ambas aisladas de la raíz de *Persea americana*, cuyas secuencias se encuentran en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MK779064.1 y MK791648.1, respectivamente. Así mismo, se utilizó la cepa MX-MIC 798 de *F. solani* con número de acceso MK532475, la cual fue donada por el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana. Todo el material biológico está resguardado en el laboratorio 204 del Eco-Campus

(Morales *et al.*, 2020). Consequently, the aim of this investigation was to evaluate the antagonistic activity of two strains of *Trichoderma* (T-H4 and T-K11), *versus* *F. solani* MX-MIC 798 in the germination of seeds and vigor of Miahuateco chili seedlings for the town of Santa María Tecomavaca, Oaxaca, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Antagonism of *T. harzianum* and *T. koningiopsis* against *F. solani* in dual cultures. The evaluation of the antagonism was carried out with strains T-H4 of *T. harzianum* and T-K11 of *T. koningiopsis*, both isolated from the root of *Persea americana*, the sequences of which are found in the National Center for Biological Information (NCBI) data base, with accession numbers MK779064.1 and MK791648.1, respectively. Likewise, *F. solani* strain MX-MIC 798, with accession number MK532475 was used, which was donated by the Plant Pathology Laboratory of the Agricultural and Forestry Research Institute of the Universidad Michoacana. All the biological material is stored in laboratory 204 of the Eco-Campus Valsequillo of the Institute of Science of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

For the evaluation of mycelial growth, fragments of *F. solani* (MX-MIC 798), *T. harzianum* (T-H4) and *T. koningiopsis* (T-K11), 5 mm in diameter, were planted in Petri dishes with PDA (Potato Dextrose Agar), each in triplicate and incubated in the dark at 28 °C for 10 days. The mycelial diameter was measured every 12 h to estimate the growth speed (cm), which was calculated with the function of linear growth $y=mx + b$ (where 'y' is distance, 'x' is time and 'b' is the constant factor) and it was expressed in centimeters per day (cm d^{-1}) (Zeravakis *et al.*, 2001). The diameter of the

Valsequillo del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Para la evaluación del desarrollo micelial, se sembraron fragmentos de 5 mm de diámetro de *F. solani* (MX-MIC 798), *T. harzianum* (T-H4) y *T. koningiopsis* (T-K11) en cajas Petri con PDA (Agar de Papa y Dextrosa), cada uno por triplicado y se incubaron en condiciones de oscuridad a 28 °C por 10 días. Se midió el diámetro micelial cada 12 h para estimar la velocidad de crecimiento (cm), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal $y=mx + b$ (donde 'y' es la distancia, 'x' es el tiempo y 'b' el factor constante) y se expresó en centímetros por día (cm d^{-1}) (Zeravakis *et al.*, 2001). El diámetro del crecimiento micelial se determinó con un vernier digital (CD-6 Mitutoyo) tomando la misma dirección por triplicado.

La técnica de cultivo dual se utilizó de acuerdo con Andrade-Hoyos *et al.* (2019) por triplicado para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) para cada ensayo evaluado, por un lapso de 10 días con la fórmula $\text{PICR} = [(R1 - R2/R1) \times 100]$. Donde R1 es el diámetro del testigo (promedio del crecimiento radial de los triplicados de cada cepa) y R2: es el diámetro del organismo ensayado. Para complementar las evidencias del antagonismo, se comparó y clasificó cada ensayo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982) (Cuadro 1).

mycelial growth was determined with a digital caliper (CD-6 Mitutoyo) taking the same direction in triplicate.

The dual culture technique was used following Andrade-Hoyos *et al.* (2019) in triplicate to determine the percentage of inhibition of radial growth (PICR) for each trial evaluated, for 10 days using the formula $\text{PICR} = [(R1 - R2/R1) \times 100]$, where R1 is the diameter of the control (average of the radial growth of the triplicates in each strain) and R2 is the diameter of the tested organism. To complement the evidence of the antagonism, each trial was compared and classified using the scale established by Bell *et al.* (1982) (Table 1).

Nursery tests to analyze the percentage of germination and rotting of seedlings. Miahuatenco chili seeds were used, which were provided by farmers from Santa María Tecomavaca in the state of Oaxaca. The trial was held under controlled conditions in the nursery of the Eco-Campus Valsequillo, ICUAP-BUAP. Before the seeds germinated, they were disinfested with sodium hypochlorite at 0.3% (v/v) for 10 min, rinsed three times with sterile water and dried with sterile paper (Illa *et al.*, 2019). The pathogen *F. solani* was inoculated in a salt suspension at a concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1} with a Neubauer chamber (PAUL MARIENFELD), in 400 seeds for each

Cuadro 1. Escala de antagonismos propuesta por Bell *et al.* (1982).
Table 1. Scale of antagonisms proposed by Bell *et al.* (1982).

Clase	Características
I	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento micelial del patógeno.
II	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió al menos 2/3 partes del medio.
III	<i>Trichoderma</i> spp., y fitopatógeno crecieron 1/2 y 1/2 la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro.
IV	Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de <i>Trichoderma</i> spp.
V	Crecimiento del patógeno que cubrió toda la superficie del medio.

Pruebas en vivero para analizar el porcentaje de germinación y podredumbre de plántulas.

Se utilizaron semillas de chile Miahuatenco, proporcionadas por productores de la comunidad de Santa María Tecomavaca en el estado de Oaxaca. El ensayo se llevó bajo condiciones controladas en el vivero del Eco-Campus Valsequillo, ICUAP-BUAP. Previo a la germinación de semillas; estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.3% (v/v) durante 10 min, se enjuagaron tres veces con agua estéril y se secaron con papel estéril (Illa *et al.*, 2019). La inoculación del patógeno *F. solani* se realizó en una suspensión salina estéril a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} por medio de una cámara de Neubauer (PAUL MARIENFELD), en 400 semillas para cada tratamiento en estudio; una vez impregnado el patógeno y secas las semillas, se procedió a inocular *T. harzianum* y *T. koningiopsis*. La inoculación se realizó a través de una suspensión de teliósporas a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} para dos tratamientos por separado, cada uno de ellos con 400 semillas (Reyes-Tena *et al.*, 2019).

Una vez inoculados las semillas con los hongos, las semillas se colocaron en charolas germinadoras con Peatmoss y Agrolita (1:1 v/v), previamente esterilizado a 121 °C y 15 lb de presión (Mannai *et al.*, 2018). Las semillas fueron sembradas mediante un procedimiento mecánico estandarizado; el sustrato húmedo se depositó a tres cuartas partes de la capacidad total de la cavidad, se colocó una semilla por cavidad a una profundidad de 1 cm (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). Se utilizó Mancozeb 80® como tratamiento químico, donde se siguió las recomendaciones del productor para la producción de plántula (1 kg de semilla por 5 g de producto), además se utilizó un tratamiento control; el cual consistió en semillas desinfectadas en una solución estéril de agua destilada y sacarosa al 3%, sin presencia de actividad fúngica. Por último, se cubrieron las charolas con plástico negro por 10 días, y se mantuvo

treatment under study; once the pathogen was soaked and the seeds were dry, *T. harzianum* and *T. koningiopsis* were inoculated. This was carried out with a suspension of teliospores at a concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1} for two separate treatments, each one with 400 seeds (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Once the seeds were inoculated with the fungi, the seeds were placed in germinating trays with Peatmoss and Agrolita (1:1 v/v) after sterilizing it at 121 °C and 15 lb of pressure (Mannai *et al.*, 2018). The seeds were planted using a standard mechanical procedure; the humid substrate was placed to take up three quarters of the total cavity, and one seed was placed in each cavity at a depth of 1 cm (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). Mancozeb 80® was used as a chemical treatment, following the manufacturer's recommendations for the production of the seedling (1 kg of seed for every 5 g of product), along with the use of a control treatment, which consisted of seeds that were disinfested in a solution of sterile distilled water and sucrose at 3%, without fungal activity. Finally, the trays were wrapped with black plastic for 10 days and the temperature was kept between 10 and 27 °C during germination (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). The percentages of seed germination were calculated using the following formula: seed germination (%) = (number of germinated seeds/total number of seeds) $\times$ 100 (Al-Fadhil *et al.*, 2019). The data were taken when the control treatment presented a germination rate of $\geq 90\%$.

Mortality and rate of severity in plants 40 dat. We used 1,500 Miahuatenco chili seedlings 15 days after emergence, provided by local farmers. The trial was conducted under open field conditions in the town of Santa María Tecomavaca, between parallels 17° 51' and 18° 03' latitude N, and meridians 96° 57' and 97° 15' longitude W, at an altitude between 400 and 2600 masl. The predominant climates in the area are dry warm (40.5%) and semidry warm

la temperatura entre 10 y 27 °C para la germinación (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). Los porcentajes de germinación de semillas se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: Germinación de semillas (%) = (número de semillas germinadas/número total de semillas) × 100 (Al-Fadhil *et al.*, 2019). Los datos se tomaron en el momento que el tratamiento control presentó una germinación $\geq 90\%$.

Mortalidad e índice de severidad en plantas de 40 ddt. Se utilizaron 1,500 plántulas de chile Mihuato de 15 días de emergencia proporcionadas por productores de la comunidad. El ensayo se llevó bajo condiciones a campo abierto en la comunidad de Santa María Tecomavaca, entre los paralelos 17° 51' y 18° 03' de latitud norte; los meridianos 96° 57' y 97° 15' de longitud oeste con una altitud entre 400 y 2 600 m. Los climas predominantes en la zona son seco cálido (40.5%) y semiseco cálido (17.5%) (INEGI, 2017). La preparación del terreno se realizó por productores de la comunidad tres meses antes del establecimiento del cultivo. Se llevó a cabo una labor de arado de 50 cm de profundidad para disminuir la compactación y favorecer el drenaje y dos volteos de 30 cm de profundidad para airear el suelo. La fecha de trasplante fue el 27 de marzo de 2018 a una profundidad de 3 cm. Se fertilizó con 90-80-80 de N, P y K a los 15 días (ddt). El diseño experimental fue bloques al azar con tres repeticiones, la densidad de población fue de seis plantas por m². Durante el desarrollo del cultivo se realizaron riegos con intervalos de cinco a seis días, aplicados antes que la humedad del suelo alcanzara el 50% de la capacidad de campo (Vázquez-Casarrubias *et al.*, 2011).

La inoculación de *F. solani* (MX-MIC 798) se realizó al cuello de cada una de las plantas de chile (100 plántulas por tratamiento distribuidas en cinco bloques al azar) con 1 mL de solución a una concentración de 1×10^8 conidios. Después de 36 h se

(17.5%) (INEGI, 2017). The ground was prepared by local farmers three months before planting. The field was plowed to a depth of 50 cm in order to reduce compaction and favor draining, along with two harrows-turns to a depth of 30 cm to ventilate the soil. The transplanting date was March 27, 2018, at a depth of 3 cm. Fertilization was carried out with 90-80-80 of N, P and K after 15 days (dat). The experimental design was random block with three repetitions and the population density was six plants per m². During the development of the crop, the field was irrigated every five to six days, before the soil humidity reached 50% of the capacity of the field (Vázquez-Casarrubias *et al.*, 2011).

F. solani (MX-MIC 798) was inoculated at the neck of each chili plant (100 seedlings per treatment distributed into five random blocks) with 1 mL of solution at a concentration of 1×10^8 conidia. After 36 h, the plants were inoculated with strains of *Trichoderma* (T-H4 and T-K11) at the same concentration as the pathogen (1×10^8 conidia mL⁻¹), for each strain, applied to the root for all treatments. For the chemical treatment, Mancozeb 80® was applied on the third day, following the recommendations provided by the manufacturer (480 g 200 L⁻¹ of water per ha). The control treatment was only given sterile water with no fungal activity. The plants were kept on the field for 40 days. The severity of the disease was calculated in the infected section in relation with the total root length (Perveen *et al.*, 2010) and classified on the scale of 0 to 3, where 0 = 0 to 25% of severity, 1 = 26 to 50%, 2 = 51 to 75% and 3 = 76 to 100% (Bokhari and Perveen, 2013).

Finally, after week 6 in the field, reisolation was carried out. Small symptomatic root sections were taken (approx. 1 × 1 cm), sterilized with sodium hypochlorite at 1% for 30 s and rinsed three times with sterile distilled water. The segments were then placed in a PDA medium and incubated in the dark

procedió a inocular las plantas con cepas de *Trichoderma* (T-H4 y T-K11) a una misma concentración que del patógeno (1×10^8 conidios mL^{-1}), por cada cepa, aplicado a la raíz para todos los tratamientos. Para el tratamiento químico, se aplicó Mancozeb 80® al tercer día, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (480 g 200 L^{-1} de agua por ha). El tratamiento control únicamente se aplicó agua estéril sin presencia de actividad fúngica. Las plantas se mantuvieron durante 40 días en campo. La severidad de la enfermedad se calculó en la porción infectada en relación con la longitud total de las raíces (Perveen *et al.*, 2010) y clasificada en la escala de 0 a 3 donde, 0 = 0 a 25% de severidad, 1 = 26 a 50%, 2 = 51 a 75% y 3 = 76 a 100% (Bokhari y Perveen, 2013).

Finalmente, se realizó el re-aislamiento a la sexta semana en campo. Se tomaron secciones pequeñas (aprox. 1×1 cm) de raíz con síntomas de enfermedad, se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 s y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, los segmentos fueron colocados en medio PDA, se incubaron bajo oscuridad a 28 °C por 10 días. Las colonias desarrolladas fueron purificadas por cultivos monospóricos o punta de hifa y se identificaron las estructuras con claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) en un sistema de micro cultivo con un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones (Samson *et al.*, 2014) y se conservaron en una solución de glicerol al 20% a -84 °C (Morales *et al.*, 2020).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron con ANOVA (dos vías) en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25. La velocidad de crecimiento y la tasa de desarrollo fueron las variables de respuestas con tres repeticiones y se validó por duplicado en un diseño estadístico completamente al azar. Se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de

at 28 °C for 10 days. The cultures that developed were purified with monosporic or hyphae tips and the structures were identified using taxonomic keys by Barnett and Hunter (1998) in a microculture system using an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000x (Samson *et al.*, 2014), and were stored in a 20% glycerol solution at -84 °C (Morales *et al.*, 2020).

Statistical analysis. The data were analyzed with an ANOVA (two-ways) in the IBM SPSS Statistics statistical package, version 25. Growth speed and development rate were the response variables with three repetitions and they were validated in duplicate in a totally random statistical design. Means were compared with the method by Tukey-Kramer with a level of probability of $p \leq 0.05$. PICR, the percentage of germination, mortality (%) and the severity of the disease were expressed as percentages and transformed with an angular arccosine $\sqrt{x+1}$. They then underwent an analysis of variance (two-way), along with the variables of total height, root height and rootless plant; the Tukey-Kramer test was used to determine the significant differences between treatments with a significance of $p \leq 0.05$. In turn, the PICR was compared based on Student's *t* test for paired samples ($p \leq 0.05$) using the same statistical package.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the antagonism of *T. harzianum* and *T. koningiopsis* against *F. solani* in dual cultures. Areas of interaction appeared between *T. harzianum* (TH-4) and *T. koningiopsis* (T-K11) against *F. solani* (MX-MIC 798), where parasitism was observed after 132 h. The rate of development and speed of growth presented significant differences ($p \leq 0.05$), where *T. harzianum* obtained the highest value (Table 2) with 0.972 ± 0.008

probabilidad de $p \leq 0.05$. El PICR, el porcentaje de germinación, la mortalidad (%) y la severidad de enfermedad fueron expresados en porcentajes y transformados con arco-coseno angular $\sqrt{x+1}$. Posteriormente, se sometieron a un análisis de varianza (dos vías), al igual que las variables altura total, altura raíz y altura planta sin raíz; se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos con una significancia de $p \leq 0.05$. Así mismo, el PICR se compararon en base a la prueba t de student para muestras apareadas ($p \leq 0.05$) utilizando el mismo paquete estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del antagonismo de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* ante *F. solani* en cultivo dual. Se presentaron zonas de interacción entre *T. harzianum* (TH-4) y *T. koningiopsis* (T-K11) frente a *F. solani* (MX-MIC 798), donde se observó un parasitismo a las 132 h. La tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), donde *T. harzianum* obtuvo el valor más alto (Cuadro 2) con 0.972 ± 0.008 mm h⁻¹ y

mm h⁻¹ and 1.3238 ± 0.0024 cm d⁻¹, respectively. Morales *et al.* (2020) reported a higher speed of growth than in the present study for strain TH-4 with 1.86 ± 0.22 cm d⁻¹ and 1.67 ± 0.01 mm h⁻¹ for the development rate. *F. solani* presented the lowest speed of growth (0.4718 ± 0.00063 cm d⁻¹). A study carried out by Andrade-Hoyos *et al.* (2019) reaffirm the results obtained in the present investigation, in which different species of *Trichoderma* spp. have superiorities over the mycelial growth of *F. oxysporum* (0.22 mm). The reduction in the growth rate of dual cultures is an indicator of the antagonistic ability of *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). The percentage of inhibition of radial growth (PICR) of *F. solani* exerted by *T. koningiopsis* and *T. harzianum* presents significant differences ($p < 0.0001$) from day eight (Table 2), when the strain T-H4 was 1.33% higher than *T. koningiopsis* T-K11 and a class II classification (Figure 1 A and B), according to the scale established by Bell *et al.* (1982).

The present investigation coincides with Sundaramoorthy and Balabaskar (2013), who found an inhibition of 53% in the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Likewise, Jagraj *et al.* (2018) reported a PICR of 55.6% for

Cuadro 2. Tasa de desarrollo, velocidad de crecimiento, porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Trichoderma* y *F. solani* bajo condiciones *In vitro*.

Table 2. Rate of development, growth speed, percentage of inhibition of radial growth of *Trichoderma* and *F. solani* under *in vitro* conditions.

Nombre	Tasa de desarrollo (mm h ⁻¹) ^y	Velocidad de crecimiento (cm d ⁻¹) ^y	PICR ^z	Clase Antagonismo
<i>T. harzianum</i>	0.972 ± 0.08^a	1.3238 ± 0.024^a		
<i>T. koningiopsis</i>	0.912 ± 0.012^b	1.2369 ± 0.063^b		
<i>F. solani</i>	0.391 ± 0.019^c	0.4718 ± 0.006^c		
<i>F. solani</i> vs. <i>T. harzianum</i>			53.33 ± 0.20^a	II
<i>F. solani</i> vs. <i>T. koningiopsis</i>			52 ± 0.002^b	III

^yLetras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. ^zMedias con letras diferentes, indican diferencias significativas con la prueba de t de student ($p \leq 0.05$). / ^yDifferent letters mean significant difference between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$. ^zMeans with different letters indicate significant differences with Student's t test ($p \leq 0.05$).

$1.3238 \pm 0.0024 \text{ cm d}^{-1}$, respectivamente. Morales *et al.* (2020) presentaron una velocidad de crecimiento mayor que en el presente estudio para la cepa TH-4 con $1.86 \pm 0.22 \text{ cm d}^{-1}$ y $1.67 \pm 0.01 \text{ mm h}^{-1}$ para la tasa de desarrollo. *F. solani* presentó la menor velocidad de crecimiento ($0.4718 \pm 0.00063 \text{ cm d}^{-1}$). Un estudio realizado por Andrade-Hoyos *et al.* (2019) reafirman los resultados obtenidos en la presente investigación, donde diferentes especies de *Trichoderma* spp., poseen superioridades sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (0.22 mm). La reducción en la tasa de crecimiento en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagónica de *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *F. solani* ejercido por *T. koningiopsis* y *T. harzianum* presenta diferencias significativas ($p < 0.0001$) a partir del día ocho (Cuadro 2), donde la cepa T-H4 presentó 1.33% mayor a *T. koningiopsis* T-K11 y una clasificación clase II (Figura 1 A y B) de acuerdo con la escala que estableció Bell *et al.* (1982).

La presente investigación coincide con Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), donde encontraron una inhibición del 53% de crecimiento micelial de

F. oxysporum against *T. koningiopsis*, for strains isolated from tomato plants. Michel-Aceves *et al.* (2019) obtained a class II antagonism on *F. oxysporum* with *T. harzianum*, which were similar results to those obtained in this investigation.

Suárez *et al.* (2008) presented 12 isolations of *T. harzianum* confronted with *F. solani*, where they obtained a PICR between 60 and 70% of the antagonism. Nagendran *et al.* (2016) reported that 15 isolations of *Trichoderma* spp. reached an inhibition of over 50% on the mycelial growth of *F. solani*, in which strain Phyto-4 obtained the highest inhibition (66.1%). Likewise, Sánchez-García *et al.* (2017) reported a PICR of 59.1% for *F. solani* against *T. harzianum* (Tri-4), which are higher results than those obtained in the present investigation. This indicates that *T. harzianum* may have a higher rate of incorporation of nutrients and a higher metabolism than *F. solani*, as well as different mechanisms for the secretion of hydrolytic enzymes, including cellulases, chitinases, glucanases, xylases and proteases, which may be involved in biocontrol mechanisms, helping it make better use of nutrients from the medium and deprive the pathogen of the resources

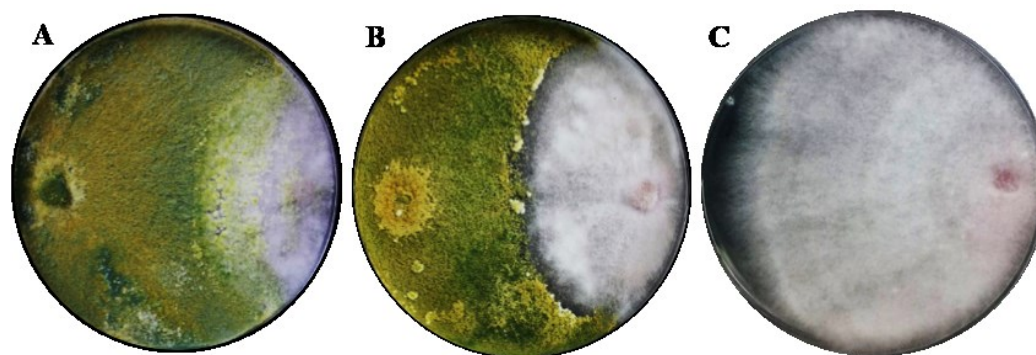


Figura 1. Antagonismo de *Trichoderma* con *F. solani* en escala de Bell *et al.* (1982), a las 132 h en cajas con medio PDA, incubados a 28 °C por 10 días, (A) antagonismo clase II de *T. harzianum* (T-H4) y *F. solani* (MX-MIC 798), (B) antagonismo clase III de *T. koningiopsis* (T-K11) y *F. solani* (C) *F. solani* sin interacción.

Figure 1. Antagonism of *Trichoderma* with *F. solani* on the scale by Bell *et al.* (1982) after 132 h in dishes with PDA medium, incubated at 28 °C for 10 days, (A) class II antagonism of *T. harzianum* (T-H4) and *F. solani* (MX-MIC 798), (B) class III antagonism of *T. koningiopsis* (T-K11) and *F. solani* (C) *F. solani* without interaction.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*. Asimismo, Jagraj *et al.* (2018) reportan un PICR de 55.6% para *F. oxysporum* frente a *T. koningiopsis*, para cepas aisladas de plantas de jitomate. Michel-Aceves *et al.* (2019) obtuvieron un antagonismo clase II sobre *F. oxysporum* con *T. harzianum*, que fueron resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Suárez *et al.* (2008) presentaron 12 aislamientos de *T. harzianum* confrontados para *F. solani*, donde obtuvieron un PICR entre el 60 y 70% del antagonismo. Nagendran *et al.* (2016) reportaron que 15 aislados de *Trichoderma* spp., alcanzaron más del 50% de inhibición sobre el crecimiento micelial de *F. solani*; donde la cepa Phyto-4 obtuvo la mayor inhibición (66.1%). De igual manera, Sánchez-García *et al.* (2017) reportan un PICR de 59.1% para *F. solani* frente a *T. harzianum* (Tri-4), resultados superiores a los obtenidos en el presente trabajo. Esto indica que probablemente, *T. harzianum* puede tener una tasa de incorporación de nutrientes y un metabolismo superior a *F. solani*, así como distintos mecanismos de secreción de enzimas hidrolíticas; entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xylasas y proteasas, las cuales pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos (Michel-Aceves *et al.*, 2005). Además *T. harzianum* es capaz de inhibir del crecimiento de fitopatógenos porque produce numerosos antibióticos como tricondermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, penicilina, tricotecenos, trichorzianinas, entre otros (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020).

El micoparasitismo es otro mecanismo de acción que presenta el género *Trichoderma*. En esta investigación, se logró observar granulación de la cepa MX-MIC 798 inducida por *T. harzianum*, así como ruptura de septos y estrangulación (Figura 2). Esto resalta la eminente capacidad micoparasítica de

(Michel-Aceves *et al.*, 2005). *T. harzianum* is also capable of inhibiting the growth of phytopathogens, since it produces numerous antibiotics, such as trichodermine, suzukacillin, alameticin, dermadin, penicillin, trichothecenes, trichorzianines and others (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020).

Mycoparasitism is another action mechanism displayed by the genus *Trichoderma*. In this investigation, we found granulation from the strain MX-MIC 798 induced by *T. harzianum*, as well as the breaking of septa and strangulation (Figure 2). This highlights the eminent mycoparasitic ability of strain TH-4. Duarte-Leal *et al.* (2017) found mycoparasitism between hyphae in *T. asperellum* (Ta.25), in which they observed lysis in hyphae of *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50), as reported in the present investigation. Other studies, carried out by Hyder *et al.* (2017), refers to the enzyme degradation of the cell wall of phytopathogenic fungi during the mycoparasitic action, which causes lysis and thus the disorganization of the cytoplasmic content. For *T. koningiopsis*, this investigation was unable to observe the mycoparasitic mechanism or breaking of the septae.

The growth rate and antagonism tests are tools to predict and determine the biocontrolling ability. According to Morales *et al.* (2020), these studies help select efficient antagonistic strains for evaluation under field conditions and obtain the best results.

Percentage of germination and rot caused by *F. solani* in Miahuateco chili seedlings in the nursery. The germination of the seeds from the control treatment was displayed after 12 days with 91% and significant differences ($p=0.0023$) in regard to the remaining treatments (Table 3), in which the effect of the inoculation from *F. solani* (MX-MIC 798), which affected the neck of the root, causing rot and death of the plant, as well

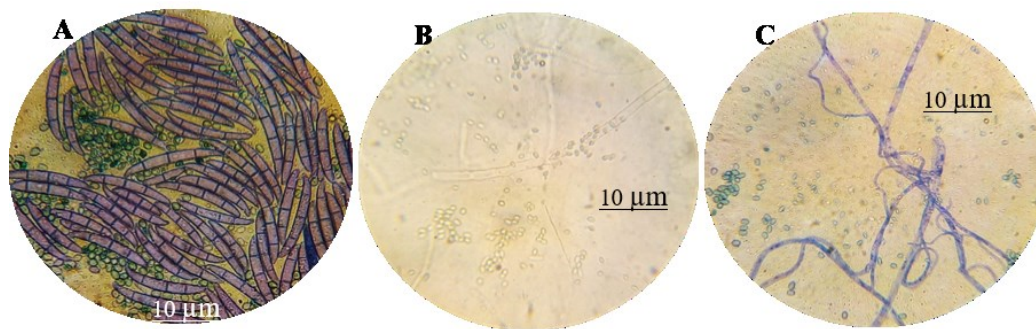


Figura 2. Micoparasitismo de *T. harzianum* (T-H4) sobre *F. solani* (MX-MIC 798) en medio PDA, incubados a 28 °C por 10 días; A) interacción de conidios de *T. harzianum* vs. macroconidios septados de *F. solani*; B) granulación y ruptura de septos de la cepa MX-MIC 798 inducida por *T. harzianum*; C) estrangulamiento de hifas de *F. solani* por la cepa TH-4.

Figure 2. Mycoparasitism of *T. harzianum* (T-H4) on *F. solani* (MX-MIC 798) in PDA medium, incubated at 28 °C for 10 days; A) interaction of *T. harzianum* conidia vs. *F. solani* septated macroconidia; B) granulation and breaking of septa of the strain MX-MIC 798 induced by *T. harzianum*; C) strangling of *F. solani* hyphae by strain TH-4.

la cepa TH-4. Duarte-Leal *et al.* (2017) observaron micoparasitismo entre hifas de *T. asperellum* (Ta.25) donde se observó lisis en hifas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50), como lo reportado en la presente investigación. Otros estudios realizados por Hyder *et al.* (2017), hacen referencia sobre la degradación enzimática de la pared celular de los hongos fitopatógenicos durante la acción micoparasítica, que causa lisis y con ello la desorganización del contenido citoplasmático. En el presente trabajo, para *T. koningiopsis*, no se logró observar el mecanismo de micoparasitismo ni ruptura de septos.

La tasa de crecimiento y las pruebas de antagonismo son herramientas para predecir y determinar la capacidad biocontroladora. De acuerdo con Morales *et al.* (2020) estos estudios permiten la selección de cepas antagonistas eficientes para ser evaluadas en condiciones de campo y obtener mejores resultados.

Porcentaje de germinación y podredumbre causada por *F. solani* en plántulas de chile

as the lowest percentage of germination (30%). In this investigation, the Miahuateco chili seeds inoculated with strain MX-MIC 798 treated with *T. harzianum* T-H4 showed a germination rate of 82%, even higher than the value reported by Ezziyyani *et al.* (2004), who obtained a percentage of germination of 60% in bell pepper seeds treated with *T. harzianum* after 10 days. In untreated plants inoculated with *F. solani*, root rot reached level 4.0 and a mortality of 70% (Table 3) in the scale proposed by Ezziyyani *et al.* (2004). Madhavi *et al.* (2006) reported a percentage of germination of 90.3% in chili seedlings (*C. annuum*) inoculated with *T. harzianum*-m1 and *F. solani* under nursery conditions, similar results to those found in the present investigation.

The microbial antagonists reduced rot caused by *F. solani* under nursery conditions in Miahuateco chili seeds significantly (22%), whereas *T. harzianum* presented the lowest percentage of plant mortality (18%), higher than strain T-K11, which obtained 26%. The group treated with Mancozeb 80® reduced seed mortality by 28% and presented

Miahuateco en vivero. La germinación de semillas del tratamiento control se presentó a los 12 días en 91%, con diferencias significativas ($p=0.0023$) respecto a los tratamientos restantes (Cuadro 3), donde se observó el efecto de la inoculación de *F. solani* (MX-MIC 798), que afectó el cuello de la raíz al provocar podredumbre y muerte de la planta, así como el porcentaje de germinación más bajo (30%). En esta investigación, las semillas de chile Miahuateco inoculadas con la cepa MX-MIC 798 tratadas con *T. harzianum* T-H4 mostraron 82% de germinación; un valor aún más alto que lo reportado por Ezziyyani *et al.* (2004) donde obtuvieron un porcentaje de germinación del 60% en semillas de pimiento tratadas con *T. harzianum* a los 10 días. En las plantas no tratadas e inoculadas con *F. solani*, la podredumbre de la raíz alcanzó el nivel 4.0 y una mortalidad de 70% (Cuadro 3) en la escala propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004). Madhavi *et al.* (2006) reportaron un porcentaje de germinación del 90.3% en plántulas de chile (*C. annuum*) inoculadas con *T. harzianum*-m1 y *F. solani* en invernadero, resultados similares a los encontrados en la presente investigación.

no significant differences with *T. koningiopsis*; the control treatment accounted for a feasibility of 91% in seed germination (Table 3).

The Mancozeb 80® chemical treatment presented high mortality results, which could indicate the creation of resistance by *F. solani* to this fungicide. Some fungicides used, such as triazoles, tend to develop resistance to the fungal populations due to genic factors (accumulative with time), since they only have one place of action (Leroux and Walker, 2011; Ziogas and Malandrakis, 2015). Chen *et al.* (2014) reported that *Fusarium fujikuroi* uses a resistance mechanism generated by the mutation of $\beta 2$ tub by the fungicide carbendazim, making its management difficult, although it opens the possibility of generating new control measures with antagonistic agents.

Mortality and rate of severity in plants 40 dat. The Miahuateco variety chili seedlings that were inoculated with *F. solani* at the moment of transplanting displayed rot in the roots 40 days after inoculation. Long reddish lesions were found, which covered 10% of the total surface of the main

Cuadro 3. Efecto de la actividad antagónica de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* sobre la germinación y podredumbre causada por *F. solani* en semillas de chile Miahuateco, bajo condiciones de vivero.

Table 3. Effect of the antagonistic activity of *T. harzianum* and *T. koningiopsis* on the germination and rot caused by *F. solani* in Miahuateco chili seeds, under nursery conditions.

Tratamientos	Germinación (%) ^y	Severidad ^z	Podredumbre causada por <i>F. solani</i> (%)
<i>F. solani</i> (MX-MIC 798)	30 ^d	4	80
<i>F. solani</i> vs. <i>T. harzianum</i> (T-H4)	82 ^b	1	25
<i>F. solani</i> vs. <i>T. koningiopsis</i> (T-K11)	74 ^c	2	30
<i>F. solani</i> vs. Mancozeb 80®	72 ^c	2	30
Tratamiento control	91 ^a	0	0

^yEvaluación realizada en la escala graduada de 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta) propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004). ^yLetras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. / ^zEvaluation performed on the gradual scale of 0 (no symptoms) to 5 (dead plant) proposed by Ezziyyani *et al.* (2004). ^zDifferent letters mean significant differences between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$.

Los antagonistas microbianos redujeron significativamente (22%) la podredumbre de semillas en chile Miahuateco causada por *F. solani* en vivero, *T. harzianum* presentó el porcentaje más bajo de mortalidad en plántulas (18%), superior a la cepa T-K11, que obtuvo 26%. El grupo tratado por Mancozeb 80® redujo la mortalidad de semillas en un 28% y no presentó diferencias significativas con *T. koningiopsis*; el tratamiento control representó el 91% de viabilidad en la germinación de semillas (Cuadro 3).

El tratamiento químico Mancozeb 80® presentó resultados altos de mortalidad, lo que puede indicar generación de resistencia por parte de *F. solani* ante este fungicida. Algunos fungicidas utilizados como los triazoles, tienden a desarrollar resistencia a la población de hongos por factores genéticos (acumulable con el tiempo) ya que poseen un sólo sitio de acción (Leroux y Walker, 2011; Ziogas y Malandrakis, 2015). Chen *et al.* (2014) reportaron que *Fusarium fujikuroi* utiliza un mecanismo de resistencia generado por la mutación de la β 2tub ante el fungicida carbendazim, lo que dificulta su manejo, sin embargo, abre la posibilidad de generar nuevas medidas de control con agentes antagonistas.

Mortalidad e índice de severidad en plantas de 40 ddt. Las plántulas de chile variedad Miahuateco que fueron inoculadas con *F. solani* al momento del trasplante, presentaron pudriciones en la raíz a los 40 días después de la inoculación; se observaron lesiones alargadas de color rojizo que cubrían 10% de la superficie total de la raíz principal, además, se pudo apreciar manchas café-rojizas en la porción del tallo que se encuentra por debajo del suelo y una pérdida considerable de raíces laterales, esto coincidió con lo descrito por Agrios (2006).

Los resultados de campo mostraron que los tratamientos con actividad antifúngica fueron efectivos para reducir entre el 48 y 51% de mortalidad por marchitez y pudrición de la raíz en plantas de chile

root and reddish-brown spots were also observed in the section of the stem found under the soil surface, along with a considerable loss of lateral roots. This coincided with descriptions by Agrios (2006).

The field results showed that the treatments with antifungal activity were effective to reduce mortality by wilting and root rot in Miahuateco chili plants under induced infection by 48 and 51% respectively, and it reduced the severity of the disease 40 dat by 50% (Table 4). Strain T-H4 presented the lowest percentage of plant mortality (48%), yet it displayed no significant differences with the Mancozeb 80® fungicide, which accounted for 47% of the mortality. Similarly, Thangavelu *et al.* (2004) showed that *T. harzianum* (Th-10) efficiently controlled the fusarial wilting of the banana tree, comparable to chemical control. Nagendran (2016), found the highest percentage (36.9%) of the reduction of the disease with strain Phyto-6, and also displayed a lower severity in wilting, as shown by the present investigation. *T. koningiopsis* T-K11 obtained a mortality of 51%, presenting significant differences with the control group (23%), which obtained the lowest mortality.

During their development, the plants infected by *F. solani* presented symptoms of yellowing in the basal part, yellowing of the nervations in 30% of leaves, as described by Black *et al.* (1993) in chili plants (*C. annuum*) that survived the infection on the field. The analysis of variance for the total plant height displayed highly significant differences ($p= 0.0002$) between treatments. Mancozeb 80® obtained the greatest height (25.6 ± 2.78 cm), followed by plants inoculated with *T. harzianum* (24 ± 1.98 cm) and *T. koningiopsis* (21 ± 1.81 cm). The lowest height appeared recurrently in plants inoculated with *F. solani* with 16 ± 0.28 cm, as shown in Figure 3A. Agrios (2006) mentions that plants affected by *Fusarium* sp. reduce their growth, due to the ability of the pathogen to colonize roots, preventing the adequate nutrition of the plant.

Miahuateco bajo infección inducida y, disminuyó 50% la severidad de la enfermedad a los 40 ddt (Cuadro 4). La cepa T-H4 presentó el porcentaje más bajo de mortalidad (48%) de plantas; sin embargo, no presentó diferencias significativas con el fungicida Mancozeb 80®, que representó el 47% de mortalidad. De manera similar, Thangavelu *et al.* (2004) mostraron que *T. harzianum* (Th-10) controló eficazmente el marchitamiento fusarial del banano, comparable al control químico. Nagendran (2016), encontró el porcentaje máximo (36.9%) de reducción de la enfermedad con la cepa Phyto-6, además mostró una menor severidad en la marchitez, como se observó en la presente investigación. *T. koningiopsis* T-K11 obtuvo el 51% de mortalidad, presentando diferencias significativas con el grupo control (23%), que obtuvo la mortalidad más baja.

Durante el desarrollo de las plantas infectadas por *F. solani*, presentaron síntomas de amarillamiento en la parte basal, aclaramiento de nervaduras en un 30% de las hojas, como lo describieron Black *et al.* (1993) en plantas de chile (*C. annuum*) que sobrevivieron a la infección en campo. El análisis de varianza de altura total de la planta presentó

The genus *Trichoderma* can parasite pathogenic fungi and produce antibiotics. It also presents positive effects in plant growth, yield, absorption of nutrients, fertilizer use efficiency and the systemic resistance of plants to diseases (Hyder *et al.*, 2017; Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). In a study carried out by Cole and Zvenyika (1988), they noticed that the infection caused by *F. solani* in tobacco plants could be controlled when applying *T. harzianum* in disease management procedures. Likewise in a study by Yedidia *et al.* (1999), when inoculating *T. harzianum* in early growth, where the absorption of nutrients in the plant improved. These investigations agree with studies by Tsegaye-Redda *et al.* (2018), who mention that *Trichoderma* sp. has the ability to antagonize the phytopathogens present in the soil, and also induces the promotion of plant growth and protects plants from biotic and abiotic stress. The studies by Dubey *et al.* (2007) have been confirmed in *T. harzianum*, where seed germination, root health and sprout length have improved and the frequency of healthy plants has increased, as confirmed by the present investigation.

Forty dat with the strain MX-MIC 798 that led to the development of necrotic lesions in the roots

Cuadro 4. Actividad antagonista de *Trichoderma* sobre el porcentaje de mortalidad a los 40 ddt y severidad de la enfermedad inducida por *F. solani* en cultivo de chile Miahuateco.

Table 4. Antagonistic activity of *Trichoderma* on the percentage of mortality 40 dat and severity of the disease induced by *F. solani* in Miahuateco chili crop.

Tratamientos	Mortalidad (%) ^z	Severidad de la enfermedad	Tamaño de planta sin raíz (cm) ^z	Tamaño de raíz (cm) ^z	Altura total (cm) ^z
<i>F. solani</i> (MX-MIC 798)	86±1.34 ^a	3 - 76%	12±1.12 ^c	1.3±0.12 ^c	16±0.28 ^c
<i>F. solani</i> vs. <i>T. harzianum</i> (T-H4)	48±1.16 ^c	1 - 25%	18±1.97 ^a	2.1±0.09 ^b	24±1.98 ^a
<i>F. solani</i> vs. <i>T. koningiopsis</i> (T-K11)	51±1.31 ^b	2 - 51%	17±2.62 ^{ab}	1.9±0.30 ^b	21±1.81 ^a
<i>F. solani</i> vs. Tratamiento químico (Mancozeb 80®)	47±1.36 ^c	1 - 25%	21±2.15 ^a	2.6±0.26 ^a	25.6±2.78 ^a
Grupo control	23±0.38 ^d	0 - 0%	16±0.02 ^b	1.6±0.18 ^b	18.4±1.08 ^b

Evaluación realizada en la escala graduada de 0 a 3 donde, 0 = 0 a 25% de severidad, 1 = 26 a 50%, 2 = 51 a 75% y 3 = 76 a 100% propuesta por Bokhari y Perveen, 2013. ^zLetras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. / Evaluation performed on the gradual scale of 0 to 3, where 0 = 0 to 25% of severity, 1 = 26 to 50%, 2 = 51 to 75% and 3 = 76 to 100% proposed by Bokhari and Perveen, 2013. ^zDifferent letters mean a significant difference between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$.

diferencias altamente significativas ($p= 0.0002$) entre los tratamientos. Mancozeb 80® obtuvo la mayor altura (25.6 ± 2.78 cm), seguido por las plantas inoculadas por *T. harzianum* (24 ± 1.98 cm) y *T. koningiopsis* (21 ± 1.81 cm), de manera recurrente, la menor altura se presentó en plantas inoculadas con *F. solani* con 16 ± 0.28 cm, como se muestra en la Figura 3A. Agrios (2006), menciona que las plantas afectadas por *Fusarium* sp., reducen su crecimiento debido a la capacidad del patógeno de colonizar raíces, lo que impide una adecuada nutrición de la planta.

El género *Trichoderma* puede parasitar hongos patógenos y producir antibióticos. Además, presenta efectos positivos en el crecimiento de las plantas, el rendimiento, la absorción de nutrientes,

and stems of evaluated plants, we proceeded to re-isolate in order to satisfy Koch's postulates. The fungal cultures developed abundant aerial mycelia, with a cotton-like texture and white in color with purple tones (Figure 3B), which appeared more intense in the middle of the culture medium (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). The duration of the microculture until chlamydospores were visible was 14 days; for macroconidia, seven days; and for phialides and microconidia, four days. Oval-shaped septated mycelia and abundant microconidia were observed, with an average size of $2.4 \times 6.3 \mu\text{m}$ in length by $2 \times 4 \mu\text{m}$ in width (Figure 3C), along with the typically crescent-moon shaped macroconidia, one to four septa (Figure 3F), an average size of $2.4 \times 4.1 \mu\text{m}$ in width and $11.8 \times 36.4 \mu\text{m}$ long (Barnett

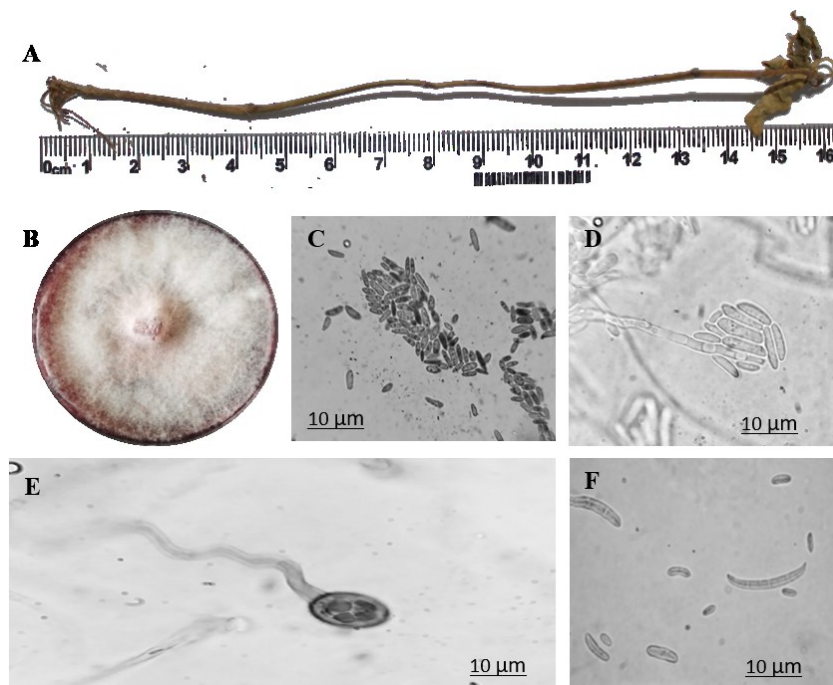


Figura 3. Estructuras de reproducción de *F. solani* (MX-MIC 798) de 10 días en medio PDA a 28 °C. A) planta muerta de *Capsicum annuum* variedad Miahuateco inoculada con *F. solani* MX-MIC 798, B) colonia de *F. solani* en medio PDA; C) microconidios de *F. solani*; D) filídes y microconidios en falsas cabezas de *F. solani*; E) clamidosporas de *F. solani*; F) micro y macroconidios de *F. solani*.

Figure 3. Reproduction structures of *F. solani* (MX-MIC 798) after 10 days in a PDA medium at 28 °C. A) dead *Capsicum annuum* var Miahuateco plant inoculated with *F. solani* MX-MIC 798, B) *F. solani* culture in PDA medium; C) microconidia of *F. solani*; D) phialides and microconidia in false *F. solani* heads; E) *F. solani* chlamydospores; F) *F. solani* micro and macroconidia.

la eficiencia en la utilización de fertilizantes y la resistencia sistémica a las enfermedades de las plantas (Hyder *et al.*, 2017; Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Cole y Zvenyika (1988), observaron que la infección causada por *F. solani* en plantas de tabaco, podría controlarse al aplicar *T. harzianum* en los procedimientos de manejo de enfermedades. Así como se demostró por un estudio realizado por Yedidia *et al.* (1999) al inocular *T. harzianum* en el crecimiento temprano, donde mejoró la absorción de nutrientes por la planta. Estos trabajos concuerdan con los estudios de Tsegaye-Redda *et al.* (2018) quienes mencionan que *Trichoderma* sp., tiene la capacidad de antagonizar a los fitopatógenos presentes en el suelo, así como también induce la promoción del crecimiento de las plantas y protege a las plantas del estrés biótico y abiótico. Los estudios de Dubey *et al.* (2007) han sido confirmados en el caso de *T. harzianum*, donde ha mejorado la germinación de las semillas, la sanidad de las raíces y la longitud de los brotes, además de aumentar la frecuencia de plantas sanas, como lo confirmado en la presente investigación.

Transcurridos 40 ddt con la cepa MX-MIC 798 y que indujo desarrollo de lesiones necróticas en raíces y tallos de las plantas evaluadas, se procedió al re-aislamiento con el fin de cumplir con los postulados de Koch. Las colonias fúngicas desarrollaron micelio aéreo abundante, de textura algodonesa y de color blanco con tonalidad púrpura (Figura 3B), más intenso en el centro del medio de cultivo (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). La duración del micro-cultivo para observar las clamidosporas fue de 14 días, de macroconidias siete días, así como de fiálides y microconidias con cuatro días. Se logró observar micelio septado y abundantes microconidias en forma ovoide de tamaño promedio de $2.4 \times 6.3 \mu\text{m}$ de largo por $2 \times 4 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 3C), además de macroconidias con la típica forma de hoz o de luna, de uno a cuatro septos (Figura

and Hunter, 1998). Likewise, chlamidospores were also observed (Figure 3E), $8.4\text{--}10.5 \mu\text{m}$ in diameter and with particular morphometric characteristics reported by Montealegre *et al.* (2003).

CONCLUSIONS

The strains *T. harzianum* (TH-4) and *T. koningiopsis* (T-K11) displayed classes II and III of antagonism, respectively, on *F. solani* on the Bell scale. In addition *T. harzianum* TH-4 displayed the highest rate of development, speed of growth and percentage of inhibition of PICR radial growth on *F. solani* MX-MIC 798 (53%) under *in vitro* conditions.

In nursery conditions, *T. harzianum* TH-4 (82%) and *T. koningiopsis* T-K11 (74%) presented the best response in the germination of Miahuateco variety chili plants, with the highest percentage of germination in comparison with the chemical treatment (72%), although *T. harzianum* TH-4 reduced rot caused by the *F. solani* strain by 75%.

In the town of Santa María Tecomavaca, in the state of Oaxaca, Mexico, *T. harzianum* (T-H4) and the Mancozeb 80® chemical treatment presented the best response in the reduction of the mortality and severity of the disease in Miahuateco chili plants 40 dat.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

3F), de tamaño promedio de  $2.4 \times 4.1 \mu\text{m}$  de ancho y  $11.8 \times 36.4 \mu\text{m}$  de largo (Barnett y Hunter, 1998). Así también se observaron clamidosporas (Figura 3E) con un diámetro entre de  $8.4\text{--}10.5 \mu\text{m}$ , características morfométricas peculiares de estos fitopatógenos reportados por Montealegre *et al.* (2003).



## CONCLUSIONES

Las cepas *T. harzianum* (TH-4) y *T. koningiopsis* (T-K11), mostraron antagonismo clase II y III respectivamente, ejercido en *F. solani* en la escala de Bell, además, *T. harzianum* TH-4 mostró mayor tasa de desarrollo, velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de crecimiento radial PICR sobre *F. solani* MX-MIC 798 (53%) en condiciones *in vitro*.

En condiciones de vivero, *T. harzianum* TH-4 (82%) y *T. koningiopsis* T-K11 (74%) presentaron mejor respuesta en la germinación de plantas de chile variedad Miahuateco; presentando el porcentaje de germinación mayor en comparación al tratamiento químico (72%), sin embargo, *T. harzianum* TH-4 redujo en un 75% la podredumbre causada por la cepa *F. solani*.

En la comunidad de Santa María Tecomavaca en el estado de Oaxaca, México, *Trichoderma harzianum* (T-H4) y el tratamiento químico Mancozeb 80® presentaron la mejor respuesta en la reducción de mortalidad y severidad de la enfermedad de plantas de chile Miahuateco a los 40 ddt.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2006. Plant Pathology. 5 Edition. Elsevier the Academic Press. London. 838 p.
- Al-Fadhal FA, Al-Abedy AN and Alkhafije DA. 2019. Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Egyptian Journal of Biological Pest control 29(47): e2752. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Hernández EO, Gayosso EM, Valenzuela NL and Cureño HJB. 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>
- Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV and Romero-Arenas O. 2020. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado. Plants e1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. USA. 241 p.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Black LL, Green KS, Hartman LG and Poulos MJ. 1993. Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Taiwan. 98 p.
- Bokhari NA and Perveen K. 2013. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. African Journal of Microbiology Research 6(44): 7193-7197. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.956>
- Castillo-Aguilar C, Coh-Méndez D, Carrillo-Ávila E and Monsalvo-Espinosa A. 2015. Producción de planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Agroproductividad 8(4): 73-78. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/676>
- Chen ZH, Gao T, Liang SP, Liu KX, Zhou MG and Chen CJ. 2014. Molecular mechanism of resistance of *Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides. Fems microbiology letters 357(1): 77-84. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12504>
- Cole JS and Zvenyika Z. 1988. Integrated control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tobacco transplants with *Trichoderma harzianum* and triadimenol. Plant Pathology 37(2): 271-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02073.x>
- Duarte-Leal Y, Lamz-Piedra A and Martínez-Coca B. 2017. Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc. Revista de Protección Vegetal 32(3): 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n3/rpv03317.pdf>
- Dubey SC, Suresh M and Singh B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. Biological control 40(1): 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.006>
- Ezziyyani M, Sánchez CP, Ahmed AS, Requena ME and Castillo MEC. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de biología 26: 35-45. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30441>
- Gan H and Wickings K. 2017. Soil ecological responses to pest management 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>
- Guenoun K, Chattaoui M, Bouri M, Rhouma A, Naghmouchi K and Raies A. 2019. Biological control of growth promoting rhizobacteria against *verticillium* wilt of pepper plant. Biología 74: 237-250. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-00169-9>
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Ruocco M, Lanzuise S, Woo S and Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp., su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopato-

- tógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2): 87-96. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a2.pdf>
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R and Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 35(1): 98-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hyder S, Inam UH, Bibi S, Humayun A, Ghuffar S and Iqbal S. 2017. Novel potential of *Trichoderma* spp., as biocontrol agent. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(4): 214-222. <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartC/5-3-244-140.pdf>
- Illa C, Andrés-Pérez A, Matías T and Pérez MA. 2019. Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(1): 119-131. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2017. Áreas geográficas. Coordenadas Oaxaca. (Consultado: 01 de julio de 2020). <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=20>
- Jagraj C, Vipul K, Seweta S, Adesh K and Vinit PS. 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>
- Launio CC, Labon KO, Bañez AM and Batani RS. 2020. Adoption and economic analysis of using biological control in Philippine highland farms: Case of *Trichoderma koningii* strain KA. *Crop Protection* e105177. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105177>
- Leroux P and Walker AS. 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67(1): 44-59. <https://doi.org/10.1002/ps.2028>
- Madhavi M, Kumar CPC, Reddy DRR and Singht TK. 2006. Integrated management of wilt of chilli incited by *Fusarium solani*. *Indian Journal of Plant Protection* 34(2): 225-228.
- Mannai S, Jabnoun-Khiareddine H, Nasraoui B and Daami-Remadi M. 2018. *Rhizoctonia* root rot of pepper (*Capsicum annuum*): Comparative pathogenicity of causal agent and biocontrol attempt using fungal and bacterial agents. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 9(2): 431-439. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000431>
- Michel-Aceves AC, Hernández-Morales J, Toledo-Aguilar R, López JES and Romero-Rosales T. 2019. Capacidad antagonista 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 AC, Otero-Sánchez MA, Rebollo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ariza-Flores R and Barrios-Ayala A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:273-278. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60911213.pdf>
- Montealegre J, Donoso S, Herrera R and Besoain X. 2003. Identificación de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como agente causal de la podredumbre del pie de tomate. *Boletín Micológico* 18: 53-55. <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/426/387>
- Morales ML, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2020. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(3): 434-449. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-7>
- Nagendran K, Loganathan M, Saha S, Mishra A, Pandey KK, Rai RM, Gupta S, Rai AB and Singh B. 2016. Biological management of wilt disease on chilli caused by *Fusarium solani*. *Vegetable Science* 43(2): 253-256. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:vgt&volume=43&issue=2&article=019>
- Nawrocka J, Małolepsza U, Szymczak K and Szczech M. 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, proteins, and mechanical strengthening in multi-layer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma* 255(1): 359-373. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-11571>
- Pérez-Carrasco LJ, Tornero-Campante M A, Escobedo-Garrido JS and Sandoval-Castro E. 2017. El chile poblano criollo en la cultura alimentaria del Alto Atoyac. *Estudios Sociales* 27(49): 47-66. <http://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v27n49/0188-4557-estsoc-27-49-00047.pdf>
- Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S and Monteagudo-Hernández O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30(1): 17-26. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.142312>
- Perveen K, Haseeb A and Shukla PK. 2010. Effect of *Sclerotinia sclerotiorum* on the disease development, growth, oil yield and biochemical changes in plants of *Mentha arvensis*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(4): 291-294. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.008>
- Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar F, Meza-Moller CA and Guzmán Ortiz JM. 2018. Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 16-34. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-1>
- Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M and Fernández-Pavía SP. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-1>
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-Santos G, Vaquera-Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into *damping-off* infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress* 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>

- Rodríguez J, Olvera BVP, Muñoz AG, Corona BM, Manzo F and Liendo LS. 2007. Rescate *in situ* del chile Poblano en Puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana 30(1): 25-32. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61030103>
- Romero-Arenas O, Amaro LJ, Damián HM, Valencia de Ita MA, Rivera A and Huerta LM. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. ITEA 113(4): 313-324. <http://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Samson R, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T and Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Mycology 78: 141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sánchez-García BM, Espinosa-Huerta E, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R and Mora-Avilés MA. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp., sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrociencia 51(1): 63-79. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063-en.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2020. Atlas Agroalimentario. 1080-2020. <https://www.gob.mx/siap>
- Suárez C, Fernández R, Valero N, Gámez R and Páez A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología 10(2): 35-43. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Sundaramoorthy S and Balabaskar P. 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp., against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Applied Biology and Biotechnology 1(3): 36-40. [https://www.ja-bonline.in/abstract.php?article\\_id=15](https://www.ja-bonline.in/abstract.php?article_id=15)
- Thangavelu R, Palaniswami A and Velazhahan R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. Agriculture, Ecosystems and Environment 103(1): 259-263. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.026>
- Toledo-Aguilar R, López-Sánchez H, López PA, Guerrero-Rodríguez JDD, Santacruz-Varela A, and Huerta-de la Peña A. 2016. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de chile Poblano. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(5): 1005-1015. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i5.227>
- Tsegaye-Redda ET, Ma J, Mei J, Li M, Wu B and Jiang X. 2018. Biological control of soilborne pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) of cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. Journal of Life Sciences 12:1-12. <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2018.01.001>
- Vázquez-Casarrubias G, Escalante-Estrada JAS, Rodríguez-González M, Ramírez-Ayala C and Escalante-Estrada LE. 2011. Edad al trasplante y su efecto en el crecimiento y rendimiento de chile Apaxtleco. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(1): 61-65. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v17n1/v17n1a10.pdf>
- Yedidia I, Benhamou N and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1061-1070. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>
- Zeravakis G, Philippoussis A, Ioannidou S and Diamantopoulou P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia Microbiologica 46(3): 231-234. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>
- Ziogas BN and Malandrakis AA. 2015. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). In: Ishii H., Hollomon D. (eds) Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Springer, Tokyo. 199-216 pp. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13)