

## Antagonismo de *Trichoderma* sp. sobre *Ralstonia solanacearum* de banano clon “Gran Enano”

Miguel Salvador-Adriano, Nancy López-Trejo, Benjamín Moreno-Castillo, Rito Coronel-Niño, Miguel Salvador-Figueroa, María de Lourdes Adriano-Anaya\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

Las plantas de banano (*Musa paradisiaca*) son susceptibles a diferentes agentes microbianos que les causan enfermedades. Una de estas enfermedades es el Moko bacteriano causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de *R. solanacearum*. Se aislaron siete cepas de la bacteria a partir de plantas de banano con síntomas de Moko bacteriano, de las cuales tres fueron morfológica, bioquímica y molecularmente identificadas como *R. solanacearum*. Para las pruebas de antagonismo se emplearon dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. El análisis molecular de las cepas las identificó como *T. asperellum* y *T. atroviride*, y fueron marcadas como Jc 01 y Ban 1, respectivamente. El enfrentamiento inicial de los fermentados libres de células de la cepa *T. asperellum* Jc01 mostró mayor capacidad antagónica contra *R. solanacearum*. *T. asperellum* Jc01 fue crecida en medio líquido por 5, 10 y 14 días, encontrando la mayor capacidad antagónica (37 %) del fermentado libre de células a los 5 días. Independientemente del tiempo de fermentación, el sobrenadante sin filtrar inhibió totalmente el crecimiento de *R. solanacearum*. Se enfatiza en la actividad antibacteriana de *T. asperellum* Jc01 y se especula sobre el mecanismo inhibitorio.

### Palabras clave:

Banano  
Control biológico  
*Trichoderma* spp.  
Moko bacteriano

### Keywords:

Banana  
Biological control  
*Trichoderma* spp.  
Blood disease bacterium

## Antagonism of *Trichoderma* sp. on *Ralstonia solanacearum* from banana clone “Gran Enano”

### Abstract

Banana (*Musa paradisiaca*) plants are susceptible to different microbial agents that cause diseases. One of these diseases is Bacterial Moko (BM) caused by *Ralstonia solanacearum*. The objective of this work was to determine the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. on the development of *R. solanacearum*. Seven strains of the bacterium were isolated from banana plants with BM symptoms, three strains were morphologically, biochemically and molecularly identified as *R. solanacearum*. Two native strains of *Trichoderma* sp. were used for antagonism tests. Molecular analysis of the fungal strains identified them as *T. asperellum* and *T. atroviride*, and were marked as Jc 01 and Ban 1, respectively. The initial confrontation of the fermented and cell-free culture medium showed a greater antagonistic capacity of *T. asperellum* Jc 01. *T. asperellum* Jc01 was grown in liquid medium for 5, 10 and 14 days, finding the highest antagonistic capacity (37 %) of the fermented and cell-free culture media at 5 days. Regardless of the fermentation time, the unfiltered supernatant totally inhibited the growth of *R. solanacearum*. The antibacterial activity of *T. asperellum* Jc01 is emphasized and speculated on the inhibitory mechanism.

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número, Colonia  
Solidaridad 2000, C.P.  
30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972.  
Correo-electrónico:  
maria.adriano@unach.mx

## 1. Introducción

En México, el banano (fruto) es producido en una superficie de 41,646.39 ha distribuidas en los litorales del Golfo de México y del Océano Pacífico. Los principales estados que cultivan banano son Chiapas, Veracruz, Tabasco, Nayarit y Colima, en los cuales se siembra el 80 % de la superficie nacional (SIAP, 2025). La planta de banano es susceptible a distintas enfermedades, entre las que destacan: Sigatoka negra, producida por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *Difformis*, pudrición acuosa del pseudotallo cuyo agente etiológico es *Dickeya chrysanthemi*, Mal de Panamá, producido por *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium* sp. *Cubense*, y Moko bacteriano causado por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, las que pueden provocar pérdidas hasta del 100 % de la cosecha (Ceballos et al., 2014).

Los síntomas del Moko bacteriano son: hojas secas en sus bordes seguidas de una franja de color amarillo intenso y quebradizo (en las plantas que aún no han entrado en producción, la hoja bandera es la última en presentar los síntomas), rebrotes pequeños, retorcidos y de color negro, y racimos y dedos deformes. El Moko bacteriano no puede curarse por lo que una planta enferma debe eliminarse y, para evitar la propagación a otros sitios del cultivo, poner en cuarentena todas las plantas de su alrededor (Obregón et al., 2008).

Para prevenir el Moko bacteriano, las plántulas son tratadas con oxiclورو de cobre, sulfato cúprico, óxido cuproso, kasugamicina o estreptomycin antes del trasplante y, tras el trasplante, aplicar mezclas de Mancozeb y cobre. Sin embargo, por el impacto negativo en el ambiente y su toxicidad para el hombre, el empleo de dichos productos fue prohibido (Rueda-Puente et al., 2014). Ceballos et al. (2014) evaluaron en el banano Dominico Hartón crecido en invernadero, la actividad antagonista de *Trichoderma viride* (50 mL de una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios de *T. viride* mL<sup>-1</sup> por planta) contra *R. solanacearum*. Después de un mes de la inoculación de *T. viride* aplicaron, mediante punción, en la raíz 50 mL de *R. solanacearum* a concentraciones de  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Encontraron reducción en la severidad de la enfermedad. Por su parte, Manoj y Ganesan (2006), Murthy et al. (2013) y Yendyo et al. (2017) evaluaron, en campo, la actividad antagonista de diferentes especies de *Trichoderma* aislados de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) contra *R. solanacearum*. El periodo de evaluación comprendió de 4 a 8 semanas y las aplicaciones fueron en la zona rizosférica, reportando menor incidencia (3 % – 50 %) de la enfermedad en las aplicaciones de  $1 \times 10^9$  conidios mL<sup>-1</sup>,  $7 \times 10^9$  conidios mL<sup>-1</sup> y  $7.4 \times 10^9$  conidios mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma* sp., *T. harzianum* y *T. viride*, respectivamente.

La capacidad biológica antagonista de *Trichoderma*, como la de todas las actividades biológicas de todos los microorganismos, depende de la especie, la variante de la especie, de la forma de producirlo, del tipo de planta cultivada y de las condiciones edafoclimáticas donde es realizada la actividad agrícola, por lo que el empleo de

microbiota autóctona tiene ventajas sobre las formulaciones comerciales. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp. sobre el desarrollo de *Ralstonia solanacearum* aislada de banano clon “Gran Enano”.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Zona de estudio

El trabajo fue realizado en el laboratorio de “Agricultura Sustentable” del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas y los microorganismos fueron aislados de plantas de banano clon “Gran Enano” ubicado en la región Soconusco del estado de Chiapas, México.

### 2.2. Aislamiento y purificación de *R. solanacearum*

Muestras de fruto, cormo o rizoma, y raquis de plantas de banano con síntomas de Moko bacteriano fueron colectadas en el Sector de Producción Mazatán R. S. M. en Mazatán, Chiapas, México. Las muestras fueron trasladadas en frío (8 °C), al laboratorio. Una vez en el laboratorio todo procedimiento fue realizado bajo condiciones asépticas. A las fitomuestras primeramente se les retiró, con un bisturí, la parte externa con el fin de disminuir la probabilidad de contaminación con otros microorganismos que pudiesen estar presentes en el órgano en cuestión, hasta obtener un volumen aproximado de 1 cm<sup>3</sup>. Posteriormente, el tejido fue macerado en 10 mL de agua estéril y el macerado fue centrifugadas a 5,000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido fue sometido a diluciones seriadas hasta 10<sup>-3</sup> con agua destilada estéril. De las diferentes diluciones se tomaron 100 µL y se inocularon por triplicado en placas de Petri que contenían medio SMSA modificado (Engelbrecht, 1994). Las placas inoculadas fueron incubadas a 28 °C por 120 h en una estufa de cultivo (Precision FSF5X204A). Las placas fueron revisadas diariamente y una vez observado desarrollo de colonia bacteriana se retiró una muestra, mediante punción en el centro de la colonia. Las muestras fueron colocadas individualmente en placas de Petri que contenían medio SMSA modificado y fueron cultivadas, bajo las condiciones previamente mencionadas, hasta observar claramente las características de la colonia (Figura 1).

Las colonias seleccionadas tuvieron apariencia mucosa, de color rojizo, borde irregular y halo claro. (Álvarez et al., 2008). Las colonias que no presentaron los caracteres anteriores fueron desechadas.

### 2.3. Pruebas bioquímicas para la identificación de *R. solanacearum*

Las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias fueron tinción de Gram (Suslow et al., 1982), oxidasa (Schaad et al., 2001), dihidrolasa de arginina (Thornley, 1960), hidrólisis de almidón y licuefacción de gelatina (Hayward, 1964), para ello las bacterias fueron crecidas en caldo nutritivo durante 36 h a 150 rpm en agitador orbital (Luzeren HZ-300) y posteriormente inoculadas en placas de Petri conteniendo el medio respectivo.

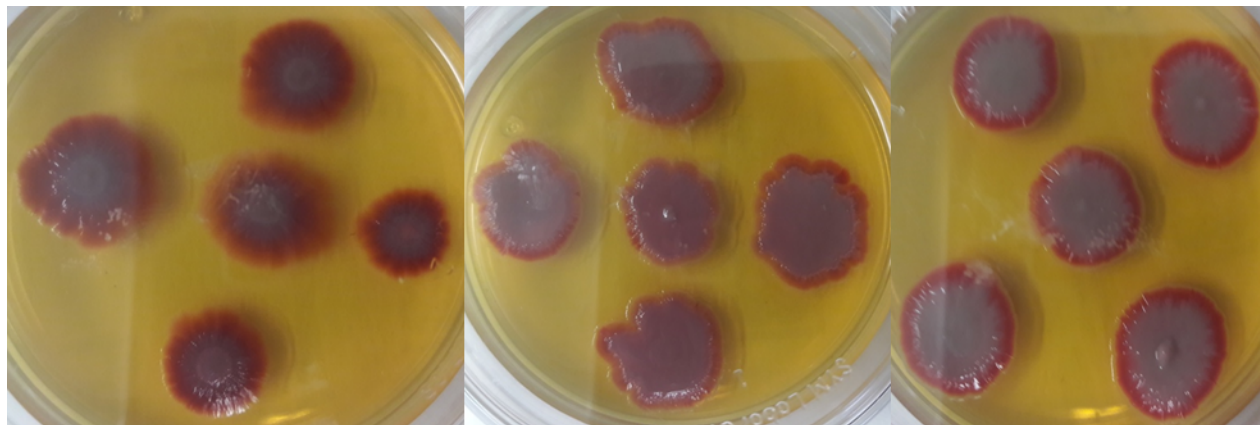


**Figura 1.** Fotografía de colonias bacterianas, aparentemente *Ralstonia solanacearum*, aisladas y desarrolladas en medio de cultivo SMSA modificado (Engelbrecht, 1994).

#### 2.4. Identificación molecular de *R. solanacearum*

La extracción del ADN se realizó de colonias de *R. solanacearum* desarrolladas por 24 h a 28 °C en medio de cultivo SMSA. La extracción se realizó mediante lisis por calor a 80 °C por 5 min. La confirmación de la especie en todas las cepas de *R. solanacearum*, se realizó por PCR mediante la utilización de los oligonucleótidos 759/760 (5' GTCGCCGTCAACTCACTTCC 3' y 5' GTCGCCGTGTCAGCAATGCGGAATCG 3') (Opina et al., 1997). La reacción de PCR se realizó en un termociclador (TECHNE TC-3000). El contenido de la mezcla de reacción fue: 30 ng de DNA genómico, 2.5 µL de buffer de PCR 10×, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer y 2.5 mM de ADN Taq polimerasa. La amplificación del ADN se realizó a 94 °C por 15 s, seguido por 30 °C por 58 s, 72 °C por 30 s/30 ciclos, 72 °C por 5 min. Alícuotas de 10 µL de los productos de PCR, se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, se tiñeron con Syber Safe (Thermo Fisher Scientific) y el gel se reveló bajo luz UV en un foto-documentador (Gel Doc™ EZ Imagen BIO-RAD). La presencia de una banda de 280 pb confirmó a la especie. En la electroforesis se usó un marcador de 100 pb como estándar.

#### 2.5. Reactivación y crecimiento de *Trichoderma* sp.

Dos cepas de *Trichoderma* sp., una aislada de suelo bananero e identificada como Ban1 y la otra del tallo de *Jatropha curcas* e identificada como Jc01, de la colección del Instituto de Biociencias (IBC), fueron reactivadas, y crecidas, en medio de cultivo Agar Dextrosa Papa (ADP).

#### 2.6. Identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* sp.

Para la identificación de las cepas de *Trichoderma* sp. primeramente, fueron crecidas en medio Caldo Dextrosa Papa (CDP) a 150 rpm en agitador orbital, después de 7 días de crecimiento se procedió a centrifugar (Eppendorf 5403) a 10,000 rpm por 15 min. La pastilla celular fue recuperada para la posterior extracción de ADN empleando al protocolo

de Johanson (1995). Para la amplificación específica, mediante PCR, fueron utilizados los iniciadores ITS4/ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3' y 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). La mezcla de reacción estuvo constituida por: 14.25 µL de H<sub>2</sub>O, 5 µL de Buffer 5×, 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µL de cada iniciador, 0.5 µL de dNTPs, 0.25 µL de Taq polimerasa y 1 µL de ADN genómico en un volumen total de 25 µL. Posteriormente los tubos de PCR se colocaron en un termociclador (TECHNE TC-3000) y se programó en los siguientes ciclos: desnaturalización inicial por 5 min a 95 °C, 35 ciclos de desnaturalización 95 °C por 0.5 min, alineamiento 60 °C por 0.5 min, extensión 72 °C por 1 min y extensión final 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, el gel se reveló bajo luz UV en un foto-documentador (Gel Doc™ EZ Imagen BIO-RAD). Una vez corroborada la integridad y cantidad de DNA las muestras se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Posteriormente fueron identificadas mediante la herramienta BLAST.

#### 2.7. Cultivo de *Trichoderma* sp.

El crecimiento de *Trichoderma* fue realizado en medio líquido (papa-dextrosa), 6.5 de pH, 28 °C de temperatura y 150 rpm de agitación orbital durante 120, 240 y 360 h. Cada 24 h se obtuvo muestra del medio de cultivo y fue determinado el pH, la concentración de azúcares reductores y la biomasa. La actividad antagónica (bactericida) fue determinada exclusivamente al concluir el tiempo de fermentación.

Las muestras fueron centrifugadas (Eppendorf 5403) a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C y se separó, por decantación, el paquete celular del sobrenadante, el cual fue filtrado a través de membrana (Ahalstrom ReliaPrep™) con poro de 0.20 µm y jeringa estéril para su posterior empleo. El pH del medio de cultivo de *Trichoderma* sp., fue determinado con un potenciómetro (OHAUS Starter 2100) colocado sobre el sobrenadante libre de células.

La concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo de *Trichoderma* sp. fue determinada mediante el método de DNS (Kim et al., 2012).

Para la determinación de biomasa, se procedió al secado de los tubos conteniendo el paquete celular colectada anteriormente colocándolos en horno de secado (Felisa FE-291D) durante 24 h a 65 °C, posteriormente se colocaron en desecador (Nalgene) durante 2 h para finalmente registrar el peso con ayuda de balanza analítica (Practum, Sartorius).

2.8. Inhibición del crecimiento de la colonia de *R. solanacearum* (Bioensayo)

El bioensayo fue realizado en placas de Petri con medio de cultivo SMSA formulado con 50 % del fermentado libre de células de *Trichoderma*. La siembra de la bacteria fue realizada por triplicado, mediante punción con palillo estéril de madera, y el diámetro fue determinado 24 h después de iniciado el bioensayo. En cada caja de Petri fueron colocadas cinco colonias por placa. El procedimiento fue realizado de la misma manera para el sobrenadante sin filtrar.

3. Resultados

De las muestras de las diferentes partes del banano analizadas, siete cepas con características similares a *R. solanacearum* (Figura 1) fueron aisladas, tres del cormo, tres del raquis y una de fruto. Las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas mostraron (Cuadro 1) que tres de ellas, R1-5, R1-6 y R1-7, concordaron con lo reportado, en la literatura (Perea et al., 2011), para *R. solanacearum*. La presencia de una banda de 280 pb en las cepas empleadas en la identificación molecular confirmó que pertenecían a la especie *R. solanacearum* (Figura 2).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de *Ralstonia solanacearum*.

| Prueba   | Cepa |      |      |      |      |      |      |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|
|          | R1.5 | R1.6 | F1.8 | R1.7 | C1.3 | C1.1 | C1.2 |
| Gram     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Oxidasa  | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
| Almidón  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Gelatina | -    | -    | -    | -    | -    | +    | +    |
| Arginina | -    | -    | +    | -    | +    | +    | -    |

R = raquis; F = fruto; C = cormo.

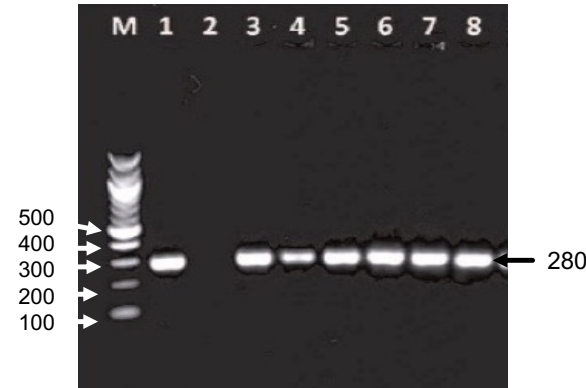


Figura 2. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos 759/760. M= Marcador de peso molecular; 1= control positivo; 2 =control negativo; 3 y 4 = cepa R1.5; 5 y 6= cepa R1.6; 7 y 8 cepa R1.7.

Por su parte el análisis BLAST de la secuencia de los amplificados obtenidos con los iniciadores ITS4/ITS5 (Figura 3) de las dos cepas de los hongos analizados, tuvieron 92 % de similitud con *T. atroviride*, la identificada como Ban1, y *T. asperellum*, la identificada como Jc01.



Figura 3. Secuencia de los amplificados de las cepas de *Trichoderma*. 1: aislado de suelo de banano y 2: aislado de tallo de *J. curcas* empleando los iniciadores ITS4/ITS5.

El enfrentamiento inicial de las cepas de *R. solanacearum*. y los fermentados libres de células de los *Trichodermas*, mostró mayor capacidad de antagonismo de *T. asperellum*

Jc01 (Figura 4), motivo por el cual fue la única cepa que se siguió estudiando.

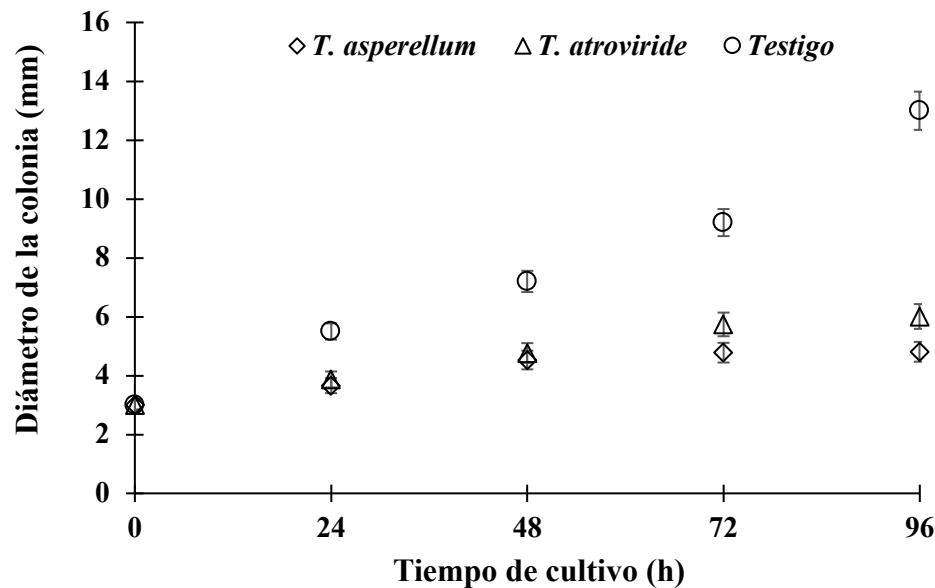


**Figura 4.** Diámetro de la colonia de *Ralstonia solanacearum* crecida en presencia del fermentado libre de células de *T. asperellum* Jc01 y *T. atroviride* Ban01.

En la Figura 5 se muestra la cinética de crecimiento de *T. asperellum* Jc 01. Después de 120 horas de cultivo, la biomasa inicial ( $1.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) fue decuplicada ( $12.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), el 78 % de los azúcares reductores iniciales fueron consumidos y el pH del medio de cultivo fue acidificado 0.67

unidades. Similares cantidades de biomasa fueron encontradas en los crecimientos a 240 y 360 h donde los azúcares reductores fueron totalmente consumidos y el pH del medio de cultivo no fue inferior el valor de 5.0.

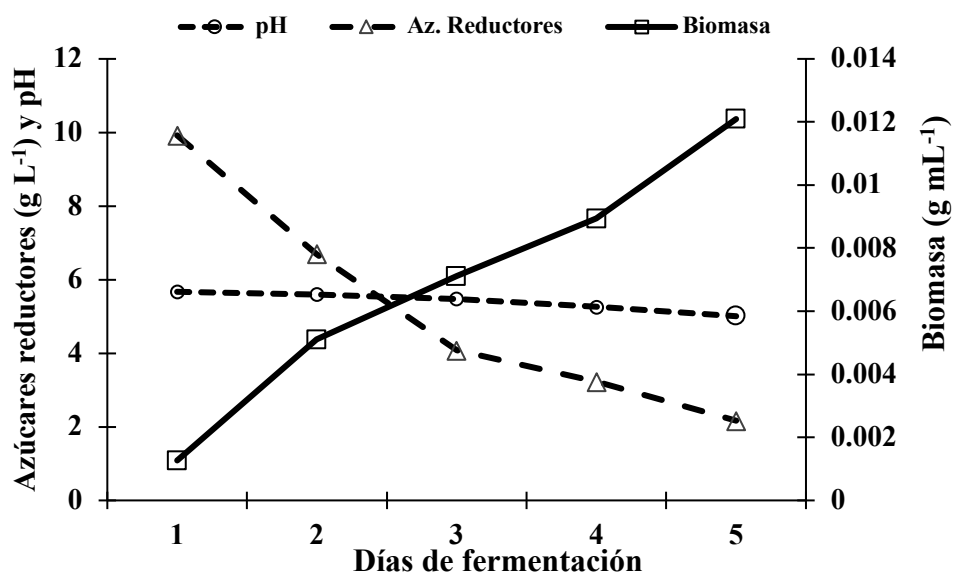


**Figura 5.** Cinética de crecimiento de *Trichoderma asperellum* Jc01.

El nivel de inhibición del desarrollo de la colonia de *R. solanacearum*, imputable a los metabolitos presentes en el

medio de cultivo de *T. asperellum* Jc01, se muestra en la Figura 6. Como se puede observar, a las 120 h de

fermentación fue encontrada la mayor capacidad antagónica (37 %). En los fermentados de 240 y 360 h la inhibición fue, en promedio, 60 % menor a lo observado en el fermentado de 120 h. Por su parte en las placas de Petri formuladas con

fermentado que incluían al hongo, el crecimiento de *R. solanacearum* fue totalmente inhibido (Figura 7). Lo anterior fue independiente del tiempo de fermentación.

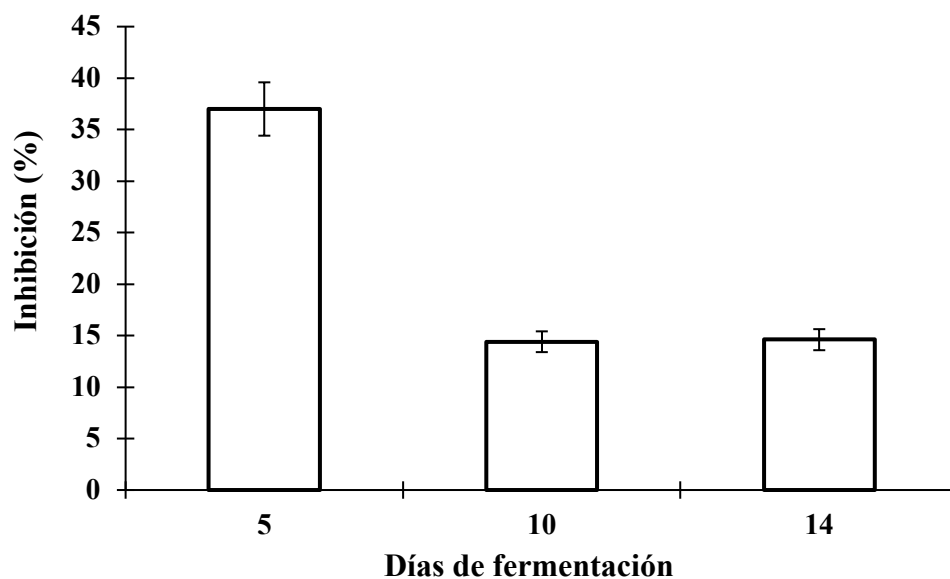


**Figura 6.** Inhibición (%) del desarrollo de la colonia de *R. solanacearum* crecida en presencia del fermentado libre de células, de *T. asperellum* Jc01.

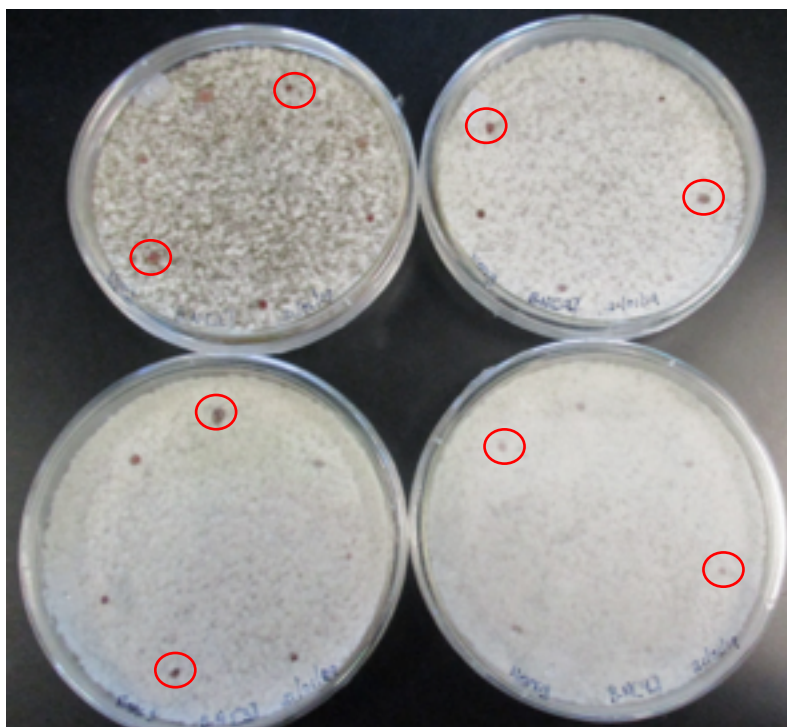


**Figura 7.** Desarrollo de la colonia de *R. solanacearum* desarrollado en medio de cultivo suplementado con el fermentado de *T. asperellum* Jc01.

#### 4. Discusión

Las cepas bacterianas identificadas morfológica, bioquímica y molecularmente como *R. solanacearum* (Figuras 1 y 2; Cuadro 1) fueron aisladas del cormo de las plantas enfermas, lo que significa que no fueron transmitidas a través del manejo de las plantas (por heridas provocadas por los instrumentos de campo). Lo anterior también concuerda con lo reportado para infecciones obtenidas a través de la raíz ya que los síntomas iniciaron en las hojas de mayor edad y concluyeron en la hoja “bandera” (SENASICA, 2016). Las cepas que morfológicamente fueron similares a *R. solanacearum*, pero que no expresaron el 100 % de las pruebas bioquímicas, pudieran ser variantes no virulentas de dicha bacteria (Hernández, 2010).

Aunque actualmente el género *Trichoderma* está constituido por más de 100 especies (Druzhinina et al., 2006), las dos cepas incluidas inicialmente en este estudio fueron identificadas como *T. atroviride* y *T. asperellum* (Figura 2). De ellas *T. asperellum* mostró mayor capacidad antagónica contra *R. solanacearum* (Figura 3). Lo anterior concuerda con lo reportado por Harman (2006) y Martínez et al. (2008) respecto a que la capacidad antagónica de las especies de *Trichoderma* es variable y que dicha capacidad depende de la cepa y del mecanismo de acción (Arcia, 1995; El-Komy et al., 2015). Las condiciones de desarrollo (crecimiento) de la cepa de *T. asperellum* Jc 01, concuerdan con los rangos óptimos reportados para esta especie. En este sentido Martínez et al. (2013) reportaron que todas las especies de *Trichoderma* son aerobias, tienen un rango óptimo de crecimiento en temperaturas entre 25 °C - 30 °C y pH entre 5.0 - 6.5.

Por otra parte, el género *Trichoderma* se ha distinguido por que muchos de sus miembros, incluyendo *T. asperellum*, tienen actividad antagónica contra hongos fitopatógenos, principalmente contra especies del género *Fusarium* (El-Komy et al., 2015; Martínez-Coca et al., 2018; Reyes et al., 2016; Silva-Martínez et al., 2016; Wu et al., 2017). La actividad antibacteriana escasamente se ha reportado (Ceballos et al., 2014). La actividad antibacteriana del fermentado libre de células de *T. asperellum* Jc 01 (Figura 4) orienta a pensar en la producción de algunos metabolitos secundarios con dicha capacidad; metabolitos diferentes a los reportados con actividad antibiótica contra hongos (Infante et al., 2009). Por otro lado, la magnitud máxima de la actividad antibacteriana del fermentado libre de células de *T. asperellum* Jc01 (Figura 4) fue menor tanto para lo reportado para *Trichoderma* sp. (Ceballos et al., 2014) y *T. asperellum* (Murthy et al., 2013), como para la actividad antifúngica ya que esta última puede ser hasta del 80 %, dependiendo de la cepa de *T. asperellum* y de la cepa de *Fusarium* (Martínez-Coca et al., 2018). Así mismo, la disminución en la actividad antibacteriana observada en las fermentaciones de 10 días y 14 días (Figura 5) pudiera deberse a que dichos metabolitos son sensibles a la luz (la fermentación se realizó bajo esta

condición) o son sujetos a biotransformación por el mismo hongo.

La falta de desarrollo de *R. solanacearum* observada cuando se empleó el medio de cultivo sin filtración (Figura 6) pudiera explicarse a través de los otros mecanismos demostrados en la inhibición del desarrollo de hongos. Entre estos están el de micoparasitismo (Kuzmanovska et al., 2018; Peláez-Álvarez et al., 2016; Reyes et al., 2016; Wu et al., 2017), la competencia por espacio y nutrientes (Kuzmanovska et al., 2018; Martínez-Coca et al., 2018; Silva-Martínez et al., 2016) o algún otro mecanismo de regulación biológica (Hoyos et al., 2008).

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Referencias

- Álvarez J, Rodríguez P, Marín M. 2008. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology*, 33, 197-203.
- Arcia A. 1995. Uso de antagonistas en el control de fitopatógenos del suelo. Universidad Centro Occidental (UCLA). Barquisimeto, Venezuela. 20 p.
- Ceballos G, Álvarez E, Bolaños M. 2014. Reducción de poblaciones de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (*Musa AAB Simmonds*) con aplicación de extractos de *Trichoderma* sp. (Alexopoulos y Mims) y bacterias antagonistas. *Acta Agronómica*, 63, 1-8.
- Druzhinina I, Kopchinskiy A, Kubicek C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47, 55-64.
- El-Komy MH, Saleh AA, Eranthodi A, Molan YY. 2015. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* Wilt. *Plant Pathology Journal*, 31, 50-60.
- Engelbrecht MC. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter*, 10, 3-5.
- Harman G. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190-194.
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal Applied Bacteriology*, 27, 265-277.
- Hernández JJ. 2010. Análisis de la diversidad genética de *Ralstonia solanacearum* y su relación con la virulencia en plátano, amenaza en Venezuela. *Producción Agropecuaria*, 3, 19-30.
- Hoyos LM, Jaramillo S, Orduz S. 2008. Evaluación de *Trichoderma asperellum* como biorregulador de *Spongopora subterranea* f. sp. subterranea. *Revista de la Facultad Nacional Agraria, Medellín*, 61, 4496-4502.
- Infante D, Martínez B, Gonzáles N, Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24, 14-21.
- Johanson A. 1995. Detection of banana leaf spot pathogens by PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 25, 99-107.
- Kim YK, Lee SC, Cho YY, Oh HJ, Ko YH. 2012. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *International Scholarly Research Notes*, 2012(1), 650563.

- Kuzmanovska B, Rusevski R, Jankulovska M, Oreshkovikj KB. 2018. Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. Chilean Journal of Agricultural Research, 78, 391-399.
- Manoj A, Ganesan G. 2006. Management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al using biological control agents. Journal of Horticultural Sciences, 1, 44-47.
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal, 28(1), 1-11.
- Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Revista de Protección Vegetal, 23, 118-125.
- Martínez-Coca B, Infante D, Caraballo W, Duarte-Leal Y, Echevarría-Hernández A. 2018. Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo. Revista de Protección Vegetal, 33, 2224-4697.
- Murthy N, Devi N, Srinivas C. 2013. Efficacy of *Trichoderma asperellum* against *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. Annals of Plant Sciences, 2, 342-350.
- Obregón M, Rodríguez P, Morales J, Salazar M. 2008. Hospedantes de *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano y plátano en Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 61, 4518-4526.
- Opina N, Tavner F, Hollway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis J. 1997. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific Journal Molecular Biology and Biotechnology, 5, 19-30.
- Peláez-Álvarez A, de los Santos-Villalobos S, Yépez EA, Parra-Cota FI, Reyes-Rodríguez RT. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 7, 1401-1412.
- Perea J, García R, Allende R, Carrillo J, León J, Valdez B, López F. 2011. Identificación de razas y biovares de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate. Revista Mexicana de Fitopatología, 29, 98-108.
- Reyes Y, Infante D, Martínez B. 2016. Eficacia de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en condiciones de campo. Protección Vegetal, 31, 107-113.
- Rueda-Puente E, Hernández-Montiel L, Holguín-Peña R, Ruiz F, López J, Huez M, Jiménez J, Borboa J, Ortega-García J. 2014. *Ralstonia solanacearum*: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L. INVURNUS, 9, 24-36.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3ra. edición. APS Press, The American Phytopathological Society. EE. UU.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2016. Moko del plátano: *Ralstonia solanacearum* raza 2 Smith. Ficha técnica, 26 p. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/fichas-tecnicas-reconocimiento-estrategias-para-el-manejo-de-plagas>. Consultado el 18/10/2026.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2025. Cierre de la producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado el 07/06/2025.
- Silva-Martínez KL, Allende-Molar R, Vázquez-Luna D, González-Cárdenas JC, Munguía-González J. 2016. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium* sp. agente causal de gomosis en cítricos. Agroproductividad, 9, 20-25.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72, 917-918.
- Thornley MJ. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal Applied Bacteriology, 23, 37-52.
- Wu Q, Sun R, Ni M, Yu J, Li Y, Yu C, Dou K, Ren J, Chen J. 2017. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. PLoS ONE, 12(6), e0179957.
- Yendyo S, Ramesh GC, Pandey BR. 2017. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. F1000Research, 6, 2028.