UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

UNIDAD REGIONAL LOS MOCHIS

Departamento de Investigación y Posgrado

Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente

T E S I S

Identificación de especies de *Trichoderma* y su antagonismo *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii* proveniente del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) del norte de Sinaloa, México.

PRESENTA

MARÍA BELÉN IRAZOQUI ACOSTA

QUE PARA OBTENCIÓN DEL GRADO:

MAESTRO EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

DIRECTORES

DIRECTOR: M.C. GABRIEL HERRERA RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DR. RUBÉN FÉLIX GASTÉLUM

LOS MOCHIS, SINALOA. NOVIEMBRE DE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: **carta conclusión de tesis para opción de grado**.
Los Mochis, Sinaloa, 22 de octubre de 2021.

Dra. Karla Marieia Sandoval Cota
Jefa del Departamento de Investigación y Posgrado
Unidad Regional Los Mochis

Presente

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante**: María Belén Irazoqui Acosta** Matricula**: 19021110.**

Nombre de Tesis: **Identificación de especies de *Trichoderma* y su antagonismo *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii* proveniente del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) del norte de Sinaloa, México.**

Nombre del Programa Educativo: **Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.**

Atentamente.

Gabriel Herrera Rguez

M.C. Gabriel Herrera Rodríguez
Director de Tesis

UAdeO

El presente trabajo de investigación titulado "**Identificación de especies de *Trichoderma* y su antagonismo *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii* proveniente del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) del norte de Sinaloa, México.**" realizado por la **Lic. María Belén Irazoqui Acosta** con matrícula **19021110**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:

Gabriel Herrera Rguez.

M.C. Gabriel Herrera Rodríguez
Director de Tesis

Dr. Rubén Félix Gastelum
Director de Tesis

Dra. Rosa María Longoria Espinoza
Asesora de Tesis

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez
Asesora de Tesis

Los Mochis, Sinaloa, octubre de 2021.

UAdeO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día 25 del mes septiembre del año 2021, quien suscribe María Belén Irazoqui Acosta alumna del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (Registro CONACyT 004128) con número de matrícula 19021110, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M.C. Gabriel Herrera Rodríguez y Dr. Rubén Félix Gastélum y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación de especies de *Trichoderma* y su antagonismo *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii* proveniente del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) del norte de Sinaloa, México.", a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

María Belén Irazoqui

María Belén Irazoqui Acosta

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte. UTEFI, bajo la dirección del M.C. Gabriel Herrera Rodríguez. El proyecto de tesis recibió financiamiento de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, por permitirme culminar esta etapa importante en mi vida y quien con su bendición llena siempre mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento durante mi programa de estudios de maestría.

Agradezco a mi hija Génesis, por ser mi motor para realizar y culminar mis sueños, por darme esa fortaleza de querer ser mejor cada día, te amo con todo mi ser hija.

A mis padres, gracias, por todo el apoyo incondicional para mí y mi hija, y la motivación para concluir cada proceso de mi vida.

A Saul, mi esposo y padre de mi hija, por apoyarme en cada decisión durante este proceso, gracias por la paciencia y compañía, además por confiar y creer en mí.

Al M.C. Gabriel Herrera Rodríguez por ser un excelente ser humano, a quien admiro y aprecio, gracias por dedicar su tiempo, conocimientos y experiencia, los cuales me han ayudado a desarrollarme y mejorar tanto como persona y como profesional. De igual manera agradezco a M.C. Sara Elodia Armenta López por su apoyo, orientación, motivación y amistad desde mi etapa de licenciatura hasta ahora.

A mi comité de tesis, Dr. Rubén Félix Gastélum, Dra. Rosa María Longoria y Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez por dedicarme su tiempo y conocimientos.

A Flor Agudez, Araceli Ruiz, Odeth Rodríguez, Karla Villegas, Laura Escalante, Itzel López y demás personal de la Junta Local del Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte.

A mis compañeros Xavier Eduardo Verdugo Contreras, Jesús Marrufo Ruíz, Irvin Molina Marañón y Luis Calderón.

A la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte que puso a disposición el uso de sus instalaciones y equipos para elaborar mi proyecto de investigación.

RESUMEN

El hongo *Sclerotium rolfsii* agente causal de la podredumbre blanda en la papa, ha provocado merma de hasta un 20% en los rendimientos de esta hortaliza en ciclos agrícolas recientes en el estado de Sinaloa. Actualmente, no existen estudios sustentados en el método científico, enfocados hacia el manejo de este hongo en el cultivo. Por lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron: a) identificar morfológica y molecularmente aislados de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii* de suelos donde se estableció el cultivo de papa, en la región norte de Sinaloa b) determinar la patogenicidad de aislados de *S. rolfsii*, en tubérculos de papa, en condiciones controladas y c) determinar la inhibición *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii*. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii* de suelos se obtuvieron en medio PDA; dichas muestras de suelos fueron colectadas de 48 predios del estado de Sinaloa, México; en base a la identificación morfológica y molecular se registraron 17 aislados pertenecientes a *Sclerotium rolfsii* y 9 a *T. asperellum,* 6 *T. asperelloides,* 3 *T. afroharzianum* y 1 a *T. harzianum.* En cuanto a las pruebas de patogenicidad *in vitro* en tubérculos de papa variedad Fianna, todos los aislados resultaron patogénicos con diferentes grados de virulencia. Por último, en las pruebas de antagonismo *in vitro,* los aislamientos de *Trichoderma* mostraron inhibición (21.2- 69.7% cepa SrP4 y 25.5-69.7% cepa SrP17) en el crecimiento micelial de *S. rolfsii*. Estos resultados son relevantes, pues abre un camino a investigaciones futuras que incluyan la efectividad biológica contra *S. rolfsii* de dichos aislados en invernadero y en campo.

ÍNDICE

RESUMEN **7**
I. INTRODUCCIÓN **12**
II. JUSTIFICACIÓN **14**
III. ANTECEDENTES **15**
IV. REVISIÓN DE LITERATURA **17**
4.1. El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L*)* 17
4.1.3. Clasificación taxonómica 19
4.1.4. Producción mundial 19
4.2. Principales patógenos que afectan al cultivo de la papa 20
4.2.1. Bacterias 20
4.2.2. Virus 20
4.2.3. Nematodos 21
4.2.4. Hongos y oomicetes 21
4.3. *Sclerotium rolfsii* 22
4.3.1. Generalidades de *S. rolfsii* 22
4.3.2. Clasificación taxonómica de *Sclerotium rolfsii* 22
4.3.3. Descripción morfológica de *Sclerotium rolfsii* 22
4.3.4. Ciclo de la enfermedad de *Sclerotium rolfsii* 24
4.3.5. Síntomas en papa causado por *Sclerotium rolfsii* 25
4.3.6. Métodos de control de *Sclerotium rolfsii* 26
4.3.6.1. Control químico 26
4.3.6.2. Control cultural 26
4.3.6.3. Control biológico 27
4.4. *Trichoderma* spp. 27
4.4.1. Generalidades de *Trichoderma* spp. 27
4.4.2. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp. 28
4.4.3. Morfología de *Trichoderma* spp 28
4.4.4. Mecanismos de acción de *Trichoderma* 28
4.4.4.1. Competencia 29
4.4.4.2. Micoparasitismo 29
a) Crecimiento quimiotrófico 29
b) Reconocimiento 29
c) Adhesión y enrollamiento 29

d) Actividad lítica 30
4.4.4.3. Antibiosis 30
V. HIPÓTESIS 31
VI. OBJETIVOS 32
6.1. Objetivo general 32
6.2. Objetivos específicos 32
VII. MATERIALES Y MÉTODOS 33
7.1. Área de estudio 33
7.2. Muestreo de suelos 33
7.3. Obtención y purificación de cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de suelos 34
7.3.1. Aislamiento y purificación de aislados de *Sclerotium rolfsii* provenientes de suelo 34
7.4. Identificación de *Trichoderma* spp. mediante caracterización morfológica 35
7.5. Identificación morfológica de *Sclerotium rolfsii* 36
7.6. Identificación molecular de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii* 37
7.6.1. Extracción de ADN por el método CTAB 37
7.6.2. Amplificación y secuenciación de la región RPB2 para *Trichoderma* spp. 37
7.6.3. Amplificación y secuenciación de la región ITS para *Sclerotium rolfsii* 38
7.7. Patogenicidad de *Sclerotium rolfsii* en tubérculos de papa 39
7.8. Evaluación del efecto inhibitorio de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium rolfsii* 41
VIII. RESULTADOS 43
8.3. Identificación de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii* mediante pruebas moleculares (PCR) ... 48
8.3.1. Amplificación de la región RPB2 para *Trichoderma* spp. 48
8.3.2. Amplificación de la región ITS para *Sclerotium rolfsii* 51
8.4. Patogenicidad de *Sclerotium rolfsii* en tubérculos de papa 53
8.5. Efecto inhibitorio *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre *Sclerotium rolfsii* 56
IX. DISCUSIÓN 60
X. CONCLUSIONES 62
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 63
XII. ANEXOS 78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Posición taxonómica de *Solanum tuberosum* L. 19

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Sclerotium rolfsii* 22

Cuadro 3. Ubicación taxonómica de *Trichoderma* 28

Cuadro 4. Eficiencia de las especies de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii*. 42

Cuadro 5. Características morfológicas de aislados de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* 44

Cuadro 6. Comparación de características morfológicas de tres especies del género *Sclerotium* con 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* (SrP1-SrP17) 46

Cuadro 7. Tamaño y número de esclerocios de cepas de *S. rolfsii* en medio de cultivo PDAA 47

Cuadro 8. Comparación de secuencias de los fragmentos generados con los oligonucleótidos RPB25F y RPB27CR, con secuencias documentadas en la base de datos de NCBI 49

Cuadro 9. Secuencias documentadas en la base de datos de NCBI, comparadas con los fragmentos generados con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 52

Cuadro 10. Penetración del patógeno en tubérculos de papa con 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* (SrP1-SrP17) 55

Cuadro 11. Porcentaje de podredumbre blanda en tubérculos de papa con 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* (SrP1-SrP17) 56

Cuadro 12. Antagonismo *in vitro* de 25 cepas de *Trichoderma* spp. (TRAE18-TR44) contra *Sclerotium rolfsii* (SrP4 y SrP17), con puntaje (1-5) de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, 1982 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de papa..... 17

Figura 2. Origen de la papa..... 18

Figura 3. Características morfológicas de *Sclerotium rolfsii*..... 23

Figura 4. Ciclo de la pudrición blanda de la papa causada por *S. rolfsii*..... 24

Figura 5. Tubérculo de papa con lesiones causadas por *S. rolfsii*..... 26

Figura 6. Ubicación geográfica de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte. 33

Figura 7. Morfología colonial y microscópica de *Trichoderma asperellum* 45

Figura 8. Morfología colonial y microscópica de *Trichoderma harzianum*..... 45

Figura 9. Características morfológicas de *Sclerotium rolfsii*..... 47

Figura 10. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de cepas nativas de *Trichoderma* (TRAE18-TRAF36) a 1100 pb con los oligonucleótidos RPB25F y RPB27CR 48

Figura 11. Filograma del vecino más cercano, basado en secuencias de la región RPB2..... 50

Figura 12. Productos de amplificación por PCR de cepas de *Sclerotium* (SrP1-SrP17) con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 51

Figura 13. Filograma del vecino más cercano, basado en secuencias de la región ITS 53

Figura 14. Síntomas de podredumbre blanda en tubérculos de papa variedad Fianna, causados por la cepa SrP17 de *Sclerotium rolfsii* mediante inoculación artificial 54

Figura 15. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* (SrP4) 57

Figura 16. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* (SrP17). 58

I. INTRODUCCIÓN

El origen de la papa (*Solanum tuberosum* L) es en los Andes en América del Sur (Solaman, 1985; Hawkes, 1994). Este cultivo es considerado uno de los más importantes en cuanto a su producción mundial, después del maíz (*Zea mays),* el trigo (*Triticum* spp.) y el arroz (*Oryza sativa*) (SIAP, 2020). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2020) informó que se cosecharon 17.6 millones de hectáreas (ha), con una producción de 368 millones de toneladas (t), y un rendimiento promedio de 20.9 t ha^{-1} durante el ciclo 2019-2020. En lo que toca a China, se posiciona como el principal productor de esta hortaliza, ya que, en el 2020, cosechó 91 millones de t, seguido por la India, Rusia, Ucrania y Estados Unidos con producciones de 50, 22, 20 y 19 millones de toneladas respectivamente (FAO, 2020).

Por otro lado, en México, la producción de papa en el ciclo 2019-2020, se estimó en: 1,783,896.00 t, una superficie cosechada de 58,442 ha, presentando un rendimiento promedio de 30.5 t ha^{-1} y un valor de producción de 13,987 millones de pesos. Por tanto, los estados con mayor producción son: en primer lugar, Sinaloa con 462,8462 t, seguido de Sonora con 307,895 t y tercer lugar Puebla con 50,225 t. En el estado de Sinaloa, el municipio de Ahome se ubica en el primer lugar con: 174,515 t, seguido de Guasave con 168,147 t y en Sonora, el municipio de Cajeme con 103,053 t (SIAP, 2020).

Sin embargo, existe mucha variación entre los países, en los cuales, algunos llegan alcanzar una producción de hasta 20 t ha^{-1} (SIAP, 2019). Con estos datos se infiere, que el rendimiento de producción puede estar determinado por diversos factores en el manejo del cultivo y principalmente a enfermedades y desordenes fisiológicos que afectan en el desarrollo de este cultivo, causando daños importantes, especialmente en los tubérculos (Herrera y Scott, 1993). Por todo esto, los síntomas más frecuentes de enfermedades que afectan al tubérculo son: agallas, manchas y pudriciones, principalmente; estos pueden ser ocasionados por hongos, bacterias, nematodos y virus (Fiers *et al.,* 2012).

En años recientes se ha presentado, síntomas en la superficie de tubérculos, en tallos y raíces, y los signos de la enfermedad consisten en un micelio en forma de abanico característicos de *Sclerotium rolfsii* (Roca *et al.,* 2016). *S. rolfsii* es un hongo necrotrófico facultativo del suelo,

con una alta capacidad de crecimiento saprofito; es considerado un patógeno de gran importancia económica en la agricultura, por su amplio rango de hospedantes, amplia distribución geográfica y su capacidad de persistir mediante la formación de esclerocios (Aycock, 1966; Punja, 1985 citado por Rabinal y Bhat, 2019).

Por consiguiente, se han realizado estudios para el control de esté patógeno; en los que se han determinado las dosis adecuadas de fungicidas para su control. También se ha recurrido a la aplicación de agentes de biocontrol, utilizando al hongo antagonista *Trichoderma* spp.; el cual ha mostrado eficacia en el control de la enfermedad (Guzmán *et al.*, 2014; Zúñiga y Ceja, 2017).

Martínez *et al.* (2020) realizaron un estudio en México, en el cual se utilizaron cepas de diferentes especies de *Trichoderma* contra el crecimiento micelial de *S. rolfsii*, resultando en una alternativa viable, *in vitro* e *in planta*, para el control de este fitopatógeno en garbanzo. Así como este estudio, existe también información sobre el uso del antagonista *Trichoderma* en diferentes cultivos. Sin embargo, no se ha realizado investigación en México sobre este patógeno en el cultivo de papa.

En años recientes, en el norte de Sinaloa, se han observado síntomas de podredumbre blanda en el cultivo de papa; sin embargo, como se comentó anteriormente, en México aún no se cuenta con estudios sobre la enfermedad en el cultivo de papa, por tanto, en el presente trabajo se obtuvo una alternativa de control biológico a mediano plazo, con eficiencia para el control hongo *S. rolfsii*. Dicha afirmación como alternativa de control biológico fue confirmada a través de los objetivos llevados en este proyecto de investigación; los cuales fueron la identificación morfológica y molecular de las especies de *Trichoderma* y *Sclerotium*, hongos nativos, que fueron aislados de suelos donde se siembra papa; la determinación de la patogenicidad de los aislados de *Sclerotium rolfsii* en tubérculos de papa de la variedad Fianna y, con la determinación de la inhibición *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii.*

II. JUSTIFICACIÓN

La podredumbre blanda, es la enfermedad es causada por el hongo *Sclerotium rolfsii*. Este hongo necrotrófico es considerado uno de los hongos más destructivos que habitan en el suelo, gracias a su capacidad de sobrevivir durante largo periodos de tiempo, en condiciones extremas y la amplia variedad de plantas a las que afecta. En Sinaloa, en los últimos años recientes, se ha observado la presencia de un micelio blanco aéreo en forma de abanico, acompañado de estructuras redondeadas circulares que van de color blanco a marrón oscuro en raíces, tallos y tubérculos de plantas de papa, provocando pudrición de tubérculos y muerte de las plantas. Estas afectaciones llegan a producir pérdidas en rendimiento, las cuales llegan a superar el 20%. Dichas perdidas se deben al desconocimiento de la ecología, epidemiología y medidas de control apropiadas para el manejo de la enfermedad, a causa de que no hay estudios sobre este fitopatógeno en el cultivo de papa. En este sentido, es fundamental establecer una alternativa de control biológico de este patógeno que sea amigable para el medio ambiente; por ello, en el presente estudio se determinó la efectividad inhibitoria de *Sclerotium rolfsii* con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. Las 25 cepas de *Trichoderma,* fueron colectadas de predios donde se estableció el cultivo de papa. En este estudio se generará conocimiento sobre la etiología de la enfermedad, así como la contribución de una estrategia de biocontrol con el uso del hongo antagonista *Trichoderma* como potencial agente que actúe de manera eficiente contra el *Sclerotium rolfsii.*

III. ANTECEDENTES

Daami-Remadi y colaboradores en 2010, realizaron un estudio en el cual se evaluó el desarrollo de *Sclerotium rolfsii* bajo diferentes condiciones térmicas *in vitro* e *in vivo* en tubérculos de papa variedad Spunta. Se obtuvo diferencias significativas en la tasa de crecimiento del patógeno, y se encontró que la temperatura óptima para su crecimiento era de 30-35°C en medio papa-dextrosa -agar (PDA), por otro lado, la penetración del patógeno fue de 1.5 a 2.5 mm, registrando la mayor temperatura a 35° C.

En 2017, García-Díaz y colaboradores realizaron un estudio *in vitro* en México, en el cual se realizaron pruebas de patogenicidad en tubérculos de papa con cepas del hongo *Sclerotium rolfsii*, confirmando el daño observado en campo.

En 2015, Jaklitsch y Voglmayr realizaron un estudio en Túnez África, en el cual utilizaron tres tipos de oligos par amplificar secuencias de las regiones Tef1 y RPB2 de 650 aislados de *Trichoderma* de Europa, con TEf1 se reconocieron 90 especies y RPB2 288 especies, resultado en el árbol filogenético más completo en la identificación de especies de *Trichoderma*.

Zúñiga y Ceja en el 2017, realizaron pruebas *in vitro* para evaluar la capacidad antagónica de una cepa de *Trichoderma* aislada de suelo en la Ciénega de Chapala, Michoacán, México, contra *Sclerotium cepivoru* y *Sclerotium rolfsii*, agentes casuales de la pudrición de la cebolla. También se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PRGI), obteniendo el 17.4% contra *S. rolfsii* y del 22.2% contra *S. cepivorum* después de 48 y 72 h, respectivamente. Por otra parte, *Trichoderma harzianum* obtuvo dos grados de antagonismo sobre *S. rolfsii*, en la escala de Bell. 1982. También, *T. harzianum* redujo ($P \leq 0.05$) 95% la producción de esclerocios de *S. cepivorum* y 78% el de *S. rolfsii*.

Se identificó el agente causal del tizón sureño en frutos de calabaza mediante análisis morfológico, patogénico y molecular (ITS1, ITS2) y evaluaron *in vitro*, cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo de *Sclerotium rolfsii* (Díaz-Nájera *et al*., 2018). En base en las características culturales y morfológicas, el patógeno se identificó como *Sclerotium rolfsii* Sacc, se caracterizó por una abundante producción de micelio aéreo algodonoso; crecimiento rápido de micelio aéreo, hifas septales, hialinas, ramificadas y de paredes delgadas, formando abundantes esclerocios marrón claro, 1.0-1.5 mm de diámetro, globosos a subglobosos, superficie lisa,

brillante y compactada (Watanabe, 2002; citado por Díaz-Nájera *et al.*, 2018). En las pruebas de patogenicidad, los síntomas de pudrición blanda aparecieron siete días después de la inoculación en los frutos maduros de calabaza, en los cuales se observó abundante micelio aéreo algodonoso blanco de consistencia acuosa. Los frutos testigo se mantuvieron sanos y el reaislamiento del hongo obtenido del tejido infectado de frutos inoculados presentó las mismas características morfológicas que los que se aislaron originalmente. Para la Identificación molecular, ellos obtuvieron una secuencia de 570 pb, mostrando un 100% de similitud con la región ITS, cuyo alineamiento coincidió con secuencias reportadas en el Gen Bank para *Athelia rolfsii* (anamorfo: *Sclerotium rolfsii* Sacc). Por último, en las pruebas manejo biológico y químico, la mayor inhibición de *S. rolfsii* fueron obtenidos por *Trichoderma virens* cepa G-41 (70.72%), *T. asperellum cepa* CSAEGro-1 (69%).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L*)*

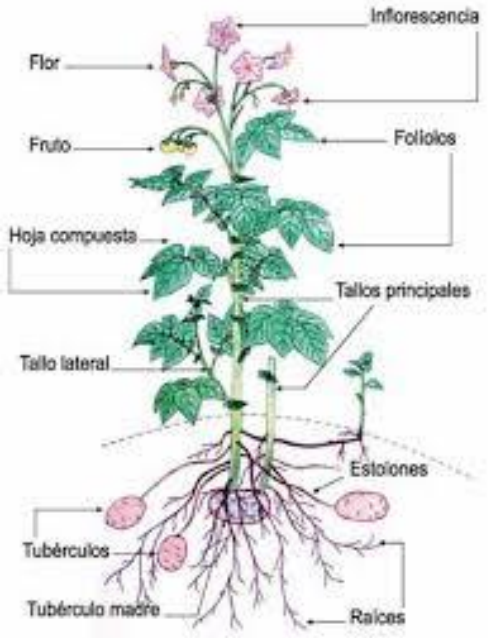

Figura 1. Planta de papa (Cortez y Hurtado, 2002).

La papa (*Solanum tuberosum)* es una planta herbácea anual, la cual varía en tamaños, logrando alcanzar una altura de hasta un metro (Spooner y Knapp, 2013). *S. tuberosum* pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate y la berenjena, comprende alrededor de 90 géneros y 2,800 especies. La planta produce tubérculos, los cuales ocupan el cuarto lugar a nivel mundial en su importancia como alimento, después del maíz, el trigo y el arroz (FAO, 2008). También produce rizomas o estolones, los cuales tienen hojas rudimentarias (Vreugdenhil *et al.*, 2007).

La papa es una planta de clima templado-frío, siendo las temperaturas más favorables para su cultivo las que están en torno a 13 y 18° C. Al efectuar la plantación la temperatura del suelo debe ser superior a los 7° C, con unas temperaturas nocturnas relativamente frescas. El frío en exceso causa problemas en el cultivo, ya que los tubérculos no se desarrollan. Por el contrario, cuando la temperatura es alta, favorece el desarrollo de plagas y enfermedades (Román y Hurtado, 2002). Fluctúa en los suelos semiligeros y arcillosos. Es tolerante a la salinidad. También la luz juega un papel muy importante, ya que el fotoperiodo es el que induce la tuberización (Román y Hurtado, 2002).

4.1.1. Origen

El origen de la papa remonta aproximadamente a unos 800 años en la cordillera de los Andes. Fue aquí, donde los agricultores seleccionaron y mejoraron las primeras variedades de papa, de las 200 especies de tubérculos silvestres que existen en el Continente Americano.

Figura 2. Origen de la papa. Cordillera de los Andes.

La papa (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia de las solanáceas, de la cual derivan alrededor de 90 géneros y unas 2800 especies (FAO, 2008).

4.1.2. Descripción botánica

El sistema de tallos de la papa se compone de tallo, tubérculos y estolones. El color del tallo varía de verde, marrón a rojizo. Las plantas de papa provienen de semillas verdaderas o tubérculos-semilla (INIA, 2002; CIP, 1984). Los tubérculos son los órganos comestibles de la planta y son tallos modificados. Las hojas compuestas de la planta producen almidón, este se desplaza hacia la parte final de los estolones subterráneos, como consecuencia de esto ocurre un engrosamiento y originan a los tubérculos. Al termina el periodo de crecimiento, las hojas y los tallos comienzan a marchitarse, y a su vez se desprenden los tubérculos de los estolones (FAO, 2008).

4.1.3. Clasificación taxonómica

Cuadro 1. Posición taxonómica de *Solanum tuberosum* L. (APG IV, 2021).

Reino:	**Plantae (plantas)**
Filo	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Subfamilia:	Solanoideae
Género:	*Solanum*
Especie:	*tuberosum* L.

4.1.4. Producción mundial

La papa ocupa el cuarto lugar de producción a nivel mundial, considerándose uno de los cultivos alimenticios de las hortalizas más importantes y ampliamente cultivadas, cuenta con una superficie sembrada de 29,024 ha, 28,718 ha en superficie cosechada, una producción obtenida de 921,206 t y un rendimiento 32.078 t ha^{-1} (SIAP, 2020). Del campo mexicano se obtienen cinco de cada mil toneladas del volumen mundial de papa (FAO, 2018). En el año 2019, se reportó, para México, una producción de: 1,783,896 t, una superficie cosechada de: 58,442 ha, con un rendimiento: 30.5 t ha^{-1} y un valor de producción de: 13,987 millones de pesos (SIAP, 2019). En el año 2019, la SIAP reportó a Sinaloa en segundo lugar (366,385 t) en producción obtenida, después de Sonora (469,379 t) y Puebla se ubicó en el tercer lugar (182,601 t), Sonora se ubicó también en primer lugar, en superficie cosechada, con 12,941 ha. Sinaloa en segundo lugar con 12,203 ha. y Puebla con 7,392 ha. según la SIAP en 2019. En rendimiento promedio de t ha^{-1}, Sinaloa en el año 2019, se ubicó en el lugar número diez de los principales estados productores de papa en México, con 30.0 t ha^{-1}. En Sinaloa, la superficie sembrada hasta julio del 2020 es de: 13,250 ha. Con una superficie cosechada de: 13,208 ha. Producción: 462,462 t y un rendimiento de: 35.014 t ha^{-1} (SIAP, 2020).

El consumo del tubérculo de papa se ha extendido por todo el mundo, principalmente: Asia, Norteamérica y Latinoamérica, originando nuevos mercados, elevando la producción e

intensificando el procesamiento para obtener nuevos productos derivados (Sabbagh-Sánchez *et al.*, 2011).

4.2. Principales patógenos que afectan al cultivo de la papa

Se han reportado diversas enfermedades y desordenes fisiológicos que afectan a este cultivo, causando daños importantes, especialmente en los tubérculos (Herrera y Scott, 1993). De los síntomas más comunes de las enfermedades que afectan tubérculos se identifican: agallas, manchas y pudriciones, principalmente; estos pueden ser ocasionados por hongos, bacterias, nematodos y virus (Fiers *et al*., 2012).

4.2.1. Bacterias

Entre las principales bacterias reportadas por diferentes investigadores las cuales afectan el cultivo de papa se encuentran:

- Complejo de especies del género *Pectobacterium*, el cual causa podredumbre blanda de los tubérculos y pie negro (Andrade-Bolaños *et al.*, 2019).
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* (Castañón-Viveros *et al.*, 2019).
- *Streptomyces* spp., causante de la roña común de la papa (Sarwar *et al.*, 2018).

4.2.2. Virus

La papa, en ocasiones se puede ver afectada por distintos virus, los cuales llegan a reducir tanto el rendimiento, como la calidad de los tubérculos. Entre algunos de los virus que se presentan en este cultivo, podemos encontrar a:

- *Potato mop top virus* (PMTV): virus transmitido de tubérculos semilla a las plantas hijas, causa disminución del rendimiento y afecta la calidad del tubérculo (Hooker, 1980; Nie *et al.*, 2021).
- *Potato x* virus (PVX); *Potato y* virus (PVY) (Qaim, 1999; Mamun-Or *et al.*, 2021).

4.2.3. Nematodos

Los nematodos son causantes de marchitez y retraso en el crecimiento de las plantas, ya que provocan un mal desarrollo de la raíz y dan muerte temprana. Algunos de los nematodos que causan perdidas en el cultivo de papa, se encuentran:

- *Globodera pallida:* es el nematodo enquistador blanco de la papa (CABI, 2000).
- *Globodera rostochiensis:* nematodo dorado de la papa, es un endoparásito sedentario que provoca daño principalmente en las raíces (Núñez *et al.*, 2003).
- *Meloidogyne chitwoodi:* produce necrosis interna y agallamiento externo (EPPO, 2004).

4.2.4. Hongos y oomicetes

Los hongos y oomicetes son unos de los principales organismos que causan grandes pérdidas en el cultivo de papa, gracias a su gran variedad de síntomas. Entre los principales que afectan el cultivo se encuentran:

- *Fusarium* spp.*:* causa la pudrición de raíz y tallo en el cultivo de papa o podredumbre seca (Mejdoub-Trabelsi *et al.,* 2019).
- *Rhizoctonia solani*: causa la enfermedad conocida como costra negra o caspa negra de la papa, la cual ocasiona daños en tallos, raíces, estolones y tubérculos subterráneos (Al-Abedy *et al.,* 2018).
- *Alternaria* spp.: causante del tizón temprano que ataca al follaje y tubérculo (Ding *et al.,* 2019).
- *Colletotrichum coccodes:* es causante del punto negro de la papa, es una enfermedad común en varias de las principales regiones productoras de papa en todo el mundo (Stevenson *et al.,* 2001).
- *Phytophthora infestans:* oomicete causante del tizón tardío, es de las enfermedades más costosa y devastadora de la papa en el mundo (Salaman y Burton, 1985; Xiaoqing *et al.,* 2021).

4.3. *Sclerotium rolfsii*

4.3.1. Generalidades de *S. rolfsii*

Descrito por primera vez por Peter Henry Rolfs en 1893 en tomate (*Solanum lycopersicum* L.); sin embargo, la primera descripción del hongo no fue reconocida, fue hasta 1911 por Saccardo, cuando se le asignó el nombre de *Sclerotium rolfsii*, reconociendo así los trabajos anteriores llevados a cabo por Rolfs. Es un hongo de suelo necrotrófico, con gran capacidad de crecimiento saprofítico, debido en parte a su alta tasa de crecimiento y la producción de ácido oxálico y degradación de la pared celular. Es agente causal de enfermedades de importancia en la agricultura, por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para combatirlas eficientemente (Punja, 1985). Cuenta con un amplio rango de hospedantes, Hall en 1991 informó que *S. rolfsii* infecta a más de 500 especies de plantas.

Produce estructuras de resistencia llamadas esclerocios, los cuales se desarrollan en grandes cantidades y pueden sobrevivir hasta por cinco años en el suelo en condiciones adversas (Punja, 1996).

En México *S. rolfsii* se ha encontrado atacando en diversos cultivos, como: cebolla, manzano, frijol, jitomate, entre otros (Ortega, 2010; Hernández *et al.*, 2004).

4.3.2. Clasificación taxonómica de *Sclerotium rolfsii*

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Sclerotium rolfsii* (NCBI, 2021).

Reino:	Fungi
División:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Orden:	Atheliales
Familia:	Atheliaceae
Género:	*Sclerotium*
Especie:	*Sclerotium rolfsii (Athelia rolfsii)*

4.3.3. Descripción morfológica de *Sclerotium rolfsii*

La fase sexual o teleomorfo de *S. rolfsii* es *Athelia rolfs*ii. El micelio forma rizomorfos expandiéndose en forma abanicada de color blanco. Sus hifas pueden ser de dos tipos: los

principales que son grandes, en comparación con otros hongos, tienen paredes delgadas, son hialinas y tienen conexiones en forma de gancho a nivel de las septas llamadas también fíbulas, características que permiten identificar esta especie. Las otras hifas consideradas como alimentadoras, son las que llevan a cabo la penetración en los tejidos de las plantas (Barnett y Barry, 1987).

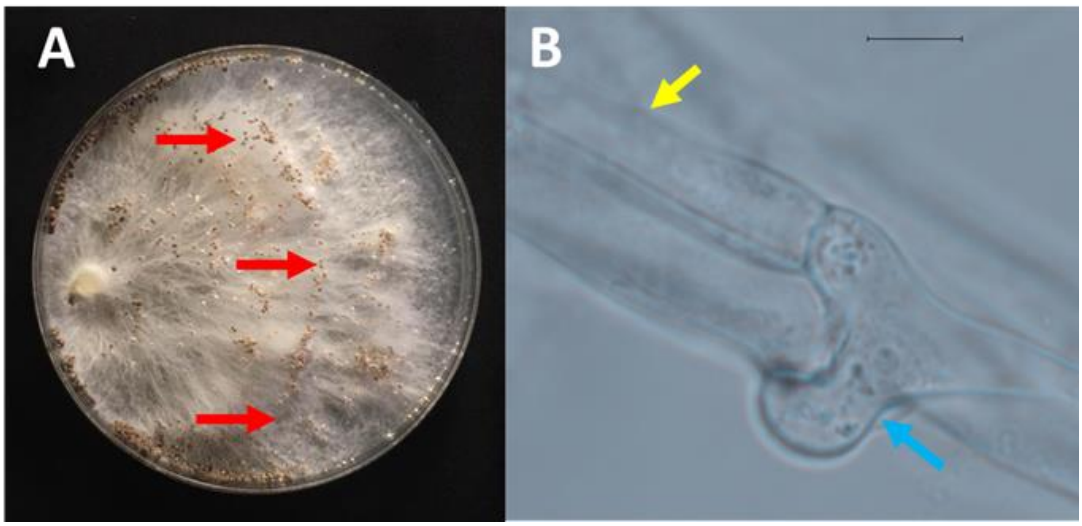

Figura 3. Características morfológicas de *Sclerotium rolfsii* (SrP17). (A) Morfología colonial en medio PDAA, y esclerocios (flechas rojas); (B) Hifa hialina (flecha amarilla), y fíbulas (flecha azul) (100x). Escala: (B= 50 µm) (Imagen propiedad del autor).

La prevalencia de *S. rolfsii* en regiones cálidas del mundo, depende en gran medida de las altas temperaturas para su desarrollo y la producción de esclerocios. El rango de temperatura para el crecimiento máximo del hongo y la formación de esclerocios ocurren de 27-30°C (Aycock, 1966; Mathur *et al.*, 1977).

Los esclerocios son considerados como las estructuras de resistencia de este hongo (Willetts, 1972). Los rizomorfos se entrecruzan y comienzan a formar los esclerocios esféricos, aperlados que se tornan color café oscuro cuando maduran. Los esclerocios llegan a medir hasta 10 mm de diámetro; pero por lo general se encuentran en rangos de 0.5 a 2.0 mm de diámetro (Singh y Dwivedi, 1991). Durante la iniciación de la formación del esclerocio y su desarrollo, cultivado en medio artificial, se producen gotas de exudado, las cuales están compuestas de cationes, proteínas, carbohidratos, aminoácidos, enzimas y ácido oxálico (Christias, 1980). Los esclerocios maduros se componen de una corteza exterior melanizada (Chet y Henis, 1968). Los esclerocios maduros se componen de aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y lípidos (Chet *et*

al., 1967). Coley-Smith y Cooke, (1971) informaron, que el esclerocio de *S. rolfsii* puede sobrevivir hasta cinco años. Se han descrito por Punja y Grogran, (1981), dos formas de germinación: hifal y eruptivo. La germinación hifal se caracteriza por el crecimiento de micelio (hifas) de la superficie del esclerocio, su crecimiento no es extenso a menos que una fuente externa de nutrientes estén disponibles. Por otro lado, la germinación eruptiva se caracteriza por agregados de micelio que estallan a través de la corteza esclerótica, estos solo germinan eruptivamente una vez, ya que los materiales almacenados internos se utilizan durante el crecimiento del micelio. La corteza es todo lo que queda después de la germinación eruptiva (Punja y Grogran, 1981).

4.3.4. Ciclo de la enfermedad de *Sclerotium rolfsii*

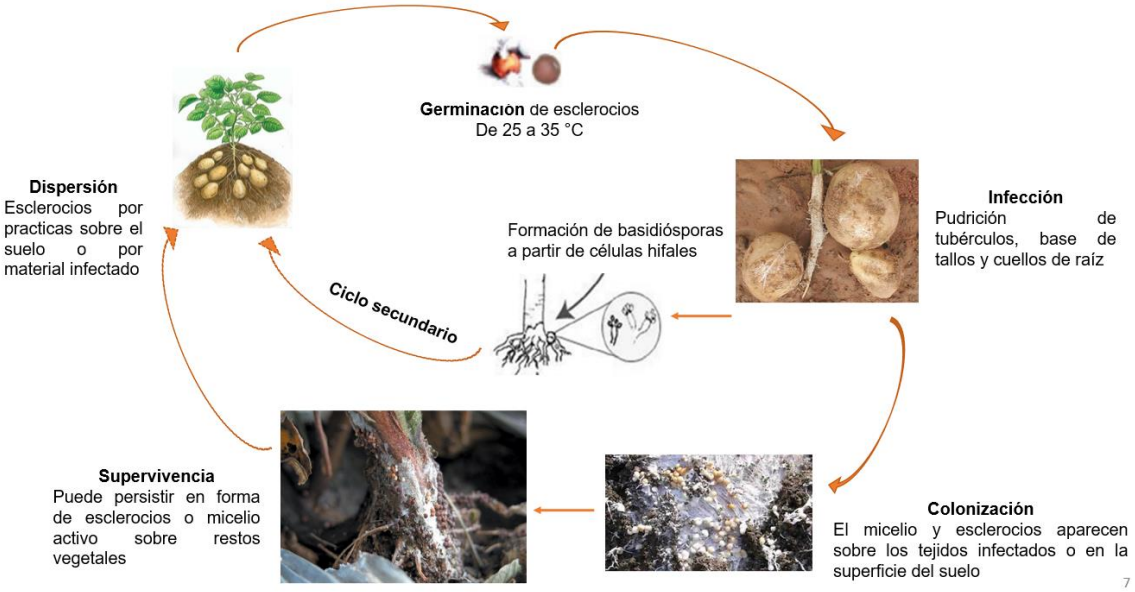

Figura 4. Ciclo de la pudrición blanda de la papa causada por *S. rolfsii* (teleomorfo: *Athelia rolfsii)* en planta de manzana (los síntomas son similares en diferentes cultivos) (Aycock, 1966).

En Sinaloa, después de sobrevivir el verano, el crecimiento de hifas de *S. rolfsii* se reanuda a partir de tejidos infectados y esclerocios en germinación. Se produce una penetración directa cuando las hifas entran en contacto con tejidos susceptibles como: corona, raíces, bulbos, frutos u hojas, sin embargo, las heridas le facilitan la penetración. La infección de los tallos inferiores, raíces, bulbos, frutos y hojas puede ocurrir si el tejido es susceptible y si la temperatura, la

humedad y otros factores ambientales son favorables. Las hifas pueden ser intracelulares o intercelulares. El hongo produce ácido oxálico y celulasa, los cuales actúan para provocar la separación y muerte de las células. Los síntomas de podredumbre blanda se presentan de dos a cuatro días después de la infección. Cuando la parte inferior del tronco o el tallo están rodeados por el hongo resultan la marchitez del follaje, la muerte regresiva de las ramas y la muerte completa de la planta (Mullen, 2001). Se producen ciclos secundarios y la enfermedad se propaga cuando las hifas entran en contacto con nuevos tejidos sanos susceptibles cuando prevalecen las temperaturas cálidas a altas y las condiciones húmedas durante la temporada de crecimiento. Además, la producción de basidiósporas puede contribuir a los ciclos secundarios (Figura 4). El hongo pasa el verano como esclerocios y micelio en plantas infectadas y restos de plantas y, a veces, como capas de himen en desarrollo. La mayoría de los esclerocios se producen en o cerca de la superficie del suelo y sobreviven más tiempo en suelos bien drenados (Aycock, 1966).

En la papa, los tubérculos son infectados sobre todo a partir del estolón y el hongo continúa su crecimiento sobre la superficie. Los ataques más graves suceden al final de la cosecha y la enfermedad puede continuar su desarrollo durante su manipulación y transporte (Aycock, 1966).

4.3.5. Síntomas en papa causado por *Sclerotium rolfsii*

Sclerotium rolfsii produce en las plantas de papa, lesiones de color marrón oscuro, las cuales aparecen en el tallo, justo debajo de la superficie del suelo, seguido se produce un amarillamiento y marchitamiento de las hojas inferiores y por consecuencia el secado de toda la planta. Se presenta una capa de micelio blanco, rodeando la parte basal del tallo y raíces, y en el suelo esclerocios (Khanna y Jyotsana, 1993).

Posteriormente, los tubérculos se infectan, se producen hundimientos en las lesiones y se pudren en el campo (Figura 5) (Kulkarni *et al.,* 1995).

Figura 5. Tubérculo de papa con lesiones causadas por *S. rolfsii*

4.3.6. Métodos de control de *Sclerotium rolfsii*

4.3.6.1. Control químico

El uso de fungicidas se ha convertido en un método inevitable en el manejo de las enfermedades en las plantas, particularmente en papa, esto a causa de la ausencia de disponibilidad de variedades resistentes a *Sclerotium rolfsii*. Algunos fungicidas efectivos contra este patógeno son: Carboxin, Carbendazim + Mancozeb, Tridemefon y Propiconazole (Nargund, 1981; Kulkarni *et al.*, 1986; Wakil y Gohim, 2000).

Los fungicidas utilizados contra las enfermedades del suelo son costosos, son tóxicos al ambiente por ello se buscan alternativas más viables y amigables con el medio ambiente.

4.3.6.2. Control cultural

Debido a que no existen variedades de papa resistentes a este patógeno se han desarrollado alternativas para el manejo de la enfermedad causada por *Sclerotium rolfsii*, con frecuencia se ha informado el uso de extractos de plantas, las cuales poseen propiedades inhibidoras contra organismo patógenos. Los derivados de origen vegetal son ecológicos, rentables, biodegradables y de fácil acceso junto con muchas ventajas adicionales para adaptarse a la agricultura de base orgánica (Kulkarni, 2007). Se han realizado estudios algunos sobre el efecto de extractos para el manejo de este patógeno, entre ellos; *Clerodendrum inerme*, *Datura stramonium*, *Vincarosea* (Narain y Satpathi, 1977), extracto de agua de hojas de *Eucalyptus rostrataf (*Ismail *et al*., 1989), extractos de hojas de *Azadirachta indica*, *Eucalyptus* spp.

(Sarvamangala *et al.*, 1993), *Agave americana*, *Clerodendron inerme, Cassia occidentalis, Ocimumsanctum, Eupatorium odoratum, Eucalyptus tereticornis y Azadirachta indica* (Seshar kiran, 2002).

La rotación de cultivos es una de las prácticas económicas y ecológicas la cual ayuda a reducir la incidencia de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 1991). Esta operación tiene efecto sobre la eliminación de patógenos en ausencia de un hospedante. Se han probado diferentes cultivos como rotación con papa: sorgo, cacahuate, algodón y soya (Chima-Wokocha, 1988; Rodríguez *et al.*, 1991).

4.3.6.3. Control biológico

El uso de materia orgánica (enmiendas orgánicas) para controlar las enfermedades de las plantas es un medio potencial con un enfoque indirecto para controlar el patógeno. No sólo reducen la intensidad de la enfermedad, sino que también aumentan los antagonistas, la fertilidad del suelo y el rendimiento de los cultivos en un grado considerable (Kulkarni, 2007). Algunas de las cuales han presentado una eficacia sobre este patógeno son: composta (Danon *et al.*, 2007), enmiendas orgánicas (Flores-Moctezuma *et al.*, 2007), extractos de neem, mostaza y haba de la India (Lahre *et al.*, 2012).

Otra alternativa de manejo ideal, barato, duradero y no contaminante es el método biológico. Hoy en día se ha puesto a prueba en numerosas ocasiones al antagonista fúngico *Trichoderma* spp. el cual logra tener una inhibición exitosa contra *S. rolfsii* (Pushpavathi y Rao, 1998; Iqbal *et al*., 1995; Amna *et al.*, 2020).

4.4. *Trichoderma* spp.

4.4.1. Generalidades de *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* según Infante *et al*. (2009) se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, misma que son capaces de descomponer y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica.

El género *Trichoderma* es un excelente controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2001).

4.4.2. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp.

Cuadro 3. Ubicación taxonómica de *Trichoderma* (NCBI, 2021).

Reino:	Fungí
Filo:	Ascomycota
División:	Mycota
Subdivisión:	Eumycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	*Trichoderma*

4.4.3. Morfología de *Trichoderma* spp.

Rifai, (1969), menciona qué, morfológicamente, la mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco o amarillo, que se tornan a verde oscuro, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, los conidióforos son ramificados y se presentan como penachos compactados, terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios (Harman, 2003).

4.4.4. Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Se han descrito diferentes mecanismos de acción en organismos del género *Trichoderma,* que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre éstos, se encuentra la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo, 2001). Otros autores sugieren mecanismos que incluyen además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Haram *et al*., 1996; Zimand *et al*., 1996).

Trichoderma también presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora se da de forma indirecta, como la inducción de mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Harman *et al*., 2004).

4.4.4.1. Competencia

La competencia se define la interacción entre dos o más organismos, ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes, luz), resultando en la reducción de la cantidad o espacio para algunos de ellos. Las características que favorecen al agente control biológico son la plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Hjeljord y Tronsomo, 1998; Ahmad y Baker, 1987).

4.4.4.2. Micoparasitismo

El parasitismo o micoparasitismo se puede definir como una oposición entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos (Díaz, 1994). Por ser un proceso complejo, se ha separado en cuatro etapas:

a) Crecimiento quimiotrófico

También llamado quimiotropismo positivo, se define como el desarrollo directo hacia un estímulo químico. Se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectar a otro organismo a distancia, direccionando su crecimiento hacia el patógeno como respuesta a un estímulo químico (Chet, 1998).

b) Reconocimiento

El reconocimiento se realiza con la interacción entre lectinas y carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares, las cuales unen a las células (Chet *et al.*, 1998).

c) Adhesión y enrollamiento

Cuando el reconocimiento resulta positivo, las hifas de *Trichoderma* se adhieren o enrollan a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios y

secreción de enzimas (Pérez, 2004). La adhesión y enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* se lleva a cabo por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno (Elad y Chet, 1983).

d) Actividad lítica

En la actividad lítica se lleva a cabo la producción de enzimas líticas extracelulares; tales como quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales degradan las paredes celulares del hospedante para que ocurra la penetración de *Trichoderma* (Haram *et al.*, 1996).

4.4.4.3. Antibiosis

La antibiosis es la secreción de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo. Sin embargo, existe la posibilidad de formación de cepas del patógeno con resistencia a estos (Vero *et al*., 1999).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos sin necesidad de interacción (Hjeljord y Tronsomo, 1998).

V. HIPÓTESIS

En el suelo donde se produce papa hay al menos una especie de *Trichoderma* que inhibe *in vitro* significativamente el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii*.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Identificar morfológica y molecularmente especies de *Trichoderma* y *Sclerotium rolfsii* y evaluar la inhibición *in vitro* de aislados de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium rolfsii* obtenido de predios donde se estableció papa (*Solanum tuberosum*) en Sinaloa.

6.2. Objetivos específicos

- Identificar morfológica y molecularmente aislados de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii* de predios donde se estableció el cultivo de papa del estado de Sinaloa.
- Determinar la patogenicidad y virulencia de aislados de *S. rolfsii* en tubérculos de papa, en condiciones en condiciones de laboratorio.
- Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en diferentes predios de papa del norte de Sinaloa, México, el cual comprende un clima cálido subhúmedo, con temperaturas mínimas promedio de 10.5 ° y las máximas promedio de 36 °C. Las lluvias se presentan principalmente en verano: con una precipitación anual media de 790 mm (INEGI, 2020).

El proceso experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte (JLSVVF), ubicado en la carretera Los Mochis-Ahome Km. 9. Municipio de Ahome.

Figura 6. Ubicación geográfica de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte.

7.2. Muestreo de suelos

Las muestras de suelo del presente estudio se colectaron de 48 predios donde se produjo papa en el estado de Sinaloa, en los ciclos agrícolas otoño-invierno (O-I) 2019-2020 y 2020-2021.

La colecta de cada muestra consistió en tomar cinco submuestras de 500 g de suelo; las cuales se colectaron por el método de cinco de oro (al azar) en predios de 10 hectáreas; en cada punto de muestreo del lote se excavó a una profundidad de 5-30 cm; las submuestras se colocaron en un recipiente; estas se homogenizaron, para posteriormente tomar una muestra representativa

de 1 kg. Por último, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte para su posterior análisis.

7.3. Obtención y purificación de cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de suelos

Para la obtención de cultivos puros de *Trichoderma* a partir de la muestra de suelo de cada uno de los predios muestreados, se colocaron 100 g de suelo sobre una charola y se dejó secar a la sombra y a temperatura ambiente.

Posteriormente, de cada muestra se pesó 0.5 g en una balanza analítica (Ohaus Pioneer); enseguida se espolvorearon sobre la superficie de una caja Petri de 90 cm de diámetro con medio de cultivo PDAA (Agar Dextrosa Papa, acidificado con ácido tartárico al 10 %) (anexo 4 y 5). Por último, las cajas Petri se incubaron de seis a 10 días a 28°C (incubadora Yamato IN804). Cada muestra se procesó por triplicado.

Las esporas de las colonias típicas de *Trichoderma* spp. se tomaron con una aguja estéril. Esta se sumergió en un tubo Eppendorf, con 1 ml de agua destilada estéril; la suspensión de esporas se homogenizó con un vortex (select Bioproduct) y se realizaron diluciones seriales de esta, la cual consistió en transferir transfiriendo 100 µl de la muestra a otro tubo con 900 µl de agua destilada estéril de manera consecutiva hasta 10^{-4}.

Posteriormente, de cada una de las diluciones obtenidas se tomaron 100 µl con una micropipeta (Eppendorf Research) y se colocaron en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo PDAA, para esto se utilizó el método de siembra extensión en caja. Finalmente, las cajas Petri se incubaron a 27 °C por 24 horas (incubadora Yamato IN804). Transcurrido el tiempo, se tomó una espora germinada con un bisturí estéril y se transfirió al medio de cultivo ya descrito. Todos estos procedimientos se realizaron en condiciones asépticas, en campana de flujo laminar (ESCO Airstream vertical).

7.3.1. Aislamiento y purificación de aislados de *Sclerotium rolfsii* provenientes de suelo

Los esclerocios se extrajeron de las muestras de suelo, utilizando la técnica de flotador de Fenwick (Van Bezooijen, 2006). Se pesaron 500 g de muestra de suelo seco de cada predio y se

colocaron sobre el flotador en un tamiz número 20 (850 µm), en la salida de agua se colocó un tamiz número 60 (250 µm), esto para eliminar residuos vegetales y lograr la captura de esclerocios. Posteriormente se le agregó agua de llave a flujo constante sobre el suelo y el tamiz, hasta que filtró en su totalidad, reteniendo en los tamices los esclerocios. Después, los tamices se lavaron con abundante agua corriente y se colocó el material en papel absorbente, durante 24 horas a temperatura ambiente y a la sombra. Transcurrido ese tiempo se procedió a la observación bajo el microscopio estereoscópico (SteREO Discovery.V20), se colectaron los esclerocios con una pinza de punta fina y se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1 ml. etiquetados para cada muestra.

Los esclerocios obtenidos de cada muestra de suelo, se desinfectaron sumergiéndose en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (anexo 1) por un minuto; enseguida se realizaron tres lavados de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente estéril y se dejaron secar en una campana de flujo laminar (ESCO Airstream vertical) a temperatura ambiente por 20 minutos. Los esclerocios desinfectados con hipoclorito de sodio y secos se sembraron en medio de cultivo PDAA; las cajas se incubaron a 28 °C (24 a 48 horas) (incubadora Yamato IN804). Una vez germinados los esclerocios con morfología distintas, se tomó el micelio del punto de crecimiento de la colonia con un sacabocado de 3 mm, y se trasfirió al centro de otra caja Petri con medio PDAA y se incubaron a 27 °C durante 7-10 días (incubadora Yamato IN804).

7.4. Identificación de *Trichoderma* spp. mediante caracterización morfológica

De cada aislado se tomó un disco de micelio de 5 mm de diámetro y se colocó al borde de la caja Petri de 90 cm de diámetro con medio PDAA, medio SNA (modificado por Nirenberg, 1976) (anexo 14), y medio Cornmeal dextrosa agar (anexo 13). Para esto, se realizaron tres repeticiones. Seguido, se incubaron durante una semana (para las características macroscópicas y microscópicas) a 25º C, 12 h oscuridad y 12 horas de luz fluorescente blanca fría (cámara bioclimática Thermoscientif).

En cuanto a la tasa de crecimiento, se midió el crecimiento de la colonia cada 24 horas, hasta que llenaron la caja. El crecimiento se midió desde el borde del disco de inóculo hasta el punto más distante de la colonia. Para determinar la tasa de desarrollo micelial utilizó la siguiente formula:

TC= (Crecimiento final– Crecimiento inicial) /tiempo de incubación

Por otro lado, en la descripción de las características macroscópicas y microscópicas se utilizaron las colonias desarrolladas en medio de cultivo SNA y Cornmeal dextrosa agar. De SNA se tomó de la colonia: el color al frente, reverso, tipo de borde, color de hifa, tamaño de las pústulas, tipo de desarrollo y color del micelio. En cuanto al medio Cornmeal dextrosa agar se tomó: la forma del conidióforo, posición de la clamidospora, forma y tamaño de fiálides y conidios. El tamaño y la forma de las fiálides y conidios se midieron de 30 estructuras por aislado. Estos fueron observados al microscopio con el objetivo 100X (Axio Imager M2) con la técnica de cinta adhesiva y glicerina (Gary and Prakash, 2015).

7.5. Identificación morfológica de *Sclerotium rolfsii*

Se utilizaron colonias de tres días de crecimiento, de las cuales se tomó un disco de micelio de 5 mm de diámetro y se colocó en el centro de una caja de 90 cm de diámetro con medio PDAA, esto se realizó tres veces para cada cepa. Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C (incubadora Yamato IN804) hasta que el crecimiento del hongo llenó la caja Petri (5-7 días).

En relación al crecimiento radial fue medido diariamente, a partir del segundo día de incubación para calcular, al final del experimento, la tasa de crecimiento (sección 7.4).

Para esto, se tomó el diámetro de la colonia (largo y ancho), en líneas perpendiculares dibujadas en la parte inferior de cada caja de Petri. La última medición de cada cepa se realizó cuando el crecimiento micelial del hongo cubrió totalmente la superficie del medio de cultivo contenido en la caja de Petri (Guigón *et al.*, 2010).

Las características de los esclerocios como lo es: color y número promedio de esclerocios se obtuvo contando el total de estos sobre el medio de cultivo PDAA contenido en la caja Petri. Alternativamente, se midió el tamaño de 30 esclerocios por caja Petri (tres repeticiones) (Prasad *et al.*, 2012).

7.6. Identificación molecular de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii*

7.6.1. Extracción de ADN por el método CTAB

Para la extracción de ADN las cepas *Sclerotium* spp. y *Trichoderma* spp. Estas se reactivaron en el medio de cultivo PDAA. Para realizar esto se colocaron de manera individual tres discos de las colonias de cada cepa de ambos hongos en 25 ml de caldo nutritivo (anexo 3) contenidos en tubos Falcon. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación constante durante cinco días a 150 r.p.m. Posteriormente se pesó 100 mg de micelio y se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml, a los cual se les agregó 1500 µL de buffer de extracción CTAB al 2% (anexo 6), se maceró con un pistilo estéril hasta obtener una masa pastosa, y se agitaron para homogenizar. Los tubos se colocaron en un horno (SheLab) a 70 °C por 5 min. Transcurrido el tiempo, estos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó 500 µL de cloroformo y agitaron por inversión; después, se procedió a centrifugar (Eppendorf 5415R) a 13000 r.p.m. durante 5 min. Sin tocar la fase intermedia, se transfirió el sobrenadante a tubos limpios de 1.6 ml, se adicionó 500 µL de etanol absoluto, se agitaron y se centrifugaron a 13000 rpm por 3 min. Se decantó el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla. Se agregaron 300 µL de etanol al 70% (anexo 2), se agitaron y centrifugaron a 13000 rpm por 3 min. De nuevo se descantó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar las pastillas a temperatura ambiente y eludió con 50 µL de agua ultrapura (Invitrogen), agregando 2 µL de RNAasa (Promega).

La presencia e integridad de ADN genómico, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (anexo 9), observando las bandas en un fotodocumentador (BioRad). La concentración y calidad de ADN se determinó en un NanoDrop One Thermo Scientific.

7.6.2. Amplificación y secuenciación de la región RPB2 para *Trichoderma* spp.

Se procedió a la estandarización y amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para *Trichoderma* se utilizaron los oligos: fRPB2-5F (5’-GA(T/C) GA(T/C) (A/C) G(A/T) GATCA(T/C) T T(T/C) GG-3’), and fRPB2-7cR (5’-CCCAT(A/G) GCTTG(T/C) TT(A/G) CCCAT-3’) (Liu *et al.,* 1999), para amplificar un fragmento de 1100 ± pb de la subunidad de ARN polimerasa II (RPB2) (Chaverril *et al.,* 2003).

Con respecto a la mezcla de la reacción, fue de 25 µl, conteniendo 1X de buffer, 0.2 µg/µl de BSA, 0.2 mM de dNTP´s, 1.5 mM de MgCl2, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 0.1 U/µl de Gotaq flexi polimerasa (Promega) y 50 ng de DNA, el volumen final se ajustó con agua.

En cuanto a las condiciones de corrida fueron: la amplificación comprendió una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineamiento a 54 °C por 40 seg y extensión a 72 °C por 45 seg seguidos de una extensión final a 72 °C por cinco min. Termociclador Bio-Rad C100 CFX96. Para visualizar los productos de la PCR generados, se utilizaron 5µl de producto de reacción y 2 µl 1X de buffer de carga (Promega) adicionado con GelRed (Biotium), estos se cargaron en gel de agarosa al 1.5% (anexo 10). Para determinar el tamaño aproximado de los fragmentos, se utilizó el marcador de peso molecular 1,000 pb (Invitrogen), el gel se expuso a 90 Volts durante 60 min. Los fragmentos amplificados fueron observados por exposición a luz ultravioleta y se fotografiaron en un fotodocumentador (Quantity One de BIORAD). Posteriormente se cuantificó la calidad y cantidad del producto final de ADN en un NanoDrop One Thermo scientific y se secuenció en la compañía Macrogen Korea. Las secuencias obtenidas se compararon con bases de datos del sitio del Genbank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), colocando cada una de ellas en el programa BLAST-N. Por último, los análisis de secuencia y filogenia se realizaron utilizando el software de análisis de genética evolutiva molecular MEGA X. Después se alinearon en MUSCLE y el árbol filogenético se realizó con el método de unión de vecino, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta.

7.6.3. Amplificación y secuenciación de la región ITS para *Sclerotium rolfsii*

Para amplificar la región ITS de *Sclerotium* se utilizaron los iniciadores generales para hongos: ITS1 (5´TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3´) e ITS4 (5´TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´) (White *et al.*, 1990) los cuales amplifican un fragmento de 670 ± pb del Espaciador Transcrito Interno (ITS, Internal Transcribed Spacer).

La mezcla de reacción para cada muestra fue de 25 µl, conteniendo 1X de buffer, 0.2 µg/µl de BSA, 0.2 mM de dNTP´s, 1.5 mM de MgCl2, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 0.1U/µl de Taq polimerasa (Promega) y 50 ng de DNA, el volumen final se ajustó con agua.

En cuanto a las condiciones de corrida del programa fueron: la amplificación comprendió una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineamiento a 57 °C por 40 seg y extensión a 72 °C por 45 seg seguidos de una extensión final a 72°C por cinco min. Termociclador Bio-Rad C100 CFX96.

Por otro lado, se utilizaron 5µl de producto de reacción y 1X de buffer de carga (Promega), para realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para determinar el tamaño aproximado de los fragmentos, se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp (Promega), el gel se expuso a 90 Volts durante 60 min. Los fragmentos amplificados fueron observados por exposición a luz ultravioleta y se fotografiaron utilizando un fotodocumentador (Quantity One de BIORAD).

Posteriormente se cuantificó la calidad y cantidad del producto final de ADN en un NanoDrop One Thermo scientific y se secuenció en la compañía Macrogen Korea. Las secuencias obtenidas se compararon con bases de datos del sitio del Genbank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), colocando cada una de ellas en el programa BLAST-N.

Por último, los análisis de secuencia y filogenia se realizaron utilizando el software de análisis de genética evolutiva molecular MEGA X. Se alinearon en MUSCLE y el árbol filogenético se realizó con el método de unión de vecino, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta.

7.7. Patogenicidad de *Sclerotium rolfsii* en tubérculos de papa

Se reactivaron las cepas de *Sclerotium rolfsii*, sembrando en medio de cultivo PDAA, en cajas Petri de 90 mm de diámetro, se sellaron, etiquetaron e incubaron a 28°C por 7 días.

Para probar la patogenicidad de *S. rolfsii*, se inocularon tubérculos de papa de la variedad Fianna, los cuales fueron lavados y desinfectados con alcohol al 70%, se sumergieron durante 5 minutos en hipoclorito de sodio al 3%, se secaron a temperatura ambiente, esto antes de proceder a la inoculación.

Posteriormente, se realizaron cámaras húmedas para las pruebas, en las que se utilizaron tubérculos sin daño aparente, seguido se realizó una lesión con un sacabocado de 5 mm de diámetro y se les colocó un disco de 5mm de micelio del hongo. Cabe señalar, que para cada

cepa de *Sclerotium rolfsii* se inocularon cuatro tubérculos (cuatro repeticiones) var. Fianna, con su respectivo testigo, en el cual se colocó sobre el tubérculo discos de PDAA sin inóculo. Las cámaras húmedas se incubaron a 28-32 °C. Los datos de temperatura y humedad dentro de la cámara húmeda se tomaron cada hora durante la prueba con un Data Logger (Madgetech RFRHTemp2000A Wireless Temperature/Humidity Data Logger).

Por último, la patogenicidad y virulencia de las cepas en los se realizó a los ocho días después de la inoculación con el patógeno, para lo cual los tubérculos se cortaron longitudinalmente, directamente en la mitad del sitio de la lesión y se midieron el ancho máximo (w) y profundidad (d) de la lesión. Esto para determinar la penetración del patógeno (P), la cual se calculó con la fórmula de Lapwood *et al.* (1984):

$$P\ (mm) = (w / 2 + (d-6)) / 2$$

También se estimó el porcentaje de podredumbre blanda del tejido de los tubérculos utilizando los métodos de Bourne *et al.* (1981) y Hildenbrand y Ninnemann, (1994). El cual consistió en pesar cada tubérculo (Wi), posteriormente se extrajo el tejido dañado (podrido) y se pesaron de nuevo (Wf). Utilizando la siguiente formula:

$$\text{Tejido podrido (\%)} = ((Wi-Wf) / Wi) \times 100$$

Posteriormente, se aisló al patógeno del tejido que presentaron síntomas característicos para completar los postulados de Koch.

Los datos de penetración del patógeno se ajustaron con una regresión logística-log con el paquete estadístico SAS 9.0. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los análisis mostraron que las distribuciones de los datos fueron normales, los datos se sometieron a ANOVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los datos del porcentaje de podredumbre blanda se ajustaron con arc sin con el paquete estadístico SAS 9.0. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los análisis mostraron que las distribuciones de los datos no fueron normales, por lo que se analizaron utilizando el método no paramétrico de Kruskal-Wallis.

7.8. Evaluación del efecto inhibitorio de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium rolfsii*

Se realizaron las pruebas de antagonismo, confrontando directamente 25 cepas de *Trichoderma* (TRAE18, TRAE19, TRAE20, TRAF21, TRAU22, TRAU23, TRAE24, TRAE26, TRAU27, TRAE28, TRAU29, TRAU30, TRAU31, TRHA33, TRAU34, TRAU35, TRAF36, TRAU37, TRAF38, TR39, TR40, TR41, TR42, TR43 y TR44) de tres días de crecimiento contra las cepas: SrP4 y SrP17 de *S. rolfsii* de siete días, ambas en medio de cultivo PDAA. El efecto antagónico de *Trichoderma* sobre el hongo patógeno se determinó mediante el método de cultivos duales (Dennis and Webster, 1971).

Los enfrentamientos se realizaron en cajas Petri de 90 mm de diámetro conteniendo PDAA. Como inóculos, se utilizaron discos miceliales de 5 mm de diámetro de cada colonia. El inóculo de *S. rolfsii*, se colocó en la periferia de la caja y el de *Trichoderma* spp., en el otro extremo. Se utilizaron cuatro réplicas (cuatro cajas Petri) por cada combinación de *S. rolfsii*-*Trichoderma*. Como controles positivos se usaron cultivos individuales de las cepas de *S. rolfsii*. Las cajas se incubaron a 25 °C, 12 horas luz y 12 oscuridad (cámara bioclimática Thermoscientif) (Pacheco *et al.*, 2016).

Para determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. se realizaron las mediciones del crecimiento de ambos hongos, lo cual inició a las 24 horas después de la siembra y terminó cuando *S. rolfsii* llenó la caja de Petri.

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno de prueba, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición: } I = C\text{-}T/C \times 100$$

Donde:
C= Crecimiento del patógeno en control
T= Crecimiento de patógeno en tratamiento

También se calculó la eficiencia de las especies con la escala de Bell *et al.* (1892).

Cuadro 4. Eficiencia de las especies de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii*.

Clase	Características
1	*Trichoderma* creció completamente, ocupando toda la placa de Petri de 9 cm.
2	*Trichoderma* ocupa al menos el 65% de la placa de Petri.
3	*Trichoderma* y *S. rolfsii* cubren alrededor (40-60%) de la placa de Petri.
4	*Sclerotium rolfsii* ocupa al menos el 65% de la placa de Petri sin ninguna interferencia aparente por *Trichoderma.*
5	*Sclerotium rolfsii* sobrecreció completamente a *Trichoderma*, ocupando toda la placa de Petri.

Los datos se transformaron con arc sin con el paquete estadístico SAS 9.0. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los análisis mostraron que las distribuciones de los datos no fueron normales, por lo que se analizaron utilizando el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se realizó el mismo análisis estadístico para cada cepa (SrP4 y SrP17).

VIII. RESULTADOS

8.1. Identificación morfológica de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron 25 cepas de *Trichoderma* spp. (TRAE18, TRAE19, TRAE20, TRAF21, TRAU22, TRAU23, TRAE24, TRAE26, TRAU27, TRAE28, TRAU29, TRAU30, TRAU31, TRHA33, TRAU34, TRAU35, TRAF36, TRAU37, TRAF38, TR39, TR40, TR41, TR42, TR43 y TR44) se obtuvieron durante el período de muestreo de suelos de 48 predios del estado de Sinaloa. En base a las características morfológicas, resultaron dos especies de *Trichoderma:* 15 pertenecieron a la especie *Trichoderma asperellum* (TRAE18, TRAE19, TRAE20, TRAU22, TRAU23, TRAE24, TRAE26, TRAU27, TRAE28, TRAU29, TRAU30, TRAU31, TRAU34, TRAU35, TRAU37, TRAF38) y cuatro a *Trichoderma harzianum* (TRAF21, TRAF36, TRAF38 y TRHA33). Las cepas de *T. asperellum* (Cuadro 6) presentaron una tasa de crecimiento en medio de cultivo PDAA de 10-18 mm, en medio SNA 8-14 mm/día. La morfología colonial de todas las cepas de *T. asperellum* presentaron características similares en medio de cultivo cornmeal dextrosa agar, donde el color de la colonia varió de verde claro a verde oscuro a medida que estas maduraban, borde ondulado y suave, con apariencia flocosa a aracnoidea, micelio de color blanco acuoso e hifas hialinas. Pústulas de color verde oscuro, con tamaño de 1-2 mm de diámetro. Conidióforos largos y ramificados. Conidios subglobosos a ovoides y lisos, estos variaron en tamaño de 2.47-3.78 µm de largo y 2.02-3.05 µm de ancho, de color verde. Fiálides lageniformes- delgadas con terminación ramificada, con un tamaño de 4.2-14.3 µm de largo y 2.6-5.0 µm de ancho. Se observó la presencia de clamidosporas intercaladas y terminales (Figura 7).

Por otro lado, las cepas de *T. harzianum* (Cuadro 6) presentaron una tasa de crecimiento de 11-19 mm/día. en medio de cultivo PDAA, y 11-17 mm cada día en medio SNA. Las pústulas mostraron un color verde más claro, conidios subglobosos, lisos y pequeños, variaron en tamaño de 2.03-2.99 µm de largo y 1.64-2.30 µm de ancho en medio de cultivo cornmeal. Fiálides ampuliformes con cuello distintivo y estrecho en la punta, con un tamaño de 5.8-7.2 µm largo y 2.5-3.0 µm de ancho. Se observó la presencia de clamidosporas intercalar y terminal (Figura 8).

Cuadro 5. Características morfológicas de aislados de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum.*

Características			*T. asperellum* (TRAE18, TRAE19, TRAE20, TRAU22, TRAU23, TRAE24, TRAE26, TRAU27, TRAE28, TRAU29, TRAU30, TRAU31, TRAU34, TRAU35, TRAU37, TRAF38)	*T. harzianum* (TRAF21, TRAF36, TRAF38 y TRHA33)
Colonia	Crecimiento radial (mm/día)	PDAA	10-18	11-19
		SNA	8-14	11-17
	Color		Verde claro y verde oscuro	Verde claro y verde oscuro
	Borde		Ondulado y suave	Ondulado y suave
Pústulas			1-2	1-2
Micelio	Forma		Flocosa y aracnoideo	Flocosa y aracnoideo
	Color		Blanco acuoso	Blanco acuoso
	Color de hifas		Hialinas	Hialinas
Conidio	Forma		subglobosos, ovoide, liso, verrugoso y grande	Subglobosos, liso y pequeño
	Tamaño (µm)	Largo	2.47-3.78	2.03-2.99
		Ancho	2.02-3.05	1.64-2.30
Conidióforos	Forma		Largo y ramificado	Ramificados
Clamidosporas	Posición		NA	Terminal e intercalada
Fiálides	Forma		Lageniformes y delgadas	Ampuliformes
	Tamaño (µm)	Largo	4.2-14.3	5.8-7.2
		Ancho	2.6-5.0	2.5-3.0

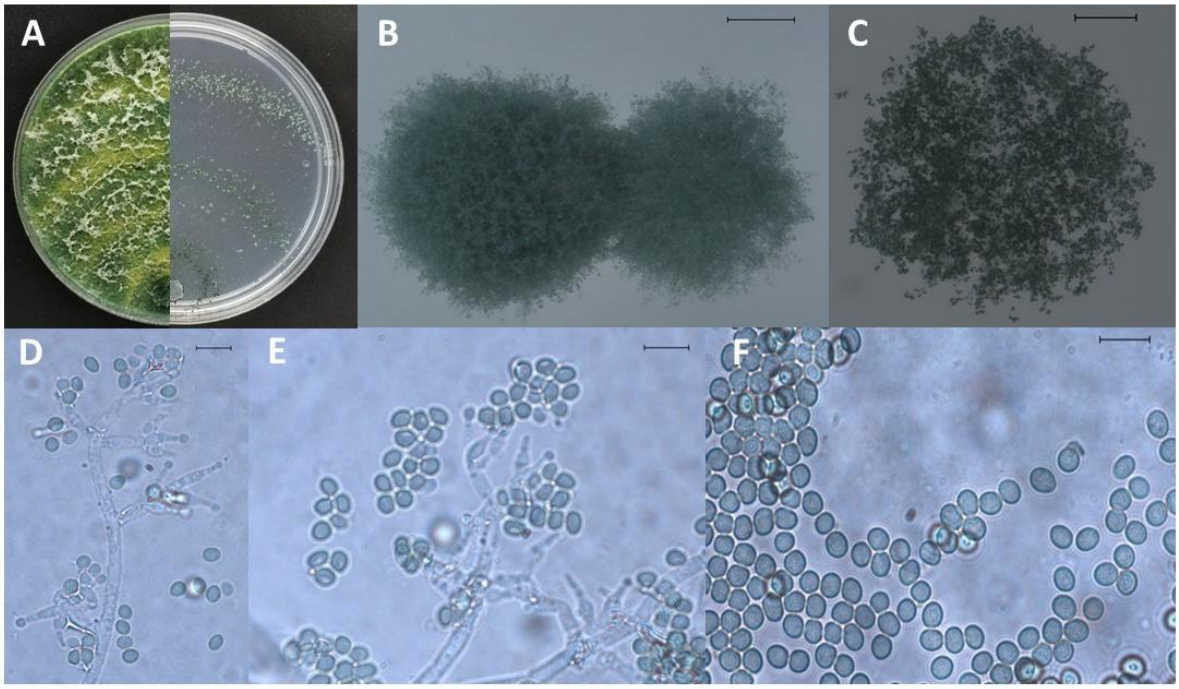

Figura 7. Morfología colonial y microscópica de *Trichoderma asperellum* (TRAU18). (A) color de la colonia en medio de cultivo PDAA (izquierda) y SNA (derecha) (B-C) pústulas conidiales, (D y E) conidióforos y (F) (100x conidios). (B) de medio SNA y (C-F) de medio Cornmeal dextrosa agar. Escala: (B y C= 2 mm) (D= 10 µm) (E y F= 5 µm).

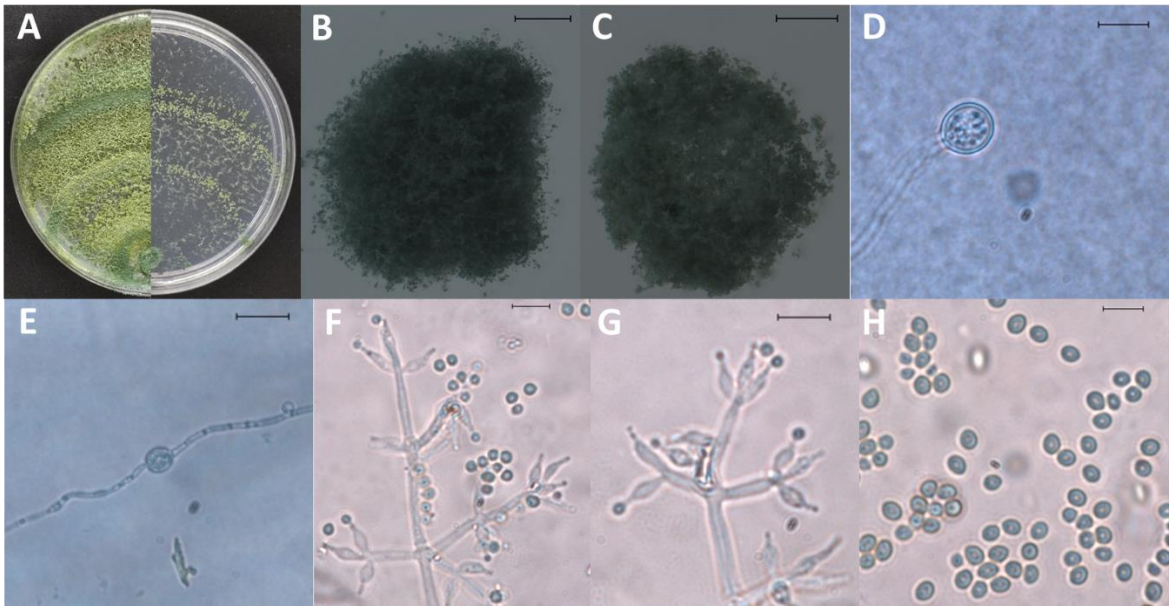

Figura 8. Morfología colonial y microscópica de *Trichoderma harzianum.* (TRHA33). (A) Colonia en medio de cultivo PDAA (izquierda) y SNA (derecha) (B-C) pústulas conidiales, (D y E) clamidosporas y (F y G) conidióforos (H) conidios (100x). (B) de medio SNA y (C-H) de medio Cornmeal dextrosa agar. Escala: (B y C= 2 mm) (D, H= 5 µm) (E, F y G= 10 µm)

8.2. Identificación de *Sclerotium rolfsii* mediante caracterización morfológica

Un total de 17 cepas de *Sclerotium* spp. (SrP1, SrP2, SrP3, SrP4, SrP5, SrP6, SrP7, SrP8, SrP9, SrP10, SrP11, SrP12, SrP13, SrP14, SrP15, SrP16 y SrP17) se obtuvieron durante el período de muestreo de suelos de los 48 predios del estado de Sinaloa. Las cepas presentaron micelio de color blanquecino con apariencia fibrosa y algodonosa, en forma de abanico, hifas hialinas, septadas, con presencia de fíbulas (Figura 9). Se observaron tonalidades de incolora a amarillenta en el reverso de las colonias (Cuadro 7). Los aislados presentaron un crecimiento radial de 4-16 mm/día, hasta alcanzar 90 mm de diámetro de la caja entre los cinco y ocho días.

Cuadro 6. Comparación de características morfológicas de tres especies del género *Sclerotium* con 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* (SrP1-SrP17).

Especie		***Sclerotium delphinii***	***Sclerotium coffeicola***	***Sclerotium rolfsii***	**SrP1-SrP17**
Colonia	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Forma	Algodonosa, fibrosa en forma de abanico	Algodonosa, fibrosa en forma de abanico	Algodonosa, fibrosa en forma de abanico	Algodonosa, fibrosa en forma de abanico
Hifas	Color	Hialino	Hialino	Hialino	Hialino
	Forma	Septado	Septado	Septado	Septado
Fíbulas		Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Esclerocios	Color	Blancos al principio, marrones en la madurez	Blancos al principio, marrones en la madurez	Blancos al principio, marrones en la madurez	Blancos al principio, marrones en la madurez
	Inicio de formación	6 ddi	10 a 15 ddi	10-28 ddi	10-20 ddi
	Tamaño	1.0-3.5 mm	0.7-4.4 mm	0.5-3 mm	0.5-2 mm

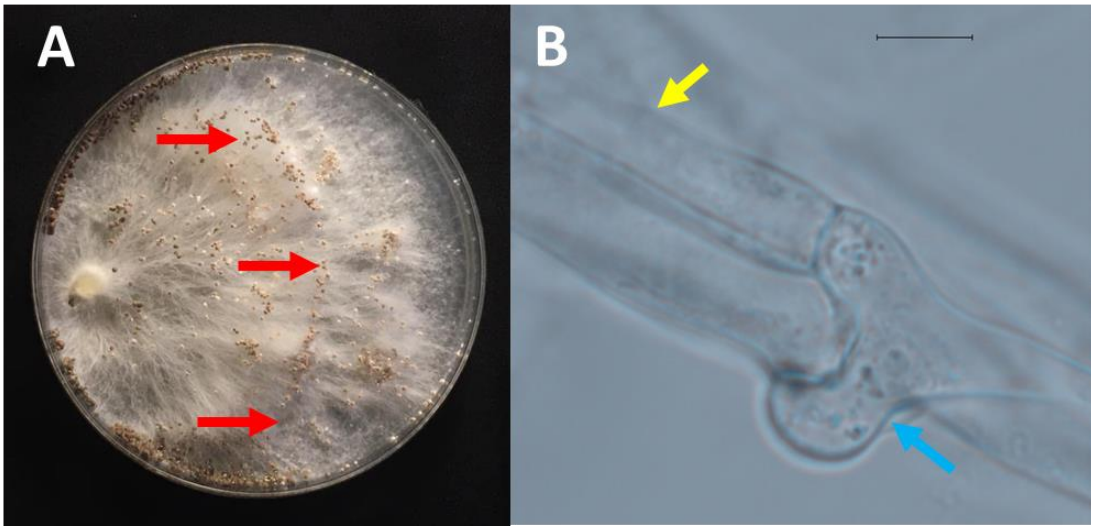

Figura 9. Características morfológicas de *Sclerotium rolfsii* (SrP17). (A) Morfología colonial en medio PDAA, y esclerocios (flechas rojas); (B) Hifa hialina (flecha amarilla), y fíbulas (flecha azul) (100x). Escala: (B= 50 µm).

Los esclerocios se desarrollaron entre los 10 a 20 días después de la inoculación y estos variaron en tamaño, presentándose entre los 0.5 a 2 mm de diámetro. Las 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* formaron entre 18 a 153 esclerocios por caja Petri (Cuadro 8).

Cuadro 7. Tamaño y número de esclerocios de cepas de *S. rolfsii* en medio de cultivo PDAA.

No.	Cepa	Tamaño esclerocios			No. de esclerocios promedio por caja Petri
		Min	Max	Promedio	
1	SrP1	1.1	1.6	1.3	18
2	SrP2	0.7	1.1	0.9	66
3	SrP3	0.8	1.1	1.0	56
4	SrP4	0.9	1.5	1.1	32
5	SrP5	1.0	1.9	1.4	137
6	SrP6	0.9	1.7	1.2	36
7	SrP7	0.8	1.6	1.1	64
8	SrP8	0.9	1.4	1.2	30
9	SrP9	0.9	1.6	1.1	47
10	SrP10	1.0	1.6	1.3	46
11	SrP11	1.2	1.7	1.4	48
12	SrP12	0.6	1.5	1.1	116
13	SrP13	0.8	1.6	1.1	153
14	SrP14	1.1	2.0	1.5	19
15	SrP15	0.6	1.3	1.0	124
16	SrP16	0.8	1.3	1.0	67
17	SrP17	0.5	1.6	1.1	55

8.3. Identificación de *Trichoderma* spp. y *Sclerotium rolfsii* mediante pruebas moleculares (PCR)

8.3.1. Amplificación de la región RPB2 para *Trichoderma* spp.

Alternativamente a la identificación morfológica de las cepas se procedió a identificar molecularmente a estas. Los fragmentos generados en la reacción de PCR de los 19 aislados (TRAE18-TRAF38), con los cebadores RPB25F y RPB27CR dieron como resultado productos de 1100 pb (Figura 10).

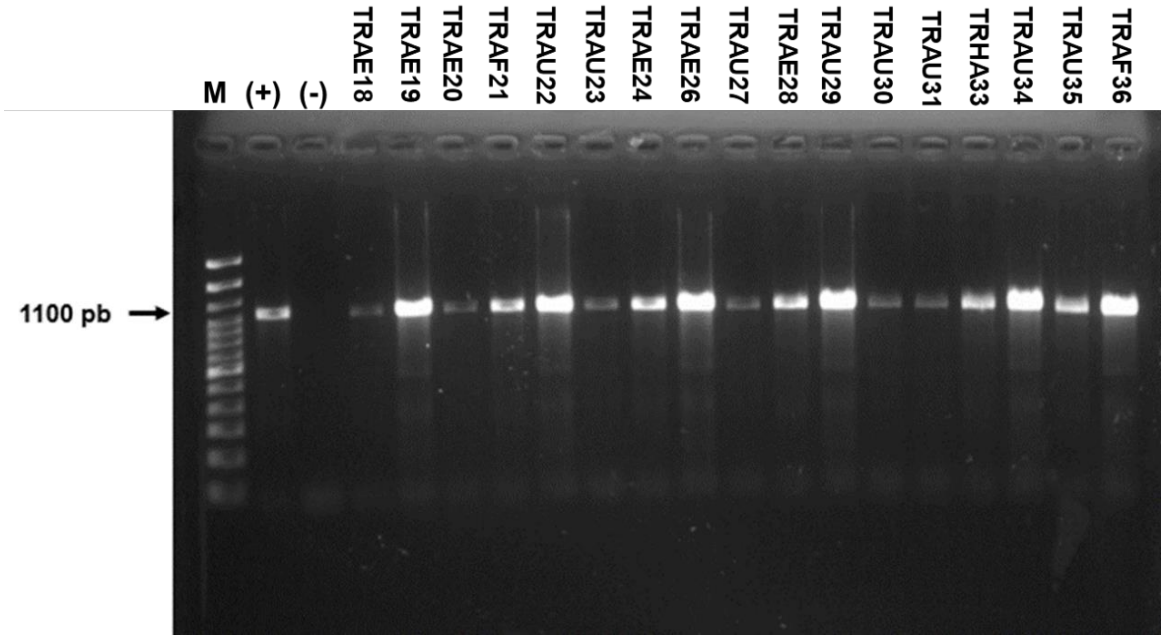

Figura 10. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de cepas nativas de *Trichoderma* (TRAE18-TRAF36) a 1100 pb con los oligonucleótidos RPB25F y RPB27CR. (M) Marcador de peso molecular, (+) control positivo de una cepa de *Trichoderma*, (-) control negativo.

La comparación de las secuencias de las cepas de este estudio con secuencias de la base de datos de NCBI-Genbank (MW407163.1, MW407165.1, KP009148.1, KP009068.1, KF425755.1, MF043075.1, MW407162.1, MF043069.1, MG917680.1, MF043082.1. y MF043078.1), indicaron una similitud del 99-100% con cuatro especies de *Trichoderma*: *T. asperellum*, (KF425755.1, MFO43082.1 y KP009068.1) con los aislamientos: TRAU22, TRAU23, TRAU27, TRAU29, TRAU30, TRAU31, TRAU34, TRAU35 y TRAU37, *T. asperelloides*

(MW407162.1, MW407163.1, MW407165.1 y MW043075.1) con: TRAE18, TRAE19, TRAE20, TRAE4, TRAE26 y TRAE28, *T. harzianum* (MG917680.1) con: TRHA33 y *T. afroharzianum* (KP009148.1, MF043078.1 y MF043078.1) con: TRAF21, TRAF36 y TRAF38. (Cuadro 9).

Cuadro 8. Comparación de secuencias de los fragmentos generados con los oligonucleótidos RPB25F y RPB27CR, con secuencias documentadas en la base de datos de NCBI.

Cepa	Identificación molecular RPB2	Cepa de referencia Genbank	Por. cober	Por. Ident	Procedencia	Año	Accesión
TRAE18	*T. asperelloides*	*T. asperelloides*	67%	99.30%	China	2021	MW407163.1
TRAE19	*T. asperelloides*	*T. asperelloides*	70%	99.60%	China	2020	MW407165.1
TRAE20	*T. asperelloides*	*T. asperelloides*	69%	99.80%	China	2021	MW407163.1
TRAF21	*T. afroharzianum*	*T. afroharzianum*	60%	99.79%	Poland	2015	KP009148.1
TRAU22	*T. asperellum*	*T. asperellum*	67%	99.11%	Poland	2014	KP009068.1
TRAU23	*T. asperellum*	*T. asperellum*	99%	100%	China	2020	KF425755.1
TRAE24	*T. asperelloides*	*T. asperelloides*	100%	100%	África	2019	MF043075.1
TRAE26	*T. asperelloides*	*T. asperelloides*	65%	99.11%	China	2020	MW407165.1
TRAU27	*T. asperellum*	*T. asperellum*	58%	99.29%	Poland	2014	KP009068.1
TRAE28	*T. asperelloides*	*T. asperelloides*	70%	99.90%	China	2021	MW407162.1
TRAU29	*T. asperellum*	*T. asperellum*	63%	99.49%	África	2019	MF043069.1
TRAU30	*T. asperellum*	*T. asperellum*	62%	99.20%	Poland	2014	KP009068.1
TRAU31	*T. asperellum*	*T. asperellum*	59%	99.39%	Poland	2014	KP009068.1
TRHA33	*T. harzianum*	*T. harzianum*	100%	100.00%	China	2018	MG917680.1
TRAU34	*T. asperellum*	*T. asperellum*	99%	100.00%	China	2020	KF425755.1
TRAU35	*T. asperellum*	*T. asperellum*	100%	99.89%	África	2019	MF043082.1
TRAF36	*T. afroharzianum*	*T. afroharzianum*	100%	99.78%	África	2019	MF043078.1
TRAU37	*T. asperellum*	*T. asperellum*	99%	100.00%	China	2020	KF425755.1
TRAF38	*T. afroharzianum*	*T. afroharzianum*	100%	99.78%	África	2019	MF043078.1

Las secuencias de *Trichoderma* TRAE18-TRAF38 se utilizaron para el análisis filogenético del RPB2. Las secuencias: TRAU22, TRAU23, TRAU27, TRAU29, TRAU30, TRAU31, TRAU34, TRAU35 y TRAU37 se agruparon con cepas de *Trichoderma asperellum* (KF425755.1, MFO43082.1 y KP009068.1); TRAE28, TRAE20, TRAE26, TRAE19, TRAE18, TRAE24 con cepas de *T. asperelloides* (MW407162.1, MW407163.1, MW407165.1 y MW043075.1); TRHA33 con *T. harzianum* (MG917680.1); TRAF21, TRAF36 y TRAF38 con *T. afroharzianum* (KP009148.1, MF043078.1 y MF043078.1) (Figura 11).

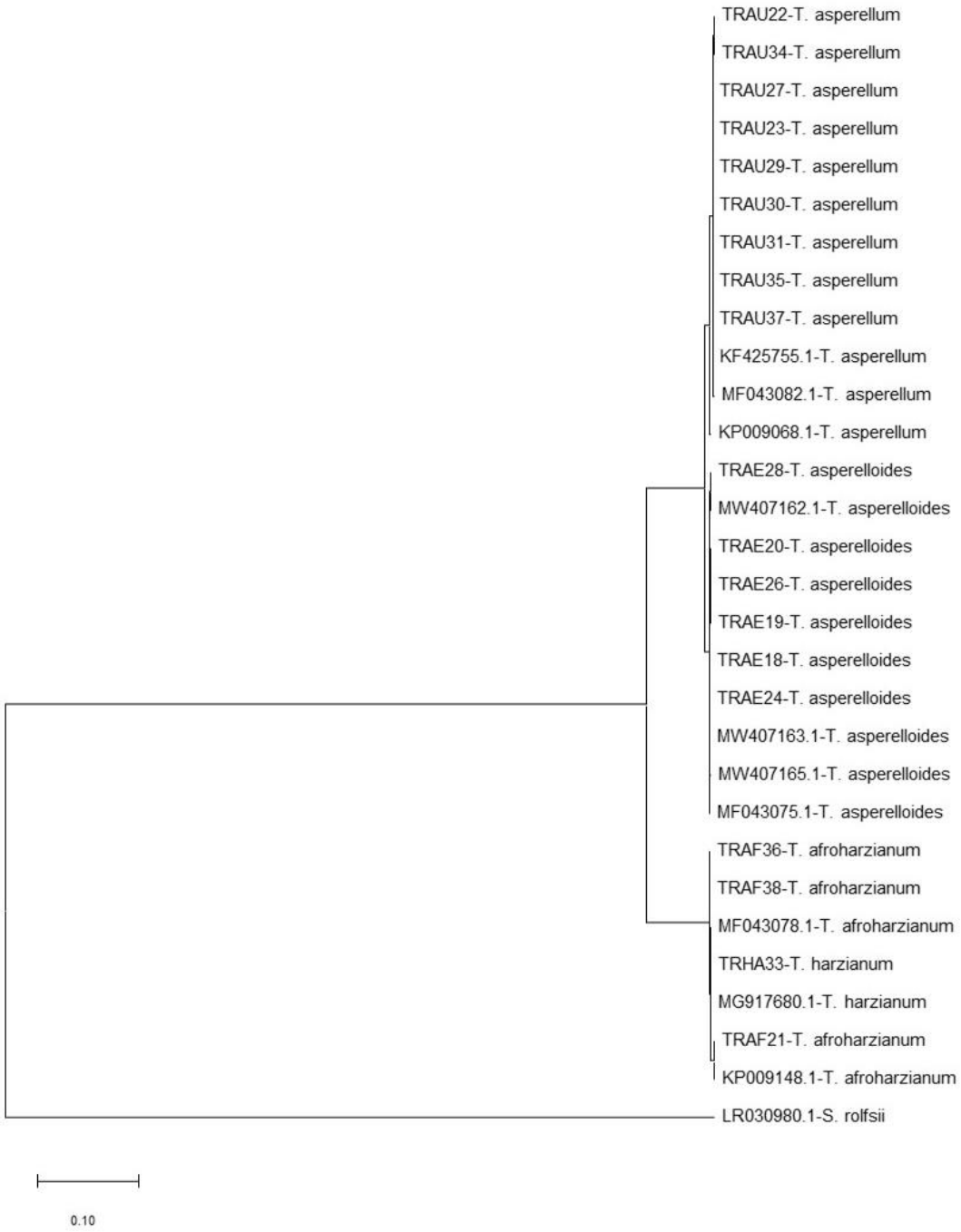

Figura 11. Filograma del vecino más cercano, basado en secuencias de la región RPB2

8.3.2. Amplificación de la región ITS para *Sclerotium rolfsii*

Los fragmentos generados por PCR de los 17 aislados (SrP1-SrP17) con los pares de oligonucleótidos generales de hongos ITS 1 e ITS4 dieron como resultados productos de 670 pb (Figura 12).

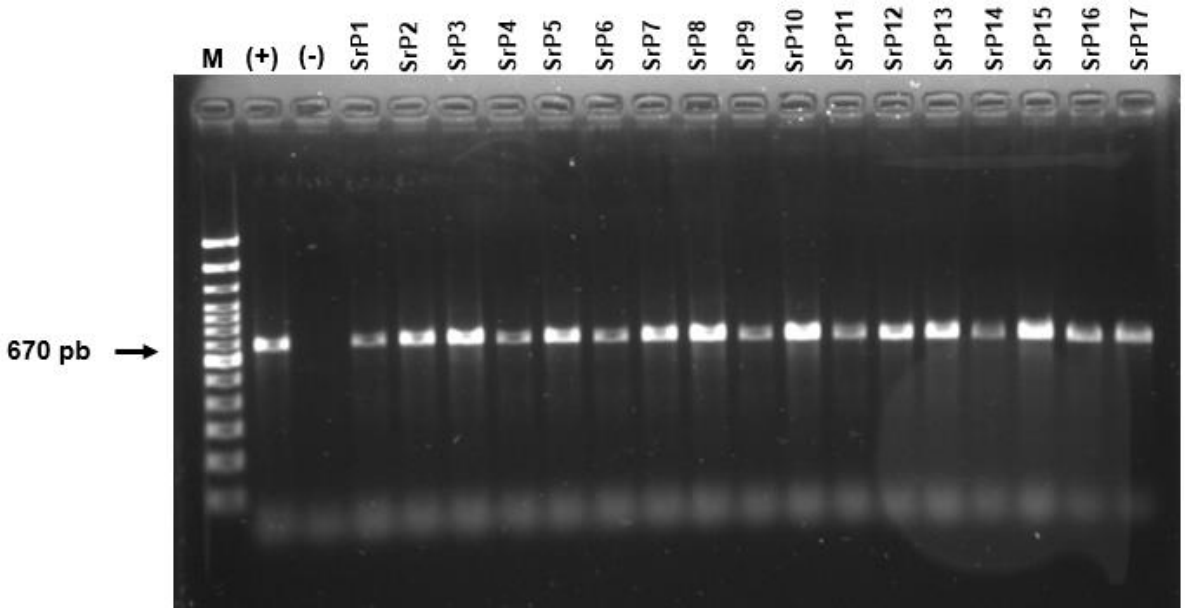

Figura 12. Productos de amplificación por PCR de cepas de *Sclerotium* (SrP1-SrP17) con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. (M) Marcador de peso molecular, (+) control positivo de una cepa de *Sclerotium* (-) y control negativo.

Al comparar las secuencias obtenidas, con las bases datos de NCBI-Genbank (KT337426.1:8-655, MH514002.1:67-704, MN121364.1:24-664, MH256035.1:42-680 y KY175225.1:36-671), indicaron del 85-99% de identidad, con varias cepas de *Sclerotium rolfsii* con diferentes procedencias (Cuadro 10).

Cuadro 9. Secuencias documentadas en la base de datos de NCBI, comparadas con los fragmentos generados con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Cepa	Identificación molecular ITS	Cepa de referencia GenBank	Por. cober	Por. Ident	Procedencia	Año	Accesión
SrP1	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	95%	91.73%	Bangladesh	2018	MH514002.1
SrP2	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	52%	94.54%	China	2018	MH256035.1
SrP3	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	98%	90.34%	India	2015	KT337426.1
SrP4	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	49%	96.43%	China	2018	MH256035.1
SrP5	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	68%	99.53%	Estados Unidos	2016	KY175225.1
SrP6	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	67%	99.53%	Estados Unidos	2016	KY175225.1
SrP7	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	39%	90.22%	India	2019	MN121364.1
SrP8	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	96%	90.71%	Bangladesh	2018	MH514002.1
SrP9	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	41%	90.12%	India	2019	MN121364.1
SrP10	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	63%	97.87%	China	2018	MH256035.1
SrP11	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	80%	92.94%	India	2015	KT337426.1
SrP12	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	68%	99.08%	India	2019	MN121364.1
SrP13	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	76%	99.07%	India	2019	MN121364.1
SrP14	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	98%	85.45%	India	2015	KT337426.1
SrP15	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	97%	89.77%	Bangladesh	2018	MH514002.1
SrP16	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	97%	92.27%	India	2019	MN121364.1
SrP17	*S. rolfsii*	*S. rolfsii*	67%	99.37%	Estados Unidos	2016	KY175225.1

Las 17 secuencias de *Sclerotium* SrP1-SrP17 se utilizaron para el análisis filogenético de ITS. Todas se agruparon con cepas típicas de *Sclerotium rolfsii* de la base de datos de GenBank (Figura 13) de cuatro regiones del mundo: China (MH256035.1), India (MN121364.1), Estados Unidos (KY175225.1) y Blangladesh (MH514002.1) (Cuadro 10).

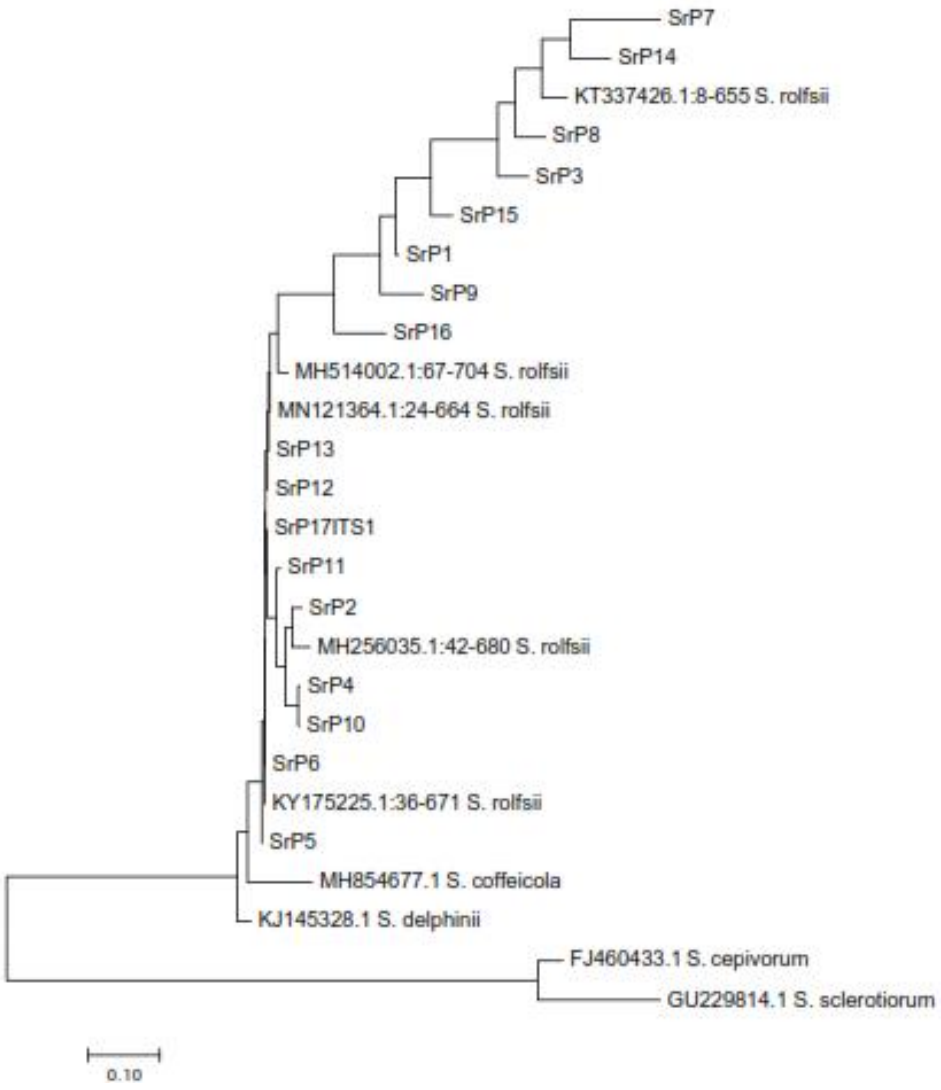

Figura 13. Filograma del vecino más cercano, basado en secuencias de la región ITS

8.4. Patogenicidad de *Sclerotium rolfsii* en tubérculos de papa

Después de ocho días de la inoculación se encontró que todas las cepas eran patogénicas en tubérculos de papa de variedad Fianna. Las lesiones producidas después de la inoculación, fueron similares a las lesiones de podredumbre blanda inducidas por *Sclerotium rolfsii* en campo. Los síntomas se presentaron como pudriciones blanda circulares e irregulares con borde café (Figura 14), mientras que los tubérculos control permanecieron sanos.

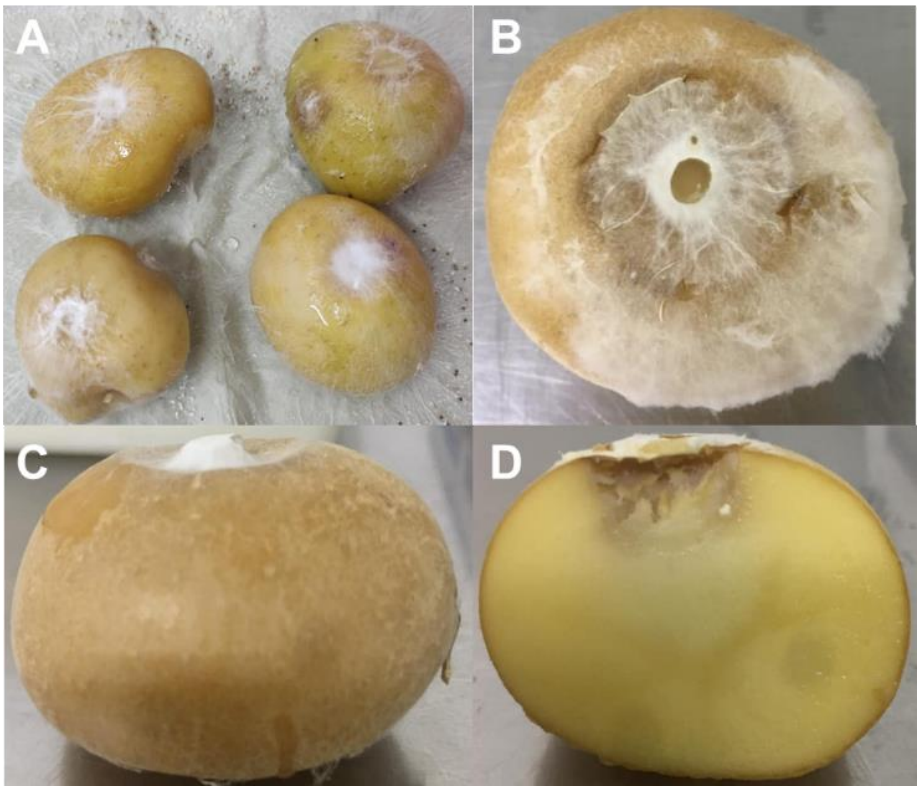

Figura 14. Síntomas de podredumbre blanda en tubérculos de papa variedad Fianna, causados por la cepa SrP17 de *Sclerotium rolfsii* mediante inoculación artificial. (A) Tubérculos con síntomas de *S. rolfsii* en cámara húmeda. (B y C) lesiones causadas por *S. rolfsii*. (D) Corte longitudinal de tubérculo de papa con pudrición blanda.

La penetración en los tubérculos varió de 9.20 a 15.45 mm entre las 17 cepas, presentado diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ellas. Sin embargo, la penetración máxima se obtuvo de las cepas SrP7 (15.45 mm) y SrP4 (14.70 mm), sin diferencias significativas entre ellas ($P \leq 0,05$). Mientras que la cepa SrP9 obtuvo la mínima penetración (9.20 mm). La cepa SrP10 causó una penetración de 13.3 mm, no mostró diferencias significativas respecto a las cepas SrP17, SrP6, SrP11, SrP1, SrP14 y SrP15 con una penetración de 13.2, 12.7, 12.7, 12.6, 12.4 y 12.3 mm de forma respectiva (Cuadro 11).

Cuadro 10. Penetración del patógeno en tubérculos de papa con 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* (SrP1-SrP17).

Penetración del patógeno			
Cepa	N	P (mm)	Media
SrP7	5	15.5	2.73 a*
SrP4	5	14.7	2.68 a
SrP10	5	13.3	2.58 b
SrP17	5	13.2	2.57 bc
SrP6	5	12.7	2.54 bcd
SrP11	5	12.7	2.53 bcd
SrP1	5	12.6	2.52 bcd
SrP14	5	12.4	2.51 bcde
SrP15	5	12.3	2.50 bcde
SrP16	5	12.2	2.49 cdef
SrP8	5	12.0	2.48 def
SrP12	5	11.5	2.43 efg
SrP2	5	11.2	2.41 fg
SrP5	5	11.0	2.39 gh
SrP13	5	10.7	2.36 gh
SrP3	5	10.3	2.32 h
SrP9	5	9.2	2.21 i
Testigo	5	0.0	0.00 j

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
N= repeticiones
P= penetración del patógeno

Por otro lado, los porcentajes de podredumbre variaron de 2.59% a 11.51% con diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las cepas. El porcentaje máximo de pudrición se obtuvo de la cepa SrP4 (11.51%) y el mínimo lo obtuvo SrP9 (2.59%), esta última cepa no mostró diferencias significativas respecto a las cepas SrP13, SrP3 y SrP12 con un porcentaje de 3.63, 4.03 y 4.79 de forma respectiva, pero si respecto al resto de los aislados (P=0.05). La cepa SrP14 con porcentaje de 5.44, no mostró diferencias significativas (P=0.05) respecto a las cepas SrP5, SrP2, SrP16 y SrP8 (5.4, 5.84, 5.66 y 6.35%) respectivamente (Cuadro 12).

Cuadro 11. Porcentaje de podredumbre blanda en tubérculos de papa con 17 cepas de *Sclerotium rolfsii* (SrP1-SrP17).

Porcentaje de podredumbre blanda		
Cepa	%	Medias
Testigo	0	0 a*
SrP9	2.59	3 ab
SrP13	3.63	4 abc
SrP3	4.03	4 abc
SrP12	4.79	5 abcd
SrP14	5.44	5 bcde
SrP5	5.4	5 bcde
SrP2	5.84	6 bcde
SrP16	5.66	6 bcde
SrP8	6.35	6 bcde
SrP1	6.55	7 cdef
SrP15	7.63	8 defg
SrP11	7.83	8 defg
SrP17	7.99	8 defg
SrP6	8.31	8 efg
SrP7	10.32	10 fg
SrP10	10.54	11 fg
SrP4	11.51	12 g

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0.05), Kruskal-Wallis.

Para dar cumplimiento a los postulados de Koch, se reaislaron del tejido sintomático de los tubérculos inoculados en PDAA. La morfología de la colonia, presencia de fíbulas y esclerocios coincidió con la inoculación original.

8.5. Efecto inhibitorio *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre *Sclerotium rolfsii*

Las pruebas de efecto inhibitorio *in vitro* mostraron que 24 de las 25 cepas utilizadas inhibieron significativamente las dos cepas de *S. rolfsii* (SrP4 y SrP17), con inhibición del 51.5% a 69.7% en SrP4 y 57.6% a 59.6% en SrP17 (Cuadro 13).

Las cepas de *Trichoderma* TR40 y TR41 mostraron el mayor potencial para inhibir el crecimiento micelial de SrP4 con una media de 56.6 para ambas, seguida de las cepas TRAU34, TRAU35, TRAE19, TRAE24, TRAE18, TRAU37, TRAU30 y TR44 con media de 53.8, 53.8,

53.8, 53.8, 54.8, 54.8, 54.8 y 54.8, todas escalas dos, sin diferencias significativas entre ellas (P ≤ 0,05) (Cuadro 13) (Figura 15). En cambio, la cepa TRHA33 (escala 4) con media 27.4 mostró el menor porcentaje, seguido de TRAU31 (escala 3), TR43 (escala 3), TR39 (escala 3), TRAE28 (escala 3), TRAF21 (escala 2), TR42 (escala 2), TRAE26 (escala 2), TAF38 (escala 2), TRAF36 (escala 2) y TRAU29 (escala 2) con medias 45.9, 49.4, 49.4, 50.2, 51.1, 52, 52, 52, 52 y 52 de forma respectiva contra SrP4, sin diferencias significativas (Cuadro 13).

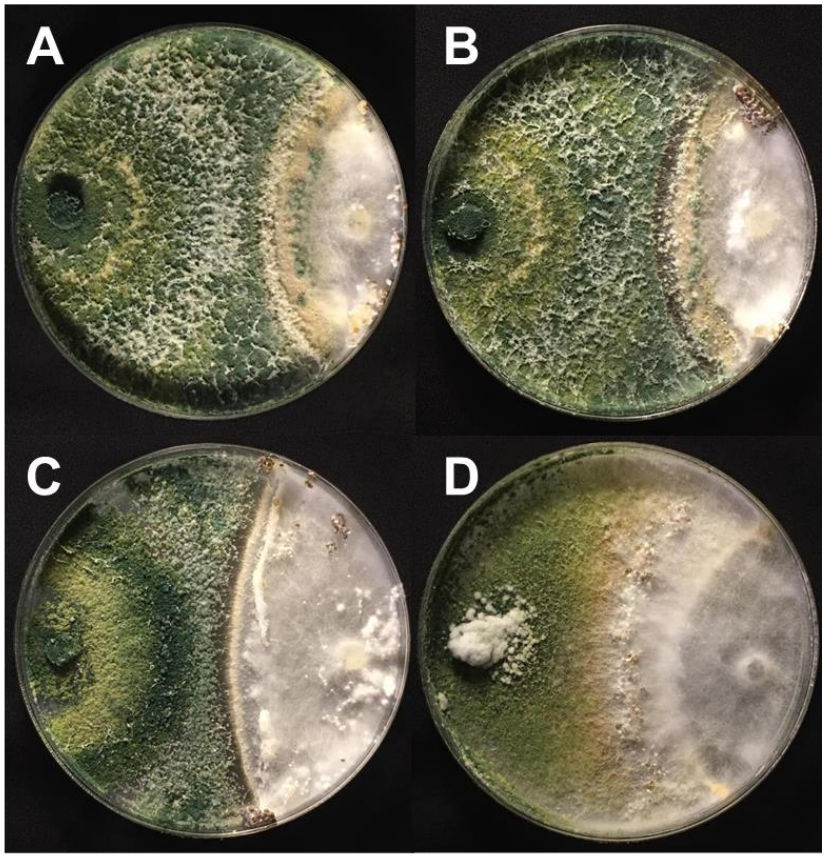

Figura 15. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* (izquierda) contra *S. rolfsii* (SrP4) (derecha). (A) cepa de *Trichoderma* TRAE24 (escala 2). (B) *Trichoderma* TRAU29 (escala 2). (C) *Trichoderma* TRAE28 (escala 3). (D) *Trichoderma* TRHA33 (escala 4).

Las cepas de *Trichoderma* TRAU34, TR41, TR40, TRAE24, TRAU31 y TAU30 con una media de 56.6 mostraron el más alto potencial para inhibir el crecimiento micelial de SrP17, con escala dos, seguido de TRAU35, TRAU29, TRAE19, TRAF36, TR39, TRAU37, TRAE18 con medias 54.76, 54.76, 54.76, 54.76, 54.76, 55.67 y 55.67 % respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas (Cuadro 13) (Figura 16). Por otro lado, la cepa de *Trichoderma* TRHA33 (escala 4) con media 30.53 mostró el menor porcentaje de inhibición contra SrP17,

seguido de TR43 (escala 3), TRAE28 (escala 3), TRAF38 (escala 2), TRAE26 (escala 2), TRAE20 (escala 2), TRAF21 (escala 2), TRAU23 (escala 2) y TR42 (escala 2), con medias 49.37, 50.24, 51.12, 52, 52, 52, 52.89, y 52.89 % sin diferencias significativas entre ellas (Cuadro 13) (Figura 16).

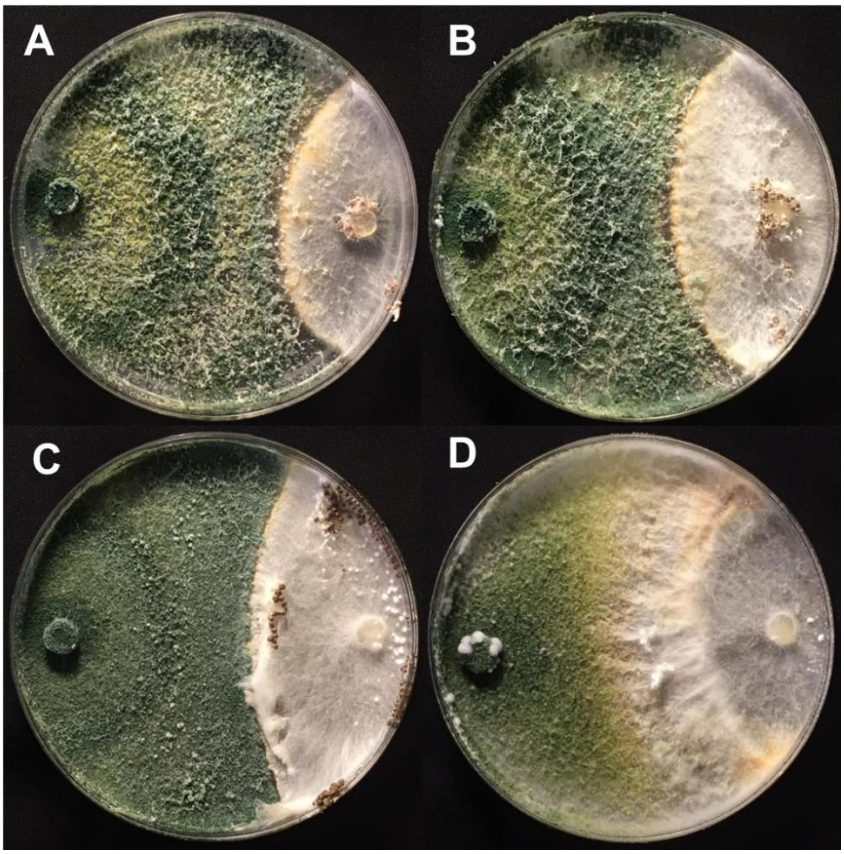

Figura 16. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* (izquierda) contra *S. rolfsii* (SrP17) (derecha). (A) cepa de *Trichoderma* TR39 (escala 2). (B) *Trichoderma* TRAU23 (escala 2). (C) *Trichoderma* TRAE28 (escala 3). (D) *Trichoderma* TRHA33 (escala 4).

Cuadro 12. Antagonismo *in vitro* de 25 cepas de *Trichoderma* spp. (TRAE18-TR44) contra *Sclerotium rolfsii* (SrP4 y SrP17), con puntaje (1-5) de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, 1982.

Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium rolfsii*							
Cepa SrP4 de *S. rolfsii*				Cepa SrP17 de *S. rolfsii*			
Tratamiento	% de inhibición	Puntaje (escala de Bell *et al.*, 1982)	Medias	Tratamiento	% de inhibición	Puntaje (escala de Bell et al., 1982)	Medias
Testigo	0 (0) **	5	0 a*	Testigo	0 (0) **	5	0 a*
SrP4-TRHA33	21.2 (27.4)	4	27.4 a	SrP17-TRHA33	25.8 (35.5)	4	30.53 ab
SrP4-TRAU31	51.5 (45.8)	3	45.9 ab	SrP17-TR43	57.6 (49.4)	3	49.37 ab
SrP4-TR43	57.6 (49.4)	3	49.4 ab	SrP17-TRAE28	59.1 (59.2)	3	50.24 ab
SrP4-TR39	57.6 (49.4)	3	49.4 ab	SrP17-TRAF38	60.6 (51.1)	2	51.12 ab
SrP4-TRAE28	59.1 (50.2)	3	50.2 ab	SrP17-TRAE26	62.1 (52.0)	2	52 abc
SrP4-TRAF21	60.6 (51.1)	2	51.1 ab	SrP17-TRAE20	62.1 (52.0)	2	52 abc
SrP4-TR42	62.1 (52.0)	2	52 abc	SrP17-TRAF21	62.1 (52.0)	2	52 abc
SrP4-TRAE26	62.1 (52.0)	2	52 abc	SrP17-TRAU23	63.6 (52.9)	2	52.89 abcd
SrP4-TRAF38	62.1 (52.0)	2	52 abc	SrP17-TR42	63.6 (52.9)	2	52.89 abcd
SrP4-TRAF36	62.1 (52.0)	2	52 abc	SrP17-TR44	65.2 (53.8)	2	53.85 bcd
SrP4-TRAU29	62.1 (52.0)	2	52 abc	SrP17-TRAU27	65.2 (53.8)	2	53.85 bcd
SrP4-TRAU27	63.6 (52.9)	2	52.9 bcd	SrP17-TRAU22	65.2 (53.8)	2	53.85 bcd
SrP4-TRAU23	63.6 (52.9)	2	52.9 bcd	SrP17-TRAU35	66.7 (54.8)	2	54.76 cde
SrP4-TRAU22	63.6 (52.9)	2	52.9 bcd	SrP17-TRAU29	66.7 (54.8)	2	54.76 cde
SrP4-TRAE20	63.6 (52.9)	2	52.9 bcd	SrP17-TRAE19	66.7 (54.8)	2	54.76 cde
SrP4-TRAU34	65.2 (53.8)	2	53.8 cde	SrP17-TRAF36	66.7 (54.8)	2	54.76 cde
SrP4-TRAU35	65.2 (53.8)	2	53.8 cde	SrP17-TR39	66.7 (54.8)	2	54.76 cde
SrP4-TRAE19	65.2 (53.8)	2	53.8 cde	SrP17-TRAU37	68.2 (55.7)	2	55.67 de
SrP4-TRAE24	65.2 (53.8)	2	53.8 cde	SrP17-TRAE18	68.2 (55.7)	2	55.67 de
SrP4-TRAE18	66.7 (54.7)	2	54.8 de	SrP17-TRAU34	69.7 (56.6)	2	56.6 e
SrP4-TRAU37	66.7 (54.7)	2	54.8 de	SrP17-TR41	69.7 (56.6)	2	56.6 e
SrP4-TRAU30	66.7 (54.7)	2	54.8 de	SrP17-TR40	69.7 (56.6)	2	56.6 e
SrP4-TR44	66.7 (54.7)	2	54.8 de	SrP17-TRAE24	69.7 (56.6)	2	56.6 e
SrP4-TR41	69.7 (56.6)	2	56.6 e	SrP17-TRAU31	69.7 (56.6)	2	56.6 e
SrP4-TR40	69.7 (56.6)	2	56.6 e	SrP17-TRAU30	69.7 (56.6)	2	56.6 e

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0.05), Kruskal-Wallis.
**Las cifras entre paréntesis son valor transformado arc sin.

IX. DISCUSIÓN

El hongo *Trichoderma* se encontró en los suelos del estado de Sinaloa, el cual mostró diversidad morfológica en los diferentes medios de cultivo; en medio PDAA y SNA las colonias obtenidas e identificadas como *Trichoderma asperellum* presentaron una tasa de crecimiento en medio PDA 10-18 mm y SNA 8-14, similares a las reportadas por Guigón-López y colaboradores, (2010), mientras que la tasa de crecimiento de los aislados de *Trichoderma harzianum* concordaron con los rangos reportados por Gary y Prakash (2015). El color de las colonias varió en las dos especies, de un verde claro a un verde oscuro con bordes ondulados y suaves, mientras que el micelio presentó color blanco acuoso con hifas hialinas y las postulas tuvieron un rango similar entre ambas especies, mientras que el micelio presentó color blanco acuoso con hifas hialinas (Rai *et al.*, 2019).

Por otro lado, la forma y tamaño de los conidios de *T. asperellum* en medio Cornmeal dextrosa agar, coincidió con lo descrito por Gary y Prakash (2015) quienes reportaron conidios subglogbos, ovoides, lisos y en pocas ocasiones verrugosos. Del mismo modo, concordaron con la forma larga y ramificada de los conidióforos, clamidosporas en posiciones intercaladas y terminales y fiálides lageniformes y delgas con tamaños similares a los obtenidos en este trabajo. En cuanto a *T. harzianum* presentó conidios subglobos, lisos y pequeños, con tamaños similares a los registrados por Gary y Prakash (2015), a su vez, presentaron conidióforos ramificados, clamidosporas en posiciones intercaladas y terminales y fiálides ampuliformes con tamaños similares a los reportados por Gary y Prakash (2015).

Por otro lado, Mahadevakumar y colaboradores (2016) encontraron que los aislados de *Sclerotium rolfsii* presentan distintas características morfológicas, tanto en su colonia como en los esclerocios, a causa de la extensa gama de hospedantes y condiciones climáticas en donde se desarrolla.

Las características morfológicas de las colonias y la pigmentación de los esclerocios de los aislados de *Sclerotium*, permitieron la identificación de la especie *S. rolfsii*. Respecto a la tasa de crecimiento obtenida, presentó similitud a lo consignado por Prasad *et al*. (2012). Okereke and Wokocha, (2007) reportan que la variación en el crecimiento de los aislados se debe a diferencias en los niveles de nutrientes, ecología o diferencias genéticas.

Las colonias de *S. rolfsii* exhibieron apariencia esponjosa, fibrosa y en forma de abanico (Paparu *et al.* 2020). Los esclerocios exhibieron color marrón claro a marrón oscuro conforme a su grado de maduración, totalmente similares a las estructuras morfológicas publicadas por Zhou *et al.* (2019). Así mismo, el tamaño de los esclerocios fue similar a los registrado por Díaz *et al.* (2018). Con respecto a la producción de esclerocios, en este estudio concordó con lo reportado por Ayed *et al.* (2018); su formación inició en el mismo periodo registrado por Mahadevakumar *et al*. (2018). Distinto a lo consignado por Paparu *et al*. (2020), quienes registran la producción de esclerocios 28 días después de la inoculación.

Por otra parte, con base a la región RPB2 se elaboró un árbol filogenético, se obtuvieron cuatro especies de *Trichoderma,* cepas registradas por Jaklitsch y Voglmayr, (2015) y Athafah *et al.* (2020), quienes reportan que esta región genera arboles más completos en la identificación de especies de este hongo. Así mismo, se elaboró otra filogenia con base a la región ITS para la identificación de especies de *Sclerotium rolfsii* lo que resultó en la unión de los aislados a un clado y así se logró la identificación de la especie *S. rolfsii,* resultados que coinciden con lo reportado por Mahadevakumar y colaboradores (2018).

La patogenicidad de los 17 aislamientos de *S. rolfsii* se demostró en tubérculos de papa y mostraron diferentes grados de virulencia, con signos y síntomas característicos de podredumbre blanda, similar a lo registrado por Daami-Remadi *et al.* (2007) quienes reportan patogenicidad en tubérculos de papa variedad Spunta. Estos resultados son de suma importancia, pues abre un camino a investigaciones futuras, donde se podrían incluir estudios de patogenicidad de estas especies *in planta,* en invernadero o campo, ya que no existe información de este tipo en el cultivo de papa en México.

Los aislados de *Trichoderma asperellum, T. asperelloides y T. afroharzianum* mostraron potencial en el control de *Sclerotium rolfsii,* resultados similares a los reportados por Vineela et al. (2020), quienes registran que las cepas de *T. hamatum, T. harzianum* y *T. viride* inhibieron de un 71.9-74.7% el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii.* Por esto, se justifica el continuar con estudios con este antagonista en condiciones de invernadero y en futuro, en campo, para así, determinar su potencial como agente de biocontrol.

X. CONCLUSIONES

- Las cepas del género *Trichoderma* obtenidas de suelos de cultivos de papa del estado de Sinaloa, son de *Trichoderma asperellum, T. asperelloides, T. afroharzianum* y *T. harzianum*, mientras que los 17 aislados de esclerocios pertenecen a *Sclerotium rolfsii*. Por otro lado, *Trichoderma asperellum, T. asperelloides, T. afroharzianum* inhiben el crecimiento micelial de *S. rolfsii in vitro*.
- Las cepas de *S. rolfsii* resultaron patogénicas en tubérculos de papa var. Fianna y mostraron diferentes grados de virulencia sobre tubérculos de papa variedad Fianna en condiciones de laboratorio *in vitro.*

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahmad, J.S. and Baker, R. 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathol. 77: 182-189 pp. DOI:10.1094/phyto-77-182

AGRIOS GN. 2005. Plant Pathology. 5Th Edition, Academic Press, New York. 389 p.

Al-Abedy AN, Al-Fadhal FA, Malik HK, Al–Masoudi Z and AL-Mamoori SA. 2018. Int. J. Agricult. Stat. Sci. 14:2. 587-598 pp. https://www.researchgate.net/publication/328031842

Amna, A., Arshad, J., Amna, S. and Iqra, H. K. 2020. Effect of soil amendment with Chenopodium album dry biomass and two Trichoderma species on growth of chickpea var. Noor 2009 in Sclerotium rolfsii contaminated soil. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30: 102. DOI: https://doi.org/10.1186/s41938-020-00305-1

APG IV: Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Solanum tuberosum* L. 2021. Publicado en: Sp. pl. 1:185. 1753. https://www.gbif.org/es/species/2930262 (consultado, noviembre 2020).

Andrade-Bolaños, H. J., Gualoto-Ramírez, M. A. 2019. Evaluación de resistencia de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) a rhizoctoniasis (*Rhizoctonia* sp.) y pie negro (*Pectobacterium* spp.). Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ingeniería Agronómica. Quito: UCE. 82 p. http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19847 (consultado, octubre 2020).

Athafah, A. T., Sabah, I.A. A., Li, B. and Jing-Ze, Z. 2020. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. Biological Control. 145. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104261

Aycock, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin. 174: 202 pp.

Ayed, F., Jabnoun, K. H., Aydi, B., Abdallah, R. and Daami, R. M. 2018. Effect of temperatures and culture media on *Sclerotium rolfsii* mycelial growth, sclerotial formation and germination. Journal of Plant Pathology and Microbiology. 9: 446−446 pp. DOI:10.4172/2157-7471.1000446

Barnett, H. L. and Barry, B. H. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4a ed. Macmillan Publishing Company. New York, U. S. A. 218 p. https://www.academia.edu/35499449/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fourth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf_pdf (consultado, octubre 2020).

Bell, D. K., Wells, H. D. and Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72: 379-382 pp. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF (consultado, octubre 2020).

Bourne, W. F., McCalmont, D. C. and Wastie, R. L. 1981. Assessing potato tubers for susceptibility to bacterial soft rot (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*). Potato Research. 24: 409-415 pp. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02357323

CABI. 2000. Crop Protection Compendium. Global Module.2nd. Ed. CAB International. UK. https://www.cabi.org/cpc (consultado, octubre 2020).

Castañón-Viveros, S. A., Salas-Marcial, C., Ramos-García, M. L., Hernández-Romano, J. y Guillén-Sánchez, D. 2019. Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo in vitro de *Clavibacter michiganensis.* Revista mexicana de fitopatología. 37:1. 37-42 pp. DOI: http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1903-6

Chaverril, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E. and Gary, J. S. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: Species with Conidiophore Elongations and Green Conidia. Mycologia, 95:6. 1100-1140 pp. DOI: 10.2307/3761915

Chet, I., Henis, Y. and Mitchell, R. 1967. Chemical composition of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Can. J. Microbiol. 13:137-41. DOI: 10.1139/m67-019

Chet, I. and Henis, Y. 1968. X-ray analysis of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Can. J. Microbiol.14:815-16 pp. DOI: 10.1139/m68-138

Chet, I. and Henis, Y. 1972. The response of two types of *Sclerotium rolfsii* to factors affecting sclerotial formation. J. Gen. Microbiol. 73:483-86 pp. DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-73-3-483

Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology. 48: 37-43 p. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02825358

Chet, I. and Benhamou, S. H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium:* Enzymes, biological control and comercial applications. Harman GE, Kubice CP. (Eds.). Volumen 2: 153-152 p. Taylor & Francis Ltd., London, UK. Citado por: Infante D, Martínez B, González N y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 24: 1. 14-21 pp. http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf (consultado, diciembre 2020).

Chima-Wokocha, R. 1988. Relation ship between the population of viable Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil to cropping sequence in the Nigerian Savanna. *Plant and soil*. 106: 146- 148 pp. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02371207

CIP. Centro Internacional de la Papa. 1984. Boletines de Información Técnica. Departamento de Capacitación y comunicaciones del CIP. 415 p. https://es.scribd.com/document/258185684/CIP-Informe-Anual-1984 (consultado, septiembre 2020).

CIP. International Potato Center. 2013. https://cipotato.org/es/sin-categorizar/manejo-del-tuberculo-semilla/#fisiologia-del-tuberculo-semilla (consultado, septiembre 2020).

Coley-Smith, J. R. and Cooke, R. C. 1971. Survival and germination of fungal Sclerot. Annual Review of Phytopathology, 9: 65:92 pp. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.000433

Cortez, R. M. y Hurtado, G. 2002. Guía técnica cultivo de papa. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. San Salvador, El Salvador. 36 pp. http://www.centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Papa.pdf (consultado, septiembre 2020).

Christias, C. 1980. Nature of the sclero-tial exudate of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Soil Biol. Biochem. 12:199-201 pp. DOI: https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90061-9

Daami-Remadi, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Ayed, F., Hibar, K. and Mahjoub, M. 2007. First report of *Sclerotium rolfsii* causing atypical soft rot on potato tubers in Tunisia. Tunisian Journal of Plant Protection 2: 59-62 pp. https://www.researchgate.net/publication/311648975_The_African_Journal_of_Plant_Science_and_Biotechnology_Effect_of_Temperature_on_Sclerotium_rolfsii_Mycelial_Growth_and_Rot_Severity_on_Potato_Tubers (consultado, agosto 2021).

Daami, R. M., Khiareddine, H. J., Sdiri, A. and Mahjoub, M. 2010. Effect of Temperature on *Sclerotium rolfsii* Mycelial Growth and Rot Severity on Potato Tubers. The African Journal of Plant Science and Biotechnology©2010 Global Science Books. 54-58 pp. http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/AJPSB_4(SI2)/AJPSB_4(SI2)54-58o.pdf (consultado, septiembre 2020).

Danon, M., Zmora, N.S., Chen, Y. and Hadar, Y. 2007. Prolonged compost curing reduces suppression of *Sclerotium rolfsii*. Soil Biology and Biochemistry. 39: 1936-1946 pp. DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.012

Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma, III Hyphal interactions. Transactions British Mycological Society, Cambridge. 57: 363-369 pp. DOI:10.1016/S0007-1536(71)80050-5

Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.

Díaz-Nájera, J. F., Sahagún-Castellanos, J., Vargas-Hernández, M., Ayvar-Serna, S., Alvarado-Gómez, O. G., Villanueva-Verduzco, C. and Acosta-Ramos, M. 2018. Diagnosis and Integrated Management of Fruit Rot in *Cucurbita argyrosperma*, Caused by *Sclerotium rolfsii*. Plant Pathol J. 34(3): 171–181 pp. DOI: 10.5423/PPJ.OA.08.2017.0185

Ding, S., Meinholz, K., Cleveland, K., Jordan, S. A. and Gevens, A. J. 2019. Diversity and Virulence of *Alternaria* spp. Causing Potato Early Blight and Brown Spot in Wisconsin. Phytopathology. DOI: https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0181-R

Edelstein, L., Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. and Segel, L. A. 1983. A model for fungal colony growth applied to *Sclerotium rolfsii.* J. Gen. Microbiol. 129:1873-1881 pp. DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-129-6-1873

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Hennies, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fruorencence microscopy. Phytopathol. 73-78 pp. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n01_85.PDF (consultado, noviembre 2020).

EPPO. 2004. *Naupactus leucoloma*. EPPO data sheets on quarantine pests. https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/insects/GRAGLE_ds.pdf (consultado, octubre 2020).

FAO. 2005. La economía mundial de la papa. http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/IYP-3es.pdf (consultado, agosto 2020).

FAO. 2008. Año internacional de la papa. Tesoro enterrado. Legado andino. http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/origenes.html (consultado, agosto 2020).

FAO. 2020. FAOSTAT. Cultivos. http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize (consultado, junio 2021).

Fernández, L. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 62: 96-100 pp. http://www.sidalc.net/repdoc/A2120e/A2120e.pdf (consultado, noviembre 2020).

Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Le-Hingrat, Y., Alabouvette, C. and Steinberg, C. 2012. Potato soil-borne diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development 32:93-132. DOI: https://doi.org/10.1007/s13593-011-0035-z

Flores-Moctezuma, S. E, Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A. and Nava-Juárez, R. 2007. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. Crop Protection. 25: 195-201 pp. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.04.007

García-Díaz, O., Robles-Yerena1, L., Camacho-Tapia, M., Leyva-Mir, S.G. y Tovar-Pedraza, J. M. 2017. Etiología y control *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Sacc aislado de tubérculo de

papa (*Solanum tuberosum* L.). Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola. Colegio de Postgraduados, Fitopatología. Revista mexicana de fitopatología. 35: 95. 130S. https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen352017/VOLUMEN_35_SUPLEMENTO_2017.pdf (consultado, mayo 2021).

Gary, J. S. and Prakash, K. H. 2015. *Trichoderma* identification and agricultural applications. *Trichoderma* species descriptions. Chapter 6. The American Phytopathological Society. 73-167 pp. https://www.nhbs.com/trichoderma-identification-and-agricultural-applications-book (consultado, agosto 2021).

Guigón–López, C., Guerrero–Prieto, V., Vargas–Albores, F., Carvajal–Millán, E., Ávila–Quezada, G. D., Bravo–Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista mexicana de fitopatología. 28:2 87-96 pp. http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a2.pdf (consultado, agosto 2021).

Guzmán, V. P., Bravo, L. L., Montes, B. R., Guigón, L. C. and Sepúlveda, J. G. 2014. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum.* European Journal of Plant Pathology. 138. 223-229 pp. DOI: https://doi.org/10.1007/s10658-013-0336-y

Hall, R. 1991. Compendium of Bean Diseases. The American Phytopathological Society, St Paul. M.N. USA. 115 p. https://issuu.com/scisoc/docs/43275

Harman, G. E. 2003. *Trichoderma harzianum, T. viridis, T. koningii, T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). http://www.ibun.unal.edu.co/ r2r7e.html (consultado, agosto 2020).

Harman, G. E. 2004. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Dis. 84: 377-393 pp. DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377

Haram, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathol.86: 980-985 pp.

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n09_980.PDF (consultado, agosto 2020).

Hawkes, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: Potato Genetics. IAB International, Wallingford. 3-42 pp. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9416538 (consultado, agosto 2020).

Hernández, C. F., Cepeda, M., García, C. J. y Pérez, C. A. 2001. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* de la región papera de Toluca estado de México y susceptibilidad in vitro a fungicidas de diferente grupo toxicológico. Agraria. 17(2):59-67 pp. http://www.uaaan.mx/DirInv/portal_agraria/agrariaV/Contenidos_agr_1a/Agraria17_02_01.pdf (consultado, octubre 2020).

Hernández, J. J., Montes, B. R., Flores, M. H., Nava, J. R. y Chanona, P. J. 2004. Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 345-350 pp. https://www.redalyc.org/pdf/612/61222305.pdf (consultado, octubre 2020).

Herrera, J. E. y Scott, G. J. 1993. Factores limitantes a la producción y usos de la papa: resultados de la encuesta a los programas nacionales de América Latina. Revista Latinoamericana de la papa 5:122-134 pp. http://www.papaslatinas.org/ojs/index.php/rev-alap/article/viewFile/63/65 (consultado, octubre 2020).

Hildenbrand, S. and Ninnemann, H. 1994. Kinetics of phytoalexin accumulation in potato tubers of different genotypes infected with *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptic*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 44: 335-347 pp.

Hjeljord, L. and Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma* & *Gliocladium*: Enzymes, biological control and commercial applications. Harman GE, Kubice CP. (Eds). (2) 131-151 pp. Taylor & Francis. DOI: https://doi.org/10.1201/9781482267945

Hooker, W. J. 1981. Common Scab. Compendium of Potato Diseases. American Phyopathological Society. 125 p.

INEGI. 2020. Información de México. Clima. http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/sin/territorio/clima.aspx?tema=meINEGI (consultado, mayo 2021).

Infante, D., Martínez, B., González, N. and Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista Protección Vegetal. La Habana. Vol. 24. (1): 14-21 pp. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002 (consultado, agosto 2020).

INIA. Instituto Nacional de Investigación Agraria. 2002. Dirección General de Investigación. Papa, compendio de información técnicas. Serie Manual R.I. Nº 3. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/862/1/INIAPapa_compendio_informaci%C3%B3n_t%C3%A9cnica.pdf (consultado, agosto 2020).

Iqbal, S. M., Bakash, A., Hussain, S. and Malik, B. A. 1995. Microbial antagonism against *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. *Lens Newsletter*, 22: 48-49 pp.

Ismail, I. M. K., Salama, A. M., Ali, M. and Out, S. A. E. 1989. Bioassy of *Eucalyptus rostrata* leaf extract on *Sclerotium cepivorum* Berk. *Egyptian Journal of Botany.* 32: 109-126 pp.

Jaklitsch, W. M. and Voglmayr, H. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. Studies in Mycology. 80: 1– 87 pp. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001

Khanna, R. N. and Jyotsana, S. 1993. Soil and tuber borne diseases. In: Advances in Hortiuclture, Vol-7, Potato (eds. Chandha KI and Grewal JS), Melhotra Publishing House, New Delhi. 463-490 pp.

Kulkarni, S., Chattannavar, S. N. and Hegde, R. K. 1986. Laboratory evaluation of fungicides against foot rot of wheat caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Pesticides*. 9: 27-31 pp.

Kulkarni, S., Hiremath, R. V. and Padaganur, G. M. 1995. Diseases of potato and their management. Research Highlights on Potato, University of Agricultural Sciences, Dharwad. 22-30 pp.

Kulkarni, V. R. 2007. Epidemiology and integrated management of potato wilt caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. Department of plant pathology college of agriculture, dharwad

university of agricultural sciences. https://www.researchgate.net/publication/268325414 (consultado, agosto 2020).

Lahre, S. K, Khare, N., Lakpale, N. and Chaliganjewar, S. D. 2012. Efficacy of bio-agents and organic amendments against *Sclerotium rolfsii* in, Chickpea. Journal of Plant Disease Sciences. 7:32-34 pp. https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jpds&volume=7&issue=1&article=007

Lapwood, D. H., Read, P. J. and Spokes, J. 1984. Methods for assesing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subsp. a*troseptica* and *carotovora.* Plant Pathology. 33: 13-20 pp. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1984.tb00581.x

Liu, Y. J., Whelen, S. and Hall, B. D.1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. Molecular Biology and Evolution 16: 1799–1808 pp.

Lorenzo, N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana. DOI: 10.13140/RG.2.2.20959.46245

Mahadevakumar, S., Chandana, C., Deepika, Y. S., Sumashri, K.S., Vandana, Y. and Janardhana, G. R. 2018. Pathological studies on the southern blight of China aster (*Callistephus chinensis*) caused by *Sclerotium rolfsii.* Eur J Plant Pathol. 151:1081–1087 pp. DOI: https://doi.org/10.1007/s10658-017-1415-2

Mamun-Or, R., Jian-Hong, L., Qi, L., Ying, W. and Cheng-Gui, H. 2021. Molecular detection and identification of eight potato viruses in Gansu province of China. Current Plant Biology. 25. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100184

Martínez-Martínez, T. O., Guerrero-Aguilar, B. Z., Pecina-Quintero, V., Rivas-Valencia, P., González-Pérez, E. y Angeles-Núñez, J. G. 2020. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 11: 5. DOI: https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2325

Mathur, S. B. and Sarbhoy, A. K. 1977. Chemical analysis of the sclerotia of the fungus *Sclerotium rolfsii* causing root rot of sugarbeet. Indian Phytopathol. 30: 294-95 pp.

Mejdoub-Trabelsi, B., Touihri, S., Ammar, N., Riahi, A. and Daami-Remadi, M. 2019. Effect of chitosan for the control of potato diseases caused by *Fusarium* species. Journal of Phytopathology. 168. 18-27 pp. DOI: https://doi.org/10.1111/jph.12847

Mullen, J. 2001. Southern blight, Southern stem blight, White mold. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.

Narain, A. and Satpathi, J. N. 1977. Antifungal characteristics of *vinca rosea* extracts. *Indian Phytopathology.* 30: 36-40 pp. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IN19780348449

Nargund, V. B. 1981. Studies on foot rot of wheat caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. In Karnataka. *M.Sc. (Agri.) Thesis*, University of Agricultural Sciences, Bangalore. https://eurekamag.com/research/001/468/001468635.php

Nie, X., Singh, M., Chen, D., Gilchrist, C., Soqrat, Y., Shukla, M., Creelman, A., Dickison, V., Nie, B., Lavoie, J. and Bisht, V. 2021. Development of High-Resolution DNA Melting Analysis for Simultaneous Detection of Potato Mop-Top Virus and Its Vector, *Spongospora subterranea*, in Soil. *Plant Disease.* DOI:10.1094/pdis-06-20-1321-re

Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola.* Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstw. Berlin-Dahlem. 169: 1-117 pp.

Núñez, A. E., Carrión, G., Núñez, M. C. y Rebolledo, O. 2003. Densidad de población de quistes de *Globodera rostochiensis* Woll en el Cofre de Perote, Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(2): 207-213 pp. http://www.redalyc.org/pdf/612/61221216.pdf (consultado, octubre 2020).

Okereke, V. C. and Wokocha, R. C. 2007. *In vitro* growth of four isolates of *Sclerotium rolfsii* Sacc in the humid tropics. African Journal of Biotechnology. 6:16 1879-1881 pp. DOI: 10.5897/AJB2007.000-2279

Ortega, G. J. G. 2010. Diagnóstico de hongos fitopatógenos de jitomate y efecto de Trichoderma asperellum Tc74 sobre Fusarium spp. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de

Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 82 p. http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/7271

Pacheco, K. R., Viscardi, B. S., Vasconcelos, T. M., Moreira, G. A., Vale, H. M. and Blum, L. E. 2016. Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii.* Biosci. J., Uberlândia. 32:2. 412-421 pp. DOI: https://doi.org/10.14393/BJ-v32n2a2016-32732

Paparu, P., Acur, A., Kato, F., Acam, C., Nakibuule, J., Nkuboye, A., Musoke, S. and Mukankusi, C. 2020. Morphological and Pathogenic Characterization of *Sclerotium rolfsii*, the Causal Agent of Southern Blight Disease on Common Bean in Uganda. DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2144-RE

Pérez, N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 p. https://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecoplagas/Bibliografia.pdf

Prasad, L. S., Sujatha, K., Naresh, N. and Chander, S. R. 2012. Variability in *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot of sunflower. Indian Phytopath. 65(2): 161-165 pp. DOI: 10.13140/2.1.3722.8168

Punja, Z. K. 1996. Influence of nitrogen and calcium compounds on development of disease due to *Scleorotium rolfsii.* APS PRESS. St. Paul Minnesota, U. S. A. 217 p. DOI: https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026706

Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii. Annual Review of Phytopathology.* 23: 97-127 pp. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000525

Punja, Z. K., Smith, V. L., Campbell, C. L. and Jenkins, S. F. 1985. Sampling and extraction procedures to estimate numbers, spatial pattern, and temporal distribution of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. Plant Disease 69: 469-474 pp. https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1985Articles/PlantDisease69n06_469.pdf

Pushpavathi, B. and Rao, K. C. 1998. Biological control of *Sclerotium rolfsii* the incitant of groundnut stem rot. *Indian Journal of Plant Protection.* 26: 149-154 pp

Qaim, M. 1999. Potential Benefits of Agricultural Biotechnology: An Example from the Mexican Potato Sector. Applied Economic Perspectives and Policy, 21(2): 390-408 pp. DOI: https://doi.org/10.2307/1349887

Rabinal, C. and Bhat, S. 2019. Identifcation of Diferentially Expressed Genes in Trichoderma koningii IABT1252 During Its Interaction with *Sclerotium rolfsii.* DOI: https://doi.org/10.1007/s00284-019-01838-x

Rai, S., Kumar, S. M., Chandrol, S. A. and Surapathrudu, K. 2019. Biocontrol potential of *Trichoderma* spp.: current understandings and future outlooks on molecular techniques. ICAR-National Bureau of Agriculturally Important Microorganisms, Mau, Uttar Pradesh, India. 7 129-160 pp. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_7

Rifai, M. A. 1969. A revisión of the genus *Trichoderma.* Mycological Papers 116: 1-56 pp. https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkozje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=57038

Roca, L. F., Raya, M.C., Luque, F., Brisach, C.A., Romero, J. and Trapero, A. 2016. First Report of *Sclerotium rolfsii* Causing Soft Rot of Potato Tubers in Spain. The American Phytopathological Society (APS). DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1505-PDN

Rodríguez, K. R., Robertson, D. G., Wells, L., King, P. S. 1991. Soybean peanut rotations for management of *Meloidogyne arenaria* and *Sclerotium rolfsii*. *Nematropica*. 21 (2): 147-154 pp. https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/64008

Rodríguez, K. R., Robertson, D. G., Wells, L., King, P. S. 1991. Cotton as a rotation crop for management of *Meloidogyne arenaria* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. *Journal of Nematology*. 23: 652-657 pp. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619203/pdf/652.pdf

Rolfs, P. H. 1893. The tomato and some of its diseases. Florida Agricultural Experiment Station Technical, Bulletin 21: 1-38 pp. https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uiug.30112019473252&view=1up&seq=8

Román, C. M. y Hurtado, G. 2002. Guía técnica. Cultivo de papa. Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal. https://drive.google.com/file/d/0BzrLcZgwqCAUQ0RLdVNzeHBQTVU/view

Sabbagh-Sánchez, A., García-Salazar, J. A., Matus-Gardea, J. A., Jiménez-Sánchez, L. y Hernández-Juárez, M. 2011. Comportamiento del consumo de papa (*Solanum tuberosum* L.) fresca en México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 2:4. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000400007

Saccardo, P. A. 1911. Notae mycologicae. Annales Mycologici. 9: 249-257 pp.

Salaman, R. N. and Burton, W. G. 1985. The history and social influence of the potato. Cambridge University Press. https://www.amazon.es/History-Influence-Cambridge-Paperback-Library/dp/0521316235

Sarvamangala, H. A., Govindaiah, and Datta, R. K. 1993. Evaluation of plant extracts for the control of fungal diseases of mulberry. *Indian Phytopathology.* 46:398-401 pp. https://eurekamag.com/research/002/375/002375562.php

Sarwar, A., Latif, Z., Zhang, S., Zhu, J., Zechel, D. L. and Bechthold, A.2018. Biological Control of Potato Common Scab With Rare Isatropolone C Compound Produced by Plant Growth Promoting *Streptomyces* A1RT. Frontiers in Microbiology. 9. 1126 pp. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01126

Seshar, K. K. 2002. Use of phytochemicals in the management of stem rot of groundnut caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *M.Sc. (Agri.) Thesis*, University of Agricultural Sciences Dharwad.

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. https://blogagricultura.com/municipios-productores-papa-2018/ (consultado, agosto 2020).

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do (consultado, junio 2021).

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Avance de siembras y cosechas.http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do (consultado, agosto 2020).

Singh, R. K. and Dwivedi, R. S. 1991. Ecology and biology of *Sclerotium rolfsii* Sacc. International Journal of Tropical Plant Diseases 9: 161-171 pp.

Solaman, R. N. 1985. The History and social Influence of Potato. Cambridge. 456 p.

Spooner, D. M. y Knapp, S. 2013. *Solanum tuberosum*. http://solanaceaesource.org/content/solanum-tuberosum (consultado, septiembre, 2020).

Spooner, D. M. and Salas, A. 2006. Structure, biosystematics, and genetic resources. In Gopal J, Khurana SMP, eds. Handbook of potato production, improvement and postharvest management. Food Products Press, Binghamton, NY. 1-39 pp.

Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D. and Weingartner, D. P. 2001. Compendium of potato diseases, 2nd edn. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.06934.x

Van-Bezooijen, J. 2006. Methods and Techniques for Nematology, Revised Version. Wageningen, Netherlands. http://www.nematologia.com.br/files/tematicos/5.pdf

Vero, S. M. y Mondino, P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura Internacional.7: 1-10 pp. http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/art_horticultura.pdf

Vineela, D. R. S., Beura, S. K., Dhal, A. and Swain, S. K. 2020. Efficacy of bio-agents, botanicals, organic amendments against groundnut pathogens *Sclerotium rolfsii* and *Aspergillus niger in-vitro.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 9:3 1206-1210 pp. https://www.phytojournal.com/archives/2020/vol9issue3/PartT/9-3-134-749.pdf (consultado, agosto 2021).

Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Taylor, M., MacKerron, D. and Ross, H. A. 2007. Potato biology and biotechnology: Advances and perspectives. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 219-236 pp. ISBN: 0444510184,9780444510181,9780080525051. http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Cultures/Potato-Biology-and-Biotechnology.pdf

Wakil, A. A. and Ghonim, M. L. 2000. Survey of seed borne mycoflora of peanut and their control. *Egyptian Journal of Agricultural Research.* 78: 47-61 pp.

Watanabe, T. Morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed. CRC Press; Washington DC, USA: 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi; 500 p. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=gq8h2Q6KckEC&oi=fnd&pg=PP1&ots=d9-cI2mEPz&sig=6FVyYdpCO7JYSSLsN0tsBI6dpMM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. Part Three. Genetics and Evolution. 315-322 pp.

Willetts, H. J. 1972. The morphogenesis and possible evolutionary origins of fun-gal sclerotia. Biol. Rev. 47: 515-36 pp.

Xiaoqing, H., Ziyue, Y., Yang, L., Chengji, Y., Jie, R., Yanlin, L., Guangjing, W., Pan, D. and Maozhi, R. 2021. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans*, the pathogen of potato late blight. International Journal of Biological Macromolecules. 166. 1365-1376 pp. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.016

Zhou, L., Huang, P., Yu, L., Sun, M. and Fang, Y. 2019. Southern Blight on Macleaya microcarpa Caused by *Sclerotium rolfsii* in China. DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2172-PDN

Zimand, G. and Elad-Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* phatogenicity. Phytopathol. 86: 125-126 pp. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n11_1255.PDF

Zúñiga, M. and Ceja-Torres, L. F. 2017. In vitro antagonism of *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium cepivorum* Berk. and *S. rolfsii* Sacc., causal agents of onion rot. hyton-international Journal of Experimental Botany. 86: 7-13 pp. DOI: 10.32604/phyton.2017.86.007

XII. ANEXOS

1. Hipoclorito 1%

Cloro comercial (Cloralex)……. 83.333 ml

Agua destilada……..... 916.667 ml

2. Etanol al 70%

Etanol absoluto…… 700 ml

Agua destilada…… 300 ml

3. Caldo nutritivo

Caldo nutritivo…… 8 g

Agua destilada……. 1000 ml

4. Agar Dextrosa y Papa (PDA)*

PDA……. 39 g

Agua destilada……. 1000 ml

*El medio PDA se prepara acidificado añadiendo 10% (v/v) de ácido tartárico.

5. Acido Tartárico 10%

Ácido tartárico…… 10 g

Agua destilada…… 100 ml

6. Solución CTAB 2%

CTAB……..	20 g
NaCl……	82 g
Tris (Base)…….	12.100 g
EDTA…….	7.400 g
Agua destilada……	1000 ml

7. Búfer TAE 50X (Tris-Ácido acético-EDTA)

Tris Base…….	242 g
Ácido acético glacial*….	57.1 ml
EDTA……..	18.61 g
Agua destilada……	942.9l ml

8. Búfer TAE 1X

Búfer TAE 50X……..	20 ml
Agua destilada……	980 ml

9. Gel de Agarosa al 1%

Búfer TAE 1X…….	80 ml
Agarosa……	0.8 g

10. Gel de agarosa al 1.5%

Búfer TAE 1X……. 80 ml

Agarosa……... 1.2 g

11. Gel de agarosa al 2%

Búfer TAE 1X……. 80 ml

Agarosa…….. 1.6 g

12. Spezieller Nährstoffarmer Agar (por sus siglas en alemán) (SNA)

KH_2PO_4..... 1 g

KNO_3..... 1 g

$MgSO_4 7H_2O$…… 0.5 g

KCI……. 0.5 g

Glucosa…… 0.2 g

Sacarosa……... 0.2 g

Agar……. 20 g

Agua destilada…….. 1000 ml

Este medio ha sido descrito originalmente para las características de especies de *Fusarium*, en el cual se incluyen piezas de papel estériles En este caso se omitirá esa parte.

13. Cornmeal dextrosa agar

Cornmeal……	2 g
Dextrosa…….	10 g
Agar……	15 g
Agua destilada……...	1000 ml