



# Native *Trichoderma* strains for the biological control of *Fusarium* under nursery conditions

## Cepas nativas de *Trichoderma* para el control biológico de *Fusarium* en condiciones de vivero

✉ Eliadora Cruz-Cantú<sup>1</sup>; ✉ Arnulfo Aldrete<sup>1\*</sup>;

✉ Víctor D. Cibrián-Llenderal<sup>1</sup>; ✉ Manuel Aguilera-Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Ciencias Forestales. km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo. C. P. 56264. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. km 38.5 carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

\*Corresponding author: aaldrete@colpos.mx

### Abstract

**Introduction.** Plant production in forest nurseries faces serious phytosanitary challenges due to the presence of *Fusarium* fungi, which cause damping-off and wilting in plants.

**Objective.** To evaluate the effect of seven native strains of *Trichoderma* spp. on the biological control of *Fusarium oxysporum* Schltld. and on the growth of *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltld. during nursery production.

**Materials and methods.** Eight treatments were evaluated in a completely randomized design with four replications each. Native strains of *Trichoderma asperellum* (Ta64, Ta67 and Ta97), *T. paratroviride* (Tp82 and Tp88), *T. martiale* (Tm69), *T. tomentosum* (Tt33) and a control treatment without the antagonistic fungus were used. Disease incidence was assessed as the percentage of plants showing symptoms of *F. oxysporum*. Morphological data from 288 healthy plants randomly selected from the eight treatments were recorded and analyzed using ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

**Results.** The control treatment showed the highest pathogen incidence (53 %), whereas treatments inoculated with native strains ranged from 27 % to 46 %. The use of native strains resulted in satisfactory seedling quality, as indicated by the evaluated morphological indices.

**Conclusion.** The Tt33 strain (*T. tomentosum*) was the most effective, reducing pathogen presence by up to 50 % compared with the control and promoting the greatest seedling growth.

**Keywords:** Antagonism, *Fusarium oxysporum*, *Pinus oocarpa*, *Trichoderma tomentosum*, forest nursery.

### Resumen

**Introducción.** La producción de planta en viveros forestales enfrenta fuertes problemas fitosanitarios por la presencia de hongos del género *Fusarium* que provocan déficit y marchitez en las plantas.

**Objetivo.** Evaluar el efecto de siete cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Fusarium oxysporum* Schltld. y en el crecimiento de *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltld. durante la producción en vivero.

**Materiales y métodos.** Se probaron ocho tratamientos organizados al azar con cuatro repeticiones cada uno. Se emplearon cepas nativas de *Trichoderma asperellum* (Ta64, Ta67 y Ta97), *T. paratroviride* (Tp82 y Tp88), *T. martiale* (Tm69), *T. tomentosum* (Tt33) y un tratamiento control sin cepa del hongo antagonista. La incidencia se evaluó a través del porcentaje de plantas con síntomas de *F. oxysporum*. Los datos morfológicos de 288 plantas sanas extraídas al azar de los ocho tratamientos se registraron y se analizaron con ANDEVA y prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Resultados.** El tratamiento control mostró el mayor porcentaje de incidencia del patógeno con 53 %, mientras que los tratamientos inoculados con cepas nativas variaron entre 27 y 46 %. Con las cepas nativas se lograron resultados satisfactorios en calidad de planta de acuerdo con los índices morfológicos evaluados.

**Conclusión.** La cepa Tt33 (*T. tomentosum*) fue la más efectiva, ya que redujo la presencia del patógeno hasta 50 % con respecto al testigo y promovió el mayor crecimiento en plantas.

**Palabras clave:** Antagonismo, *Fusarium oxysporum*, *Pinus oocarpa*, *Trichoderma tomentosum*, vivero forestal.

Please cite this article as follows (APA 7): Cruz-Cantú, E., Aldrete, A., Cibrián-Llenderal, V. D., & Aguilera-Rodríguez, M. (2026). Native *Trichoderma* strains for the biological control of *Fusarium* under nursery conditions. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 32, e24051. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2024.12.051>



## Introduction

Mexico's forest area covers 138.7 million hectares (71 % of the national territory), hosting high biodiversity and providing important environmental goods and services (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2023). However, over time the country has faced serious ecological challenges, including deforestation, pests and diseases, forest fires, illegal logging, biodiversity loss, and soil degradation processes (CONAFOR, 2023; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2020). To mitigate these problems, reforestation and restoration programs have been implemented. Among the tree species used in these programs, 40 forest species have been recorded, 16 of which belong to *Pinus* genus. The most frequently used species include *Pinus devoniana* Lindl., *P. pseudostrabus* Lindl., *P. leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham., *P. engelmannii* Carrière and *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl. (CONAFOR, 2023). According to CONAFOR (2022), during the 2020-2021 period, nursery plant production was mainly composed of *Cupressus lusitanica* Mill. (37 %), *Pinus greggii* Engelm. (12 %), *P. devoniana* (10 %), *P. oaxacana* Mirov (8 %) and *P. oocarpa* (4 %). In Mexico, *P. oocarpa* is one of the forest species most used for reforestation due to its wide geographic distribution and economic potential, because its wood is used for sawn timber, veneer, plywood, construction, fuelwood, and resin production (Fabián-Plesníková et al., 2020; Flores-Garnica & Reyes-Cárdenas, 2019).

Among the most critical phytosanitary challenges during nursery plant production are several species of pathogenic fungi that cause damping-off; the main symptoms include wilting, vascular constriction, root rot, and plant death (García-Díaz et al., 2019; Zas & Sampedro, 2015). Among these pathogenic fungi, the predominant genera are *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* and *Fusarium*. Species of the latter are found naturally on all continents and are the most detrimental to conifers under nursery and field conditions (Flores-Pacheco, 2017). *Fusarium* infection in the host is expressed as needle wilting, a change in foliage color from normal green to yellowish or reddish tones, and, in some cases, defoliation of shoots, ultimately leading to plant death (Gutiérrez-Flores et al., 2022; Patel et al., 2022; Yao et al., 2023).

In recent years, nursery managers, foresters, and farmers have been engaged in a continuous struggle against pests and diseases, by targeting the causal agent to reduce its large-scale impact (Zas & Sampedro, 2015). In this context, fungicides have been extensively used in nurseries and forest plantations in Mexico to inhibit soil-borne fungi. These products are designed for the agricultural sector rather than forestry, requiring adaptations for their application, including dosage

## Introducción

La extensión de bosque en México incluye 138.7 millones de hectáreas (71 % del territorio nacional), las cuales albergan gran biodiversidad y proporcionan bienes y servicios ambientales (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2023). No obstante, con el paso del tiempo, el país ha afrontado serios problemas ecológicos como deforestación, plagas y enfermedades, incendios forestales, tala clandestina, pérdida de biodiversidad y procesos de degradación de suelos (CONAFOR, 2023; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2020). Para reducir esta problemática se han implementado programas de reforestación y restauración. Entre los árboles empleados se han registrado 40 especies forestales, de las cuales 16 pertenecen al género *Pinus*. Las especies más frecuentes son: *Pinus devoniana* Lindl., *P. pseudostrabus* Lindl., *P. leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham., *P. engelmannii* Carrière y *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl. (CONAFOR, 2023). De acuerdo con la CONAFOR (2022), durante el periodo 2020-2021, la producción de plantas en viveros se estableció principalmente con *Cupressus lusitanica* Mill. (37 %), *Pinus greggii* Engelm. (12 %), *P. devoniana* (10 %), *P. oaxacana* Mirov (8 %) y *P. oocarpa* (4 %). En México, *P. oocarpa* es una de las especies forestales preferidas para reforestación por su amplia distribución geográfica y potencial económico, ya que la madera se destina para aserrío, chapa, triplay, construcción, leña y producción de resina (Fabián-Plesníková et al., 2020; Flores-Garnica & Reyes-Cárdenas, 2019).

Entre los desafíos fitosanitarios más críticos durante los procesos de producción de planta en vivero destacan diversas especies de hongos patógenos causantes de *Damping-off*; los síntomas son marchitamiento, estrangulación vascular, pudrición de raíces y muerte de la planta (García-Díaz et al., 2019; Zas & Sampedro, 2015). Del conjunto de hongos patógenos, los géneros predominantes son *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* y *Fusarium*. Las especies de este último existen de manera natural en todos los continentes y son las que más afectan a las coníferas en vivero y en campo (Flores-Pacheco, 2017). La infección de *Fusarium* en el hospedante se manifiesta como marchitez de acículas, cambio de la tonalidad de follaje normal a tonos amarillentos a rojizos y, en algunos casos, deja los brotes sin follaje e induce finalmente la muerte de la planta (Gutiérrez-Flores et al., 2022; Patel et al., 2022; Yao et al., 2023).

En los últimos años, los viveristas, silvicultores y agricultores se han mantenido en lucha constante contra las plagas y enfermedades, mediante el combate del agente causal para la reducción de su impacto a gran escala (Zas & Sampedro, 2015). Al respecto, en viveros y en plantaciones forestales de México, se han utilizado fungicidas de manera excesiva para la inhibición de

adjustments according to species (Gutiérrez-Flores et al., 2022). Given this situation, it is advisable to reduce the excessive use of fungicides and promote the use of biocontrol agents (Gutiérrez-Flores et al., 2022), which can act synergistically through various mechanisms, including competition for space and nutrients, parasitism, and induce resistance in plants (Ceballos-Chávez et al., 2021; Kumar et al., 2021; Liu et al., 2019).

Antagonistic fungi require specific temperature, humidity, and pH conditions; however, they can survive in diverse and extreme environments, because they adapt to their surroundings and persist for extended periods (Argumedo-Delira et al., 2009; Nandini et al., 2021). Species of the genus *Trichoderma* are the most widely used, tested, and commercially available antagonistic fungi worldwide for the biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi (Alfiky & Weisskopf, 2021; Larios-Larios et al., 2019). In this context, the present study aimed to evaluate the effect of seven native strains of *Trichoderma* spp. on the biological control of *Fusarium oxysporum* Schltld. and on the growth of *P. oocarpa* during nursery production.

## Materials and methods

### Study area and plant material

This experiment was carried out in the greenhouse of the División de Ciencias Forestales (DICIFO) at the Universidad Autónoma Chapingo (UACH) in Texcoco, Estado de México (19° 29' 36" N and 98° 53' 38" W) at an elevation of 2255 m.

*P. oocarpa* seeds were provided by team members from the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in Estado de México; these seeds were collected in the ejido San Gabriel Cuentla, Estado de México.

### Seed handling and sowing

*P. oocarpa* seeds were soaked for 24 hours, disinfected with 5 % commercial sodium hypochlorite (Cloralex®) for 10 minutes, and rinsed twice with clean water. On March 22, 2023, two seeds were sown per cavity at an approximate depth of 0.5 cm. Thirty-two black plastic trays with 25 interchangeable cavities (220 mL tubes) were used. The substrate consisted of a mixture of peat moss, perlite, and vermiculite in a 3:1:1 (v/v) ratio, supplemented with 8 g·L<sup>-1</sup> of Multicote® Agri (8) 18-6-12 (N-P-K) controlled-release fertilizer (8-9 months). During germination, light daily irrigation was applied, which was reduced to every third day after seedling emergence. One month later, thinning was performed, leaving one seedling per cavity.

hongos del suelo. Estos productos están diseñados para el sector agrícola y no para el forestal, por lo que se hacen adaptaciones para su aplicación, incluidas las dosis según la especie (Gutiérrez-Flores et al., 2022). Ante esta situación, es conveniente reducir el uso excesivo de fungicidas y fomentar el uso de agentes de biocontrol (Gutiérrez-Flores et al., 2022), los cuales pueden actuar de manera conjunta a través de diversos mecanismos como la competencia por espacio y nutrientes, parasitismo y resistencia inducida en las plantas (Ceballos-Chávez et al., 2021; Kumar et al., 2021; Liu et al., 2019).

Los hongos antagonísticos requieren condiciones de temperatura, humedad y pH específicos; sin embargo, pueden sobrevivir en condiciones diversas y extremas, ya que se adaptan al ambiente y persisten durante largos periodos (Argumedo-Delira et al., 2009; Nandini et al., 2021). Las especies del género *Trichoderma* son los hongos antagonísticos más empleados, ensayados y comercializados a nivel mundial para el biocontrol de especies de hongos fitopatógenos con origen en el suelo (Alfiky & Weisskopf, 2021; Larios-Larios et al., 2019). En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de siete cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Fusarium oxysporum* Schltld. y en el crecimiento de *P. oocarpa* durante la producción en vivero.

## Materiales y métodos

### Área de estudio y material vegetal

El experimento se estableció en el invernadero de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en Texcoco, Estado de México (19° 29' 36" N y 98° 53' 38" O) a una altitud de 2255 m.

Las semillas de *P. oocarpa* fueron donadas por personal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Estado de México, mismas que se recolectaron en el ejido San Gabriel Cuentla, Estado de México.

### Manejo de semillas y siembra

Las semillas de *P. oocarpa* se remojaron durante 24 h, se desinfectaron con hipoclorito sódico comercial (Cloralex®) al 5 % durante 10 min y se enjuagaron dos veces en agua limpia. El 22 de marzo de 2023 se sembraron dos semillas por cavidad a una profundidad aproximada de 0.5 cm. Se utilizaron 32 charolas de plástico negro con 25 cavidades intercambiables (tubetes) de 220 mL. El sustrato consistió en una mezcla compuesta por turba de musgo (*peat moss*), perlita y vermiculita en proporción 3:1:1 (v/v), complementado

### Antagonist inoculation

*Trichoderma* strains, stored on a solid rice-based medium, were isolated from samples collected in various states of Mexico (Moreno-Delgadillo, 2023). The species used were *T. asperellum* (Ta64, Ta67 and Ta97), *T. paratroviride* (Tp82 and Tp88), *T. martiale* (Tm69) and *T. tomentosum* (Tt33).

Inoculation was carried out in two applications: on June 20, 2023, when the plants were two months old, and a second application 15 days later (July 4, 2023). A spore suspension was prepared by dissolving 1 g of colonized rice in 10 mL of purified water. Conidia were quantified using a hemocytometer under a microscope, applying Tuite's (1969) formula to determine the number of spores per mL. The suspension was adjusted to a concentration of  $2.5 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>, as recommended by Alfenas and Mafia (2016).

The amount of rice required for each treatment was calculated using Harris (2007) dilution equation:

$$V_i = \frac{V_f * C_f}{C_i}$$

where,

$V_i$  = unknown volume

$C_i$  = initial concentration (known from the initial count)

$V_f$  = final volume of water

$C_f$  = desire final concentration (according to the study to be conducted)

The corresponding amount of rice was weighed on an analytical balance (PRECISA BJ 4100D) and diluted in 5 L purified water. Then, each plant (100 plants per treatment) received 50 mL of the standardized spore suspension (Table 1) at the base of the stem in each tube.

### Pathogen inoculation

A strain of *F. oxysporum* was used, provided by the Laboratory of Entomology and Forest Pathology at DiCiFo. This strain was originally isolated from the "Atlangatepec" Military Forest Nursery of the Secretaría de la Defensa Nacional, located at Atlangatepec, Tlaxcala (García-Díaz et al., 2017). To confirm the fungus as an effective pathogen, a pathogenicity test was carried out on May 8, 2023, using two-year-old *P. oocarpa* plants and seedling plants of the same species in an experiment separate from the main trial.

Subsequently, inoculation in the experiment treatments was carried out on June 29, 2023, on three-month-old plants, eight days after inoculation with the antagonist. To prepare the inoculum, seven Petris dishes containing PDA culture medium with eight days of mycelial growth at room temperature were used. To each dish, 15 mL of purified water and one drop of

con 8 g·L<sup>-1</sup> de fertilizante Multicote® Agri (8) 18-6-12 (N-P-K) de liberación controlada (8-9 meses). Durante el proceso de germinación se aplicaron riegos ligeros diarios; tras la emergencia, se espaciaron cada tercer día. Un mes después se realizó el aclareo dejando una plántula por cavidad.

### Inoculación del antagonista

Las cepas de *Trichoderma*, almacenadas en medio sólido a base de arroz, se aislaron a partir de muestras recolectadas en varios estados de la República Mexicana (Moreno-Delgadillo, 2023). Las especies utilizadas fueron: *T. asperellum* (Ta64, Ta67 y Ta97), *T. paratroviride* (Tp82 y Tp88), *T. martiale* (Tm69) y *T. tomentosum* (Tt33).

La inoculación se realizó en dos aplicaciones: el 20 de junio de 2023 en plantas de dos meses y la segunda 15 días después (4 de julio de 2023). Para ello, se preparó una suspensión de esporas a partir de 1 g de arroz colonizado disuelto en 10 mL de agua purificada. Los conidios se cuantificaron con un hemocitómetro bajo microscopio, aplicando la fórmula de Tuite (1969) para obtener el número de esporas por mL. La suspensión se ajustó a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> recomendado por Alfenas y Mafia (2016).

La cantidad de arroz necesaria para cada tratamiento se calculó con la ecuación de dilución de Harris (2007):

$$V_i = \frac{V_f * C_f}{C_i}$$

donde,

$V_i$  = valor desconocido

$C_i$  = concentración inicial (conocida en el conteo inicial)

$V_f$  = volumen final de agua

$C_f$  = concentración final deseada (según el estudio a realizar)

La cantidad correspondiente de arroz se pesó en una balanza analítica (PRECISA BJ 4100D) y se diluyó en 5 L de agua purificada. Después, cada planta (100 plantas por tratamiento) recibió 50 mL de la suspensión estandarizada de esporas (Cuadro 1) en la base del tallo en cada uno de los tubetes.

### Inoculación del patógeno

Se utilizó una cepa de *F. oxysporum*, donada por el Laboratorio de Entomología y Patología Forestal de la DiCiFo, la cual se aisló del vivero forestal Militar "Atlangatepec" de la Secretaría de la Defensa Nacional, ubicado en Atlangatepec, Tlaxcala (García-Díaz et al., 2017). Para asegurar la identificación del hongo como patógeno efectivo, el 8 de mayo de 2023 se realizó una prueba de patogenicidad en plantas de *P. oocarpa* de dos años y en plantas de almácigo de la misma especie en un ensayo separado del experimento principal.

**Table 1. Standardization of *Trichoderma* strain to a concentration of  $2.5 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> for inoculation treatment in two-month-old *Pinus oocarpa* plants.**

**Cuadro 1. Estandarización de las cepas de *Trichoderma* a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> para los tratamientos de inoculación en plantas de *Pinus oocarpa* de dos meses.**

| Treatment/<br>Tratamiento | Species/<br>Especie     | Strain/<br>Cepa | Spore-colonized rice (g)/<br>Arroz con esporas (g) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------|--|
| T2                        | <i>T. asperellum</i>    | Ta97            | 33.6   |
| T3                        | <i>T. paratroviride</i> | Tp82            | 29.5   |
| T4                        | <i>T. martiale</i>      | Tm69            | 31.0   |
| T5                        | <i>T. asperellum</i>    | Ta64            | 32.0   |
| T6                        | <i>T. paratroviride</i> | Tp88            | 15.2   |
| T7                        | <i>T. asperellum</i>    | Ta67            | 20.2   |
| T8                        | <i>T. tomentosum</i>    | Tt33            | 4.7  |

Tween 80 were added. The mycelium was then scraped with a sterile inoculating loop, spores were counted using a hemocytometer under a LEICA CME microscope (Tuite, 1969) and the suspension was adjusted to  $2.5 \times 10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>. The suspensions were collected with a syringe and diluted in 12 L of water. Plants were lightly watered prior to inoculation. The spore suspension was then applied at a dose of 15 mL per tube using a syringe (Table 2). This procedure was conducted in the morning, with protective measures such as gloves used to prevent direct skin contact.

A total of 800 plants were evaluated, distributed among eight treatments (100 plants per treatment). The control was inoculated only with *F. oxysporum*, whereas treatments T2–T8 included *Fusarium* and a different *Trichoderma* strain. The experimental unit consisted of 25 plants.

#### **Incidence of symptoms caused by *Fusarium oxysporum***

Over a 12-week period (from July 13 to September 28, 2023), the number of infected plants was recorded from a total of 800 evaluated plants. Disease incidence was assessed based on the number of plants showing visible wilting symptoms, using the following formula:

#### **Re-isolation of the pathogen and antagonistic agent**

In accordance with Koch's postulates, plants from the treatments with typical symptoms of *F. oxysporum* were selected for pathogen re-isolation. Root segments were obtained and surface-disinfected for 1 min in 3 % sodium hypochlorite, followed by three rinses with sterile water. The segments were plated on Petri dishes containing PDA medium supplement with streptomycin sulfate (0.05 mg), sealed with Parafilm, labeled with the corresponding date and treatment, and incubated at 25 - 28 °C to allow fungal growth, to confirm that the symptoms observed in the seedlings

Posteriormente, la inoculación en los tratamientos del experimento se realizó el 29 de junio de 2023 en plantas de tres meses de edad, ocho días después de la inoculación con el antagonista. Para preparar el inóculo se utilizaron siete cajas Petri con medio de cultivo PDA de ocho días de crecimiento y desarrollo de micelio a temperatura ambiente. A cada caja se agregaron 15 mL de agua purificada y una gota de Tween 80. Posteriormente, se raspó el micelio con un asa bacteriológica estéril, se hizo el conteo de esporas en el hemocitómetro bajo el microscopio LEICA CME (Tuite, 1969) y se ajustó la suspensión a  $2.5 \times 10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Las suspensiones se extrajeron con una jeringa y se diluyeron en 12 L de agua. Las plantas se regaron ligeramente previas a la inoculación, después la solución con esporas se inyectó con una jeringa a una dosis de 15 mL en cada tubete (Cuadro 2). Esta actividad se realizó por la mañana y se tomaron medidas de protección con el uso de guantes para evitar el contacto directo con la piel.

Se evaluaron 800 plantas distribuidas en ocho tratamientos (100 plantas por tratamiento). El testigo fue inoculado solo con *F. oxysporum*, mientras que los tratamientos T2–T8 incluyeron *Fusarium* y una cepa distinta de *Trichoderma*. La unidad experimental fue de 25 plantas.

#### **Incidencia de síntomas causados por *Fusarium oxysporum***

Durante 12 semanas (13 de julio al 28 septiembre del 2023) se registró el número de plantas enfermas de un total de 800 plantas evaluadas. La incidencia se evaluó mediante el número de plantas con síntomas visibles de marchitez con la fórmula siguiente:

#### **Reaislamiento del patógeno y agente antagonico**

De acuerdo con los postulados de Koch, se seleccionaron plantas de los tratamientos que presentaron síntomas típicos por *F. oxysporum* para el reaislamiento del

**Table 2. Inoculation treatments with *Trichoderma* strains ( $2.5 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>) as antagonists of the pathogen *Fusarium oxysporum* ( $2.5 \times 10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>) in three-month-old *Pinus oocarpa* plants under nursery conditions.**

**Cuadro 2. Tratamientos de inoculación con cepas de *Trichoderma* ( $2.5 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>) como antagonistas del patógeno *Fusarium oxysporum* ( $2.5 \times 10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>) en plantas de *Pinus oocarpa* de tres meses en vivero.**

| Treatment / Tratamiento | Treatment / Tratamiento                                |
|-------------------------|--|
| T1                      | <i>F. oxysporum</i>                                    |
| T2                      | Ta97 ( <i>T. asperellum</i> ) + <i>F. oxysporum</i>    |
| T3                      | Tp82 ( <i>T. paratroviride</i> ) + <i>F. oxysporum</i> |
| T4                      | Tm69 ( <i>T. martiale</i> ) + <i>F. oxysporum</i>      |
| T5                      | Ta64 ( <i>T. asperellum</i> ) + <i>F. oxysporum</i>    |
| T6                      | Tp88 ( <i>T. paratroviride</i> ) + <i>F. oxysporum</i> |
| T7                      | Ta67 ( <i>T. asperellum</i> ) + <i>F. oxysporum</i>    |
| T8                      | Tt33 ( <i>T. tomentosum</i> ) + <i>F. oxysporum</i>    |

were caused by the pathogen. After seven days of growth, the presence of *F. oxysporum* y *Trichoderma* spp. was confirmed; subsequently, both fungi were purified and preserved in mineral oil (García-Díaz et al., 2019).

### Morphological evaluation

The morphological evaluation experiment of *P. oocarpa* seedlings was established using a completely randomized design with eight treatments (seven antagonistic strains and one control). From each treatment, nine healthy seedlings (six months old) were randomly selected from the central area of four trays (replicates), resulting in 36 seedlings per treatment and a total of 288 plants evaluated.

On October 11, 2023, the plants were removed, the substrate was manually separated from the root balls, and the roots were rinsed with clean water. After removing excess moisture with absorbent paper, plant height (cm) was measured using a graduated scale from the root collar to the plant apex, and stem diameter (mm) was measured using a digital caliper (TRUPER IP54 model CALDI-6MP).

Subsequently, each plant was sectioned at the root collar to separate the shoot and root components. Each section was placed separately in No. 5 Kraft paper bags, labeled by treatment and replication. The samples were oven-dried in a SHEL LAB drying oven at 70 °C for 72 h and then weighed using an OHAUS Navigator™ analytical balance. Shoot dry weight (SDW) and root dry weight (RDW) were obtained, and the following variables were calculated: SDW/RDW ratio; sturdiness quotient [SQ = height (cm) / root collar diameter (mm)]; Dickson quality index [DQI = Total dry weight / ((height / diameter) + (SDW / RDW))].

Seedling quality in forest nurseries was evaluated following the methodology proposed by Sáenz-Reyes et al. (2010) for normally growing conifers, who classify the quality of morphological traits as follows: height = high

patógeno. Se obtuvieron segmentos de raíz que se desinfectaron por 1 min en hipoclorito sódico al 3 % y se enjuagaron tres veces con agua esterilizada. Los segmentos se sembraron en placas con medio PDA más sulfato de estreptomycin (0.05 mg), se sellaron con papel Parafilm, se etiquetaron con fecha y tratamiento correspondiente y luego se incubaron a temperaturas de 25 - 28 °C para el crecimiento del hongo, con el fin de confirmar que los síntomas observados en las plántulas fueron causados por el patógeno. Después de siete días de crecimiento, se identificó la presencia de *F. oxysporum* y *Trichoderma* spp.; posteriormente, se realizó la purificación y preservación de ambos hongos en aceite mineral (García-Díaz et al., 2019).

### Evaluación morfológica

El experimento de la evaluación morfológica de plántulas de *P. oocarpa* se estableció en un diseño completo aleatorizado con ocho tratamientos (siete cepas antagónicas y un testigo). De cada tratamiento se seleccionaron al azar nueve plántulas sanas (seis meses de edad) de la zona central de cuatro charolas (réplicas); es decir, 36 por tratamiento, que en total suman 288 plantas evaluadas.

El 11 de octubre del 2023 se extrajeron las plantas, se removió el sustrato de los cepellones de manera manual y se enjuagaron las raíces con agua limpia. Después de eliminar el exceso de humedad con papel absorbente, se midió la altura (cm) con una regla graduada desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la planta y el diámetro del tallo (mm) con un vernier digital (TRUPER IP54 modelo CALDI-6MP).

Posteriormente, cada planta fue seccionada a nivel del cuello de la raíz, para separar parte aérea y radical; cada sección se colocó por separado en bolsas de papel estraza Kraft núm. 5, se etiquetó por tratamiento y repetición. Las muestras se secaron en una estufa SHEL LAB durante 72 h a 70 °C; posteriormente, cada muestra se pesó en una báscula analítica OHAUS Navigator™. Se obtuvieron

quality (15.1-25 cm), medium (12 – 15 cm), low (<12 cm); SQ = high (< 6), medium (6 - 8), low (> 8); SDW/RDW = high (1.5 – 2.0), medium (2.1 - 2.5), low (> 2.5) e DQI = high (> 0.5), medium (0.2 – 0.5) and low (<0.2).

### Statistical analysis

Data from the morphological evaluation of the plants were analyzed using an ANOVA with the GLM procedure of SAS software version 9.4 (SAS Institute, 2002). Significant differences among means were determined using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

## Results and Discussion

### Cumulative incidence of infected plants

The first wilting symptoms appeared two weeks after inoculation with *F. oxysporum*, in agreement with the findings of Robles-Yerena et al. (2017), who reported symptom development 15 days after the application of *F. solani* and *F. oxysporum*. Similarly, García-Díaz et al. (2019) reported symptoms from *F. circinatum* after 20 days. On the other hand, Ortega-Cerón et al. (2024) reported those symptoms caused by this pathogen appeared in week 12.

During the first week after inoculation, only treatment T1 (control) exhibited plants with wilting symptoms. In contrast, treatments with *Trichoderma* spp. showed symptoms onset from the second week in treatments T3, T5 and T6, and from the third week in treatments T2, T4 and T7. In treatment T8 (*T. tomentosum*), symptoms did not appear until the fifth week. Initial symptoms, characterized by wilting of the apical shoot, progressed from yellowish to reddish discoloration, ultimately leading to complete desiccation, which is consistent with descriptions reported by other authors (Gutiérrez-Flores, 2022; Ortega-Cerón et al., 2024; Patel et al., 2022).

At the end of the evaluation period (12 weeks), treatment T8, with *T. tomentosum* (Tt33), had the lowest incidence (27 %) in contrast to the control (T1), which increased weekly until reaching 53 % infected plants (Figure 1). These values are lower than those reported by García-Díaz et al. (2019), Robles-Yerena et al. (2017) and Ortega-Cerón et al. (2024), who reported incidences of up to 99 %, 100 % and 42 to 66 % of *F. circinatum*, respectively, in untreated control treatments without *Trichoderma*. In contrast, treatments inoculated with *Trichoderma* spp. showed lower incidence levels (27 to 46 %).

### Morphological evaluation

According to the information shown in Table 3, ANOVA revealed highly significant differences in plant height ( $p < 0.001$ ). Inoculation with antagonistic fungal strains

los pesos secos de la parte aérea (PSA) y radical (PSR) y se calcularon las siguientes variables: relación PSA/PSR; índice de esbeltez [IE = altura (cm) / diámetro del cuello de la raíz (mm)]; índice de calidad de Dickson [ICD = PSTotal / ((altura / diámetro) + (PSA / PSR))].

La calidad de planta en viveros forestales se evaluó con la metodología propuesta por Sáenz-Reyes et al. (2010) para coníferas de crecimiento normal, quienes clasifican la calidad de los rasgos morfológicos de acuerdo con lo siguiente: altura = calidad alta (15.1-25 cm), media (12 – 15 cm), baja (<12 cm); IE = alta (< 6), media (6 - 8), baja (> 8); PSA/PSR = alta (1.5 – 2.0), media (2.1 - 2.5), baja (> 2.5) e ICD = alta (> 0.5), media (0.2 – 0.5) y baja (<0.2).

### Análisis estadístico

Los datos de la evaluación morfológica de las plantas se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el procedimiento GLM del software estadístico SAS 9.4 (SAS Institute, 2002). Las diferencias significativas entre medias se determinaron con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

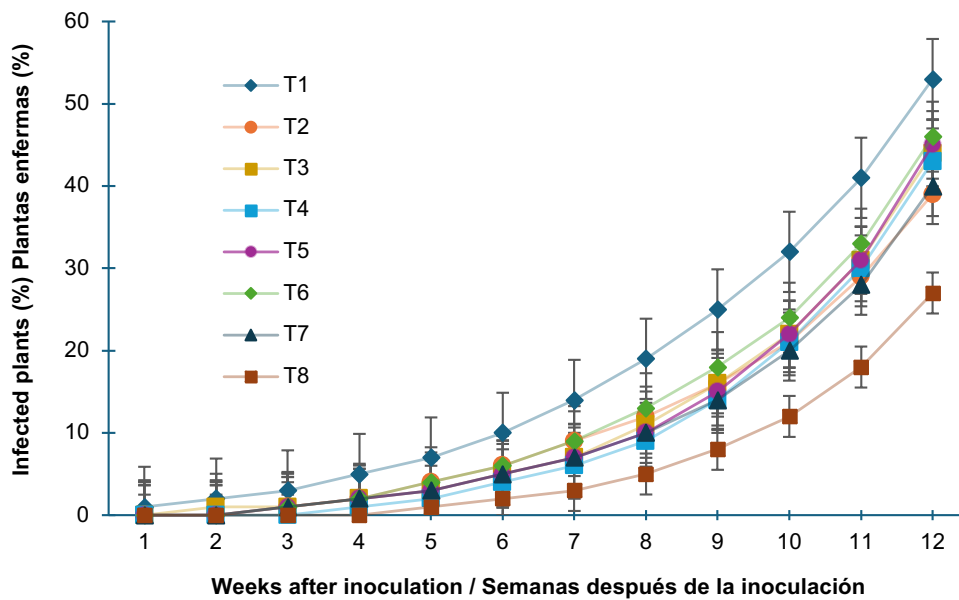
## Resultados y discusión

### Incidencia acumulada de plantas enfermas

Los primeros síntomas de marchitez se mostraron dos semanas después de la inoculación con *F. oxysporum*, en concordancia con lo reportado por Robles-Yerena et al. (2017), quienes observaron síntomas a los 15 días después de la aplicación de *F. solani* y *F. oxysporum*. De manera similar, García-Díaz et al. (2019) documentaron manifestaciones de *F. circinatum* a los 20 días, mientras que Ortega-Cerón et al. (2024) señalan que el síntoma de este patógeno se presentó en la semana 12.

En la primera semana posterior a la inoculación, solo el tratamiento T1 (testigo) tuvo plantas con síntomas de marchitez. En contraste, los tratamientos con *Trichoderma* spp. mostraron síntomas a partir de la segunda semana en los tratamientos T3, T5 y T6 y en la tercera semana en T2, T4 y T7. En T8 (*T. tomentosum*), los síntomas aparecieron hasta la quinta semana. Los síntomas iniciales observados con marchitez del brote apical cambiaron de tono amarillo a rojizo hasta la desecación total, descripción que coincide con la de otros autores (Gutiérrez-Flores, 2022; Ortega-Cerón et al., 2024; Patel et al., 2022).

Al finalizar la evaluación (12 semanas), el tratamiento T8, con *T. tomentosum* (Tt33), presentó la menor incidencia (27 %) y contrastó con el testigo (T1) que incrementó semanalmente hasta alcanzar 53 % de plantas enfermas (Figura 1). Estos valores se encuentran por debajo de los obtenidos por García-Díaz et al.



**Figure 1.** Cumulative incidence of *Fusarium oxysporum* in *Pinus oocarpa* plants inoculated with eight antagonistic *Trichoderma* strains (treatments): T1 without *Trichoderma* (control), T2, T5 and T7 (*T. asperellum*), T3 and T6 (*T. paratroviride*), T4 (*T. martiale*) and T8 (*T. tomentosum*).

**Figura 1.** Incidencia acumulada de *Fusarium oxysporum* en plantas de *Pinus oocarpa* inoculadas con ocho cepas antagónicas (tratamientos) de *Trichoderma*: T1 sin *Trichoderma* (testigo), T2, T5 y T7 (*T. asperellum*), T3 y T6 (*T. paratroviride*), T4 (*T. martiale*) y T8 (*T. tomentosum*).

**Table 3.** Morphological and quality traits of *Pinus oocarpa* seedlings after six months of growth inoculated with native *Trichoderma* strains for the control of *Fusarium oxysporum*.

**Cuadro 3.** Rasgos morfológicos y de calidad en plantas de *Pinus oocarpa* después de seis meses de crecimiento inoculadas con cepas nativas de *Trichoderma* para el control de *Fusarium oxysporum*.

| Treatments/<br>Tratamientos     | Diameter (mm)/<br>Diámetro mm | Height (cm)/<br>Altura (cm) | RDW (g)/<br>PSR (g) | SDW (g)/<br>PSA (g)      | SDW/RDW/<br>PSA/PSR | SI/IE           | DQI/ICD       |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------|
| 1 (Control)/<br>1 (Testigo)     | 6.32 ± 1.34 abc               | 16.57 ± 2.87 d              | 1.06 ± 0.40 b       | 2.68 ± 0.86 b            | 2.68 ± 0.85 a       | 2.72 ± 0.69 c   | 0.74 ± 0.29 a |
| 2 (strain T97)/<br>2 (cepa T97) | 7.36 ± 1.35 a                 | 21.40 ± 4.73 abc            | 1.24 ± 0.29 ab      | 3.56 ± 0.82 a            | 2.97 ± 0.68 a       | 2.99 ± 0.74 bc  | 0.82 ± 0.21 a |
| 3 (strain T82)/<br>3 (cepa T82) | 6.49 ± 1.72 abc               | 22.96 ± 3.87 abc            | 1.28 ± 0.28 ab      | 3.47 ± 0.86 a            | 2.73 ± 0.43 a       | 4.13 ± 3.29 a   | 0.76 ± 0.22 a |
| 4 (strain T69)/<br>4 (cepa T69) | 6.59 ± 1.50 abc               | 20.51 ± 2.97 c              | 1.33 ± 0.45 ab      | 3.69 ± 0.87 a            | 2.99 ± 0.90 a       | 3.27 ± 0.82 abc | 0.85 ± 0.32 a |
| 5 (strain T64)/<br>5 (cepa T64) | 6.10 ± 1.47 bc                | 20.89 ± 4.23 bc             | 1.41 ± 0.48 a       | 3.38 ± 0.91 a            | 2.55 ± 0.72 a       | 3.70 ± 1.64 abc | 0.81 ± 0.29 a |
| 6 (strain T88)/<br>6 (cepa T88) | 5.77 ± 1.76 c                 | 21.14 ± 2.47 bc             | 1.34 ± 0.37 a       | 3.50 ± 0.71 a            | 2.71 ± 0.60 a       | 4.04 ± 1.40 ab  | 0.78 ± 0.30 a |
| 7 (strain T67)/<br>7 (cepa T67) | 6.07 ± 1.34 bc                | 23.18 ± 1.65 abc            | 1.31 ± 0.27 ab      | 3.65 ± 0.69 a            | 2.84 ± 0.52 a       | 4.04 ± 1.09 ab  | 0.76 ± 0.22 a |
| 8 (strain T33)/<br>8 (cepa T33) | 6.96 ± 1.87 ab                | 23.76 ± 3.81 a              | 1.43 ± 0.36 a       | 3.96 ± 1.01 <sup>a</sup> | 2.86 ± 3.00 a       | 3.56 ± 0.79 abc | 0.87 ± 0.25 a |

T1 without *Trichoderma* (control), T2, T5 and T7 (*T. asperellum*), T3 and T6 (*T. paratroviride*), T4 (*T. martiale*) and T8 (*T. tomentosum*). RDW: root dry weight; SDW: shoot dry weight; SI: slenderness index; DQI: Dickson quality index. Means (n = 36) with different letters in a column indicate statistically significant differences according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

T1 sin *Trichoderma* (testigo), T2, T5 y T7 (*T. asperellum*), T3 y T6 (*T. paratroviride*), T4 (*T. martiale*) y T8 (*T. tomentosum*). PSR: peso seco de raíces; PSA: peso seco parte aérea; IE: índice de esbeltez; ICD: índice de calidad de Dickson. Medias (n = 36) con letras distintas en una columna son valores estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

improved the development of *P. oocarpa* seedlings compared with the control. These results are consistent with those reported by López-López et al. (2016), Donoso et al. (2008), Yu and Luo (2020) in pine species following the application of *Trichoderma* spp.

According to the criteria of Sáenz-Reyes et al. (2010), all evaluated plants reached heights classified as high quality. No significant differences were observed in the SDW / RDW ratio ( $p = 0.1092$ ), with mean values ranging from 2.55 and 2.99. For the sturdiness quotient, ANOVA detected significant differences ( $p = 0.0002$ ), with T3 (Tp82, *T. paratroviride*) showing the highest value (4.13), followed by T6 (Tp88, *T. paratroviride*) and T7 (Ta67, *T. asperellum*). Conversely, the Dickson quality index (DQI) showed no significant differences among treatments ( $p = 0.3599$ ); however, T8 (Tt33, *T. tomentosum*), T4 (Tm69, *T. martiale*), T2 (Ta97, *T. asperellum*) and T5 (Ta64, *T. asperellum*) exhibited the highest values within the acceptable range (0.74 – 0.87). Chagas Junior et al. (2024) reported increases in DQI following the application of *T. asperellum* en *E. contortisiliquum*.

According to the standards proposed by Sáenz-Reyes et al. (2010), all evaluated treatments, including the control, produced plants within the acceptable ranges for robustness and the Dickson quality index.

## Conclusions

All native *Trichoderma* strains had a positive effect on reducing the incidence of *F. oxysporum* and enhancing the growth of *P. oocarpa* in the nursery. Strain T33 (*T. tomentosum*) stood out by reducing disease incidence by up to 50 % compared to the control and promoting the greatest morphological development of the seedlings. Overall, all strains improved seedling quality relative to the treatment without *Trichoderma*. Therefore, the use of native *Trichoderma* strain is recommended at a larger scale under field conditions. Additionally, it would be important to explore the efficacy of this antagonist against other phytopathogenic fungi, with the aim of incorporating it into integrated disease management programs for various forest species.

## Acknowledgments

The first author thanks the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) for the scholarship awarded, which facilitated the completion of graduate studies, and the CONACYT-CONAFOR sector-specific fund project entitled “Monitoreo, evaluación, prevención de daños y control de la secadera causada por *Fusarium circinatum* y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*” for funding the greenhouse experiments. The authors also thank Dr. Mario Valerio

así como el peso seco radical (PSR,  $p = 0.0018$ ). Las plantas inoculadas con T8 (*T. tomentosum*) obtuvieron el valor más alto (3.96 g) de PSA, aunque este fue estadísticamente similar al resto de los tratamientos, con excepción del testigo (2.68 g). Estudios como el de Yu et al. (2023), donde aplicaron *T. longibrachiatum* en *Pinus massoniana* Lamb., también señalan incrementos en altura y biomasa bajo estrés hídrico. En biomasa radical, *T. tomentosum* (T8, 1.43 g), *T. asperellum* (T5, 1.41 g) y *T. paratroviride* (T6, 1.34 g) mostraron los valores más altos. En general, todas las cepas mejoraron el desarrollo de plántulas de *P. oocarpa* respecto al testigo. Estos resultados son consistentes con los reportados por López-López et al. (2016), Donoso et al. (2008), Yu y Luo (2020) en especies de pino al aplicar *Trichoderma* spp.

Según los criterios de Sáenz-Reyes et al. (2010), todas las plantas evaluadas alcanzaron alturas clasificadas como calidad alta. No se encontraron diferencias significativas en la relación PSA / PSR ( $p = 0.1092$ ) con valores promedio entre 2.55 y 2.99. Para el índice de esbeltez, el ANDEVA detectó diferencias significativas ( $p = 0.0002$ ), donde T3 (Tp82, *T. paratroviride*) obtuvo el valor más alto (4.13), seguido de T6 (Tp88, *T. paratroviride*) y T7 (Ta67, *T. asperellum*). Por otro lado, el índice de calidad de Dickson (ICD) no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p = 0.3599$ ); sin embargo, T8 (Tt33, *T. tomentosum*), T4 (Tm69, *T. martiale*), T2 (Ta97, *T. asperellum*) y T5 (Ta64, *T. asperellum*) mostraron los valores más altos dentro del rango aceptable (0.74 – 0.87). Chagas Junior et al. (2024) también reportaron incrementos en el ICD al aplicar *T. asperellum* en *E. contortisiliquum*.

De acuerdo con los estándares propuesto por Sáenz-Reyes et al. (2010), todos los tratamientos evaluados, incluido el testigo, produjeron plantas dentro de los rangos aceptables de robustez e índice de calidad de Dickson.

## Conclusiones

Todas las cepas nativas de *Trichoderma* tuvieron efecto positivo en la reducción de la incidencia de *F. oxysporum* y en la mejora del crecimiento de *P. oocarpa* en vivero. La cepa T33 (*T. tomentosum*) sobresalió por reducir hasta 50 % la presencia de la enfermedad respecto al testigo y promover el mayor desarrollo morfológico de las plántulas. En general, todas las cepas promovieron la calidad de planta respecto al tratamiento sin *Trichoderma*. Por tanto, se recomienda considerar el uso de cepas nativas de *Trichoderma* a mayor escala en condiciones de campo; asimismo, sería importante explorar la eficacia de dicho antagonista frente a otros hongos fitopatógenos, con el propósito de incluirlo en el manejo integrado de enfermedades en varias especies forestales.

Velasco-García and Dra. Liliana Muñoz-Gutiérrez of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) for the donation of the seed used in this study.

### Conflict of interest declaration

The authors declare that they have no economic conflicts of interest or known personal relationships that could have influenced the research presented in this article.

### End of English version

### References / Referencias

- Alfenas, A. C., & Mafia, R. G. (2016). *Métodos em fitopatología* (2.<sup>a</sup> ed.). Universidad Federal de Viçosa.
- Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 257-269. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37012013006>
- Ceballos-Chávez, A. R., Lizárraga-Sánchez, G. J., López-Valenzuela, B. E., Félix-Gastélum, R., Longoria-Espinoza, R. M., & Beltrán-Peña, H. (2021). Uso de *Trichoderma asperellum* y lombricomposta para el control de secadera en *Physalis ixocarpa* Brot. *Ciencia en la frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ*, 16(02), 7-18. <https://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/cienciafrontera/article/view/4873>
- Chagas Junior, A. F., Dias, P. C., Martins, A. L. L., Oliveira, R. S. d., & Chagas, L. F. B. (2024). *Trichoderma asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg) as growth promoter in *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong. *Ciência Florestal*, 34(2), e64187. <https://doi.org/10.5902/1980509864187>
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2022). *Estado que guarda el sector forestal en México 2021*. <https://snif.cnf.gob.mx/#:~:text=Conforme%20a%20lo%20establecido%20en,de%20la%20sociedad%20mexicana%2C%20para>
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2023). *Estado que guarda el sector forestal en México 2022*. [https://infosen.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/65/3/2024-04-02-1/assets/documentos/Libro\\_Estado\\_que\\_Guarda\\_el\\_Sector\\_Forestal\\_en\\_Mexico.pdf](https://infosen.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/65/3/2024-04-02-1/assets/documentos/Libro_Estado_que_Guarda_el_Sector_Forestal_en_Mexico.pdf)
- Donoso, E., Lobos, G. A., & Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *BOSQUE*, 29(1), 52-57. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002008000100006>
- Fabián-Plesníková, I., Sáenz-Romero, C., Cruz de León, J., Martínez-Trujillo, M., & Sánchez-Vargas, N. M. (2020). Parámetros genéticos de caracteres de crecimiento en un ensayo de

### Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada que facilitó la conclusión sus estudios de postgrado y al proyecto del fondo sectorial CONACYT-CONAFOR titulado “Monitoreo, evaluación, prevención de daños y control de la secadera causada por *Fusarium circinatum* y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*” por el financiamiento para el trabajo en invernadero. Agradecemos también al Dr. Mario Valerio Velasco-García y a la Dra. Liliana Muñoz-Gutiérrez del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por la donación de la semilla utilizada en este trabajo.

### Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses económicos ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en la investigación presentada en este artículo.

### Fin de la versión en español

- progenies de *Pinus oocarpa*. *Madera y Bosques*, 26(3), 1-14. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2632014>
- Flores-Garnica, J. G., & Reyes-Cárdenas, O. (2019). Distribución espacial de *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl. mediante la estimación de la densidad Kernel. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(53), <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i53.406>
- Flores-Pacheco, J. A. (2017). Chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) historia, evolución, dispersión y estrategias de manejo. *Nexo Revista Científica*, 30(1), 19-42. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i01.5170>
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Valdovinos-Ponce, G., & Equihua-Martínez, A. (2017). Efecto de *Fusarium circinatum* en la germinación y crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* en tres sustratos. *Agrociencia*, 51(8), 895-908. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30253817006>
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D., & Méndez-Montiel, J. T. (2019). *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. in three substrates. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 25(3), 353-367. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.12.088>
- Gutiérrez-Flores, L. M., López-Reyes, L., Hipólito-Romero, E., Torres-Ramírez, E., Castañeda-Roldán, E. I., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2022). Biological control perspectives in the pine forest (*Pinus* spp.), an environmentally friendly alternative to the use of pesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3), 401-424. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2205-5>

- Halifu, S., Deng, X., Song, X., & Song, R. (2019). Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mangolica* annual seedlings. *Forests*, 10(9), 758. <https://doi.org/10.3390/f10090758>
- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (V. Berenger Navarro & A. Berenguer Murcia, Trad.; 3.ª ed.). Editorial Reverté (Obra original publicada en 2003 *Quantitative Chemical Analysis*, 6.ª ed., por W. H. Freeman and Company).
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1185. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
- Larios-Larios, E. J., Valdovinos-Nava, J. W., Chan-Cupul, W., García-López, F. A., Manzo-Sánchez, G., & Buenrostro-Nava, M. T. (2019). Biocontrol de Damping off y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq.) con *Trichoderma* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 471-483. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.332>
- Liu, X., Cao, A., Yan, D., Ouyang, C., Wang, Q., & Li, Y. (2019). Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *International Journal of Pest Management*, 67, 1-8. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>
- López-López, N., Segarra, G., Vergara, O., López-Fabal, A. & Trillas, I. M. (2016) Compost from forest cleaning green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata*. *Biological Control*, 95, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.014>
- Moreno-Delgado, F. (2023). Potencial antagonista del género *Trichoderma* contra *Fusarium circinatum* [Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados]. Texcoco, Estado de México. 68 p.
- Nandini, B., Puttaswamy, H., Saini, R. K., Prakash, H. S., & Geetha, N. (2021). Trichovariability in rhizosphere soil samples and their biocontrol potential against downy mildew pathogen in pearl millet. *Scientific Reports*, 11(1), 9517. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89061-2>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2020). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2020 – Principales resultados*. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca8753es>
- Ortega-Cerón, M. A., Hernández-Acosta, E., García-Díaz, S. E., & Villanueva-Morales, A. (2024). Control biológico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell 1998 con *Trichoderma harzianum* Rifai 1969 en *Pinus devoniana* Lindl. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 15(83), 107-130. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v15i83.1446>
- Patel, R., Mehta, K., Prajapati, J., Shukla, A., Parmar, P., Goswami, D., & Saraf, M. (2022). An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes. *Biological Control*, 174(105012). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105012>
- Regliński, T., Rodenburg, N., Taylor, J. T., Northcott, G. L., Ah Chee, A., Spiers, T. M., & Hill, R. A. (2011). *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. *Forest Pathology*, 42(1), 75-78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00710.x>
- Robles-Yerena, L., Leyva-Mir, S. G., Cruz-Gómez, A., Nieto-Ángel, D., & Tovar-Pedraza, J. M. (2017). *Fusarium oxysporum* Schldtl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(36), 25-36. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i36.57>
- Sáenz-Reyes, J. T., Villaseñor-Ramírez, F. J., Muñoz-Flores, H. J., Rueda-Sánchez, A., & Prieto-Ruiz, J. A. (2010). *Calidad de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán*. Folleto técnico núm. 17. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan.
- SAS Institute. (2002). *The SAS System for Windows* [software]. Release 9.4. SAS Institute. Cary, NC.
- Tuite, J. (1969). *Plant pathological methods: Fungi and bacteria*. Editorial Burgués Publishing Company.
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>
- Yu, C., Jiang, X., Xu, H., & Ding, G. (2023). *Trichoderma longibrachiatum* inoculation improves drought resistance and growth of *Pinus massoniana* seedlings through regulating physiological responses and soil microbial community. *Journal of Fungi*, 9(7), 694. <https://doi.org/10.3390/jof9070694>
- Yu, C., & Luo, X. (2020). *Trichoderma koningiopsis* controls *Fusarium oxysporum* causing damping-off in *Pinus massoniana* seedlings by regulating active oxygen metabolism, osmotic potential, and the rhizosphere microbiome. *Biological Control*, 150, 104352. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104352>
- Zas, A. R., & Sampedro, P. L. (2015). Resistencia de los pinos a plagas y enfermedades: Nuevas oportunidades de control fitosanitario. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, (39), 259-273. <https://doi.org/10.31167/csef.v0i39.17466>