







## Efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* en México

Rómulo García-Velasco<sup>1\*</sup> , Anahid Alonso-Bahena<sup>1</sup> , Grisel Domínguez-Arizmendi<sup>1</sup> , Sotero Aguilar-Medel<sup>1</sup> , Martha E. Mora-Herrera<sup>1</sup> , Barbarita Companioni-González<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo. Estado de México. México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Coahuila, México. \*Correo electrónico: rgarciave@uaemex.mx

### RESUMEN

En México, el Estado de México representa el principal productor de *Rosa* sp. en el país. Las mayores producciones en el cultivo se localizan en la región sur del estado que incluye los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas. Sin embargo, la producción de este cultivo se encuentra afectada por la incidencia de *Rosellinia necatrix* Prill, agente causal de la pudrición blanca de la raíz. El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *R. necatrix* en el cultivo de la rosa, en la región sur del Estado de México. Se realizó la selección de los cultivos monospóricos del hongo a partir de las cepas nativas obtenidas en las muestras de suelo. Se logró la identificación morfológica y molecular de las cepas nativas, y establecer los mecanismos de acción *in vitro*. Se obtuvieron dos cepas nativas *Trichoderma tomentosum* (SS1-6) y *Trichoderma barbatum* (SS2-5). Los mecanismos de antagonismos evidenciados en ambas cepas fueron competencia, antibiosis por metabolitos volátiles y difusibles. El micoparasitismo sólo se observó en la cepa nativa SS1-6. La cepa SS1-6 obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (89 %) respecto a la cepa SS2-5. El efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados se evidenció en las 2 cepas (SS1-6 y SS2-5). Ambas cepas mostraron ser promisorias para su utilización en el control biológico de *R. necatrix* en el cultivo de la rosa en la región sur del Estado de México.

**Palabras clave:** control biológico, patógeno, plantas ornamentales, *Rosa* sp.

## Antagonistic effect of native strains of *Trichoderma* spp. against the phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix* in Mexico

### ABSTRACT

In Mexico, Mexico State represents the main producer of *Rosa* sp. in the country. The largest productions in the crop are located in the southern region of the state, which includes the municipalities of Tenancingo, Villa Guerrero, and Coatepec Harinas. However, the production of this crop is affected by the incidence of *Rosellinia necatrix* Prill, the causal agent of white root rot. The present work was carried out to determine the antagonistic effect of native strains of *Trichoderma* spp. against the phytopathogenic fungus *R. necatrix* in rose cultivation, in the southern region of the Mexico State. The selection of the monosporic cultures of the fungus was made from the native strains obtained in the collected soil samples. Morphological and molecular identification of the native strains was achieved and *in vitro* mechanisms of action. Two native strains *Trichoderma tomentosum* (SS1-6) and *Trichoderma barbatum* (SS2-5) were obtained. The antagonism mechanisms evidenced in both strains were competition, antibiosis by volatile and diffusible metabolites. Mycoparasitism was only observed in the native strain SS1-6. The SS1-6 strain obtained the highest percentage of inhibition (89 %) concerning the SS2-5 strain. The effect of volatile metabolites with secreted antifungal activity was evidenced in both strains (SS1-6 and SS2-5). Both strains showed promise for their use in the biological control of *R. necatrix* in rose cultivation in the southern region of Mexico State.

**Key words:** biological control, pathogens, ornamental plants, *Rosa* sp.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Rosa* sp. representa uno de los principales ornamentales que exporta México. El Estado de México constituye el principal productor de *Rosa* sp. en el país (SIAVI 2019). Las mayores producciones en el cultivo se localizan en la región sur del estado, que incluye los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas (SIAP 2018). Sin embargo, la producción de este cultivo se encuentra afectada por la incidencia de una serie de fitopatógenos en los que se encuentra a *Rosellinia necatrix* Prill (= *Dematophora necatrix* (Hart.) Berl.), agente causal de la pudrición blanca de la raíz (García-Velasco *et al.* 2012, 2017).

*Rosellinia* sp. constituye un parásito facultativo con un amplio rango de hospederos (García *et al.* 2005). En alrededor de 170 especies, 63 géneros y 30 familias se ha demostrado sus daños. El patógeno afecta a un gran número de especies leñosas y semileñosas. Se ha encontrado en bulbos y rizomas, pero principalmente en árboles frutales, forestales y plantas ornamentales (Pérez-Jiménez 2006).

Los principales síntomas ocasionados por la enfermedad se presentan en manchones, sobre todo en zonas del suelo con exceso de humedad. Por otra parte, en el suelo se observan raíces invadidas por cordones miceliales blanco algodonoso que se tornan a negro cuando envejece. En la parte aérea las plantas presentan escaso follaje y muerte de ramas. Las hojas muertas pueden permanecer adheridas a las ramas durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, en algunas plantas que se encuentran infectadas no se observan síntomas visuales en la parte aérea. Esto se debe a que la sintomatología de la enfermedad depende de la edad fisiológica de la planta y de la severidad de la enfermedad (García-Velasco *et al.* 2012).

El principal método de manejo que se utiliza para la pudrición blanca de la raíz lo constituye el control químico. El mismo consiste en realizar aplicaciones preventivas con bromuro de metilo en el suelo. Además, cuando aparecen los primeros síntomas en las plantas se recomienda efectuar aplicaciones de fungicidas sintéticos (García-Velasco *et al.* 2017, Alonso-Bahena *et al.* 2018).

El control de esta enfermedad con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente. Por otro lado, varios autores plantean que este método de control no brinda resultados satisfactorios, por la aparición de resistencia en el patógeno (Schirawski y Perlin 2018, Stringlis *et al.* 2018, Companioni-González *et al.* 2019). Por ello, la utilización de microorganismos para el manejo de plagas y enfermedades constituye una alternativa viable para asegurar la producción en el cultivo de forma sana.

Los microorganismos antagonistas se encuentran en el suelo de forma natural y ofrecen varios beneficios para las plantas. *Trichoderma* se considera como uno de los antagonistas de hongos fitopatógenos más utilizado en la agricultura moderna sustentable (Youseff *et al.* 2016, Pineda-Insuasti *et al.* 2017). Sin embargo, esta capacidad como antagonista es altamente variable. Según Mihuta-Grimm y Rowe (1986) de 255 aislamientos obtenidos de diferentes lugares, sólo el 15 % fue efectivo en el control de *Rhizoctonia*. En este mismo sentido, Arcia (1995) planteó que las cepas nativas de un lugar son más efectivas que las importadas. Martínez-Bolaños *et al.* (2008) mostraron que la capacidad antagonista depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción.

Por lo tanto, el éxito en la formulación y comercialización de biopreparados fúngicos mediante la industria biotecnológica para su aplicación en la agricultura requiere de estudios previos en la selección de aislamientos promisorios para el control y del conocimiento de los mecanismos de acción relacionados con dicho control (Pineda-Insuasti *et al.* 2017).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *R. necatrix* en el cultivo de la rosa, en la región sur del Estado de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología, Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

### **Colecta de muestras de suelo para el aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp.**

Se realizó la colecta de muestras de suelo en un bosque de encino deteriorado de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México. Las muestras de suelo se tomaron según la técnica descrita por Guigón-López *et al.* (2004). Para ello se seleccionaron cinco puntos de muestreo. En la parte de la rizósfera, a una profundidad de 20 cm se tomó una muestra que contenía 200 g de suelo; y en total por los cinco puntos muestreados se colectó 1 kg de suelo. Todas las muestras colectadas se homogenizaron y después se tomó una muestra de 10 g de suelo. Se añadió un volumen de 90 mL de agua destilada estéril y se agitó durante 20 minutos en una placa de agitación Cimarec®. Posterior a este proceso, se realizó una dilución seriada (5 x 1:9 mL). En las tres últimas diluciones se tomó 1 mL, y se añadió en el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp. (Askew y Lang 1993).

Cada una de las siembras se incubó a  $28 \pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, y con un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad. Se realizaron observaciones de forma diaria para determinar la presencia de crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. Las colonias de este género crecen de forma rápida, y presentan un micelio aéreo hialino algodonoso, según la cepa y el medio de cultivo. Por el reverso de la caja Petri se pueden observar diversas tonalidades de color: amarillo, ámbar, rojizo opaco o amarillo verdoso. Además, estas colonias desprenden un olor característico del género, similar a coco o alcanfor (Gams y Bissett 2002). A partir de las características observadas en el crecimiento de las colonias del hongo, se seleccionaron muestras y se realizaron preparaciones para su observación en un microscopio Carl Zeiss®. Se corroboraron con la clave taxonómica descrita por Barnett y Hunter (1998) y literatura especializada (Gams y Bissett 2002).

### **Obtención de cultivos monospóricos en las cepas nativas de *Trichoderma* spp.**

Se realizaron cultivos monospóricos a partir de las cepas nativas obtenidas en las muestras de suelo colectadas. Después de los siete días de la incubación y crecimiento del hongo antagonista se realizó el cultivo monospórico. En una colonia del

hongo se añadieron 15 mL de agua destilada estéril y con ayuda de un asa de inoculación se dispersaron las esporas del hongo. Seguidamente, se tomó 1 mL de la suspensión de esporas del antagonista; y se transfirió a un tubo de cultivo que contenía 9 mL de agua destilada estéril.

A partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas (6 x 1:9 mL); y de cada tubo de cultivo se tomó 1 mL de la dilución; y se inocularon en una placa de Petri que contenía medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). El cultivo del hongo se incubó durante dos semanas en las condiciones descritas con anterioridad. Cada 24 h se realizaron las observaciones visuales en el crecimiento micelial de las cepas nativas. Seguido de la observación del crecimiento micelial del hongo; se procedió a la inoculación de seis colonias monospóricas de mayor tamaño a una nueva placa Petri que contenía medio de cultivo PDA. Después del proceso de inoculación, cada 24 h se procedió a trazar el crecimiento radial del hongo hasta que al menos una cubrió por completo el cultivo del antagonista en la placa Petri. Se determinó el área de crecimiento micelial del hongo mediante el programa ImageJ 1.43 (Schneider *et al.* 2012).

Los datos se analizaron mediante una regresión lineal simple con el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2017). Por otro lado, en cada cultivo monospórico del antagonista se determinó la concentración de esporas del hongo. El conteo de esporas se realizó mediante una cámara de Neubauer (Celeromics, Valencia, España). La selección de los cultivos monospóricos del hongo se realizó teniendo en cuenta los mayores valores en el área de crecimiento micelial y la concentración de esporas del hongo antagonista en las cepas nativas.

### **Identificación morfológica del género de las cepas nativas**

La identificación morfológica del género de las cepas nativas se realizó mediante la clave taxonómica descrita por Gams y Bissett (2002). Para ello se utilizó la técnica de microcultivos del hongo (Ramírez *et al.* 2015). Se colocó en el interior de una caja Petri un papel absorbente y un triángulo de aluminio. Por último; se colocó un porta objeto y un disco de 8 mm de diámetro de medio de cultivo PDA.

Luego, se inoculó en uno de los extremos del disco del medio de cultivo PDA la cepa nativa del

antagonista. Se añadió agua glicerinada al 5 % en el papel absorbente; y se procedió a la incubación de los microcultivos para ambas cepas nativas. Las observaciones en el crecimiento micelial de los microcultivos se realizaron de forma diaria.

Tres días después del proceso de inoculación e incubación del hongo se procedió a separar de forma cuidadosa el porta objeto, con el interés de no dañar el desarrollo del hongo adherido a la superficie del porta objeto. Por otro lado, se colocó la muestra en un portaobjetos con azul de algodón; y se observaron en un microscopio Carl Zeiss®; con el objetivo de realizar la identificación morfológica del género de las cepas nativas.

### **Identificación molecular de las especies de las cepas nativas de *Trichoderma* spp.**

Las cepas nativas obtenidas SS1-6 y SS2-5 se cultivaron en medio de cultivo PDA. Luego de siete días de incubación se tomó una pequeña porción del crecimiento micelial del hongo en ambas cepas nativas. Se procedió al proceso de extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante el kit de extracción AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Axygen®. Se usaron los cebadores universales ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC e ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (White *et al.* 1990) para la amplificación mediante PCR de las regiones internas ITS4 e ITS5 de los genes 18S–5.8S y 5.8S–28S.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador profesional estándar, Biometra®, Alemania. La mezcla de amplificación estuvo compuesta por Taq DNA Buffer PCR 1X; MgCl<sub>2</sub> 0,75 mM; dNTP's 0,2 mM; Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen, USA); 10 µM de cada cebador (ITS4-ITS5) y 80 ng de ADN total, en un volumen final de 25 µL para cada reacción.

El programa de amplificación consistió en una fase de desnaturalización inicial con temperatura de 96 °C durante 3 minutos. Luego, una fase de 35 ciclos con temperaturas de: 95 °C durante 30 segundos; 55 °C por 30 segundos y 72 °C durante 45 segundos. Seguida de una fase de extensión final con temperatura de 72 °C por 4 minutos.

Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. La tinción se realizó con bromuro de etidio (5 mg·L<sup>-1</sup>) y los geles

se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc, Bio-Rad®, USA.

Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones (5' → 3' y 3' → 5') por la compañía Macrogen, en Corea. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.0.0 (Hall 1999) y se alinearon con la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI 2019).

### **Determinación de los mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *R. necatrix***

#### **Cepas patogénicas**

En la experimentación se utilizó la cepa patogénica de *R. necatrix* (VG2GR) procedente del cepario del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitarios de Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, México. La misma se aisló de plantas enfermas en el cultivo de *Rosa* sp., en el municipio de Tenancingo, Estado de México, México. La cepa patogénica de *R. necatrix* (VG2GR); y las cepas nativas de *Trichoderma* spp. (SS1-6 y SS2-5) se sembraron en medio de cultivo PDA. Después de siete días del proceso de crecimiento e incubación de los hongos descritos se procedió a realizar los siguientes ensayos de mecanismos de acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *R. necatrix*.

#### **Competencia**

La competencia entre los microorganismos (patógeno-antagonista) se determinó mediante cultivos duales en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA (Bell *et al.* 1982). Para ello, se tomaron discos de 8 mm de diámetro en ambos hongos (patógeno-antagonista). Estos se sembraron en los extremos de la caja Petri a una separación de 6 cm entre ellos. Luego se incubaron según las condiciones mencionadas.

Las observaciones en el crecimiento de ambos grupos de microorganismos se realizaron de forma diaria. A los quince días después del proceso de incubación se determinó la clasificación de antagonismo por medio del pictograma propuesto por Bell *et al.* (1982), modificado por Ruiz (2011). Se trazó el área de crecimiento micelial del patógeno para determinar el

área de inhibición del crecimiento antagonico. Para ello se tomaron imágenes del reverso de la caja de Petri; y se utilizó el programa ImageJ 1.43 (Schneider *et al.* 2012).

### Antibiosis por metabolitos volátiles

El efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. se determinó mediante la técnica de cajas Petri superpuestas (Allori *et al.* 2014). Para ello se sembraron disco de 8 mm de diámetro de ambos grupos de hongos de forma independiente en cajas de Petri. Se confrontaron ambos grupos de microorganismos donde se acercaron las dos bases de las cajas Petri inoculadas con los hongos, separadas con papel celofán estéril. Luego, se sellaron e incubaron en las condiciones descritas. Cada 24 h, después del proceso de incubación se determinó el área de crecimiento micelial del patógeno mediante el programa ImageJ 1.43 (Schneider *et al.* 2012).

### Antibiosis por metabolitos difusibles

El efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. se determinó mediante la técnica de papel celofán (Dennise y Webster 1971). Esta consistió en colocar el papel celofán estéril sobre el medio de cultivo PDA. Posterior a ello, se colocó encima un disco de 8 mm de diámetro de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. a ensayar en la prueba de antibiosis y se incubaron en las condiciones mencionadas con anterioridad. Luego de 48 h, se eliminó el papel celofán que contenía el disco del hongo antagonista y se procedió a inocular a *R. necatrix*. La incubación del cultivo de los hongos se realizó en las condiciones descritas. Cada 24 h, después del proceso de incubación se determinó el área de crecimiento micelial del patógeno mediante el programa ImageJ 1.43 (Schneider *et al.* 2012).

### Micoparasitismo

Para determinar el micoparasitismo de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno se utilizó la técnica de microcultivos (Ramírez *et al.* 2015). A las 72 h del proceso de inoculación e incubación de ambos hongos (patógeno-antagonista) en el interior de la placa Petri se tomaron imágenes

mediante una cámara fotográfica (CANON) integrada a un microscopio Carl Zeiss®.

Se consideró como micoparasitismo cuando el micelio de las cepas del antagonista se encontró en contacto o adherido al micelio del patógeno, en enrollamiento, en lisis de las paredes celulares del patógeno y/o haustorios del hongo antagonista en las hifas del patógeno (Howell 2003).

### Diseño experimental y análisis estadístico

En toda la experimentación se utilizó un diseño completo al azar, donde cada tratamiento incluyó siete repeticiones. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2017). En la generalidad de los experimentos se realizaron pruebas paramétricas: ANOVA y LSD. La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de cultivos monospóricos en las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

En las muestras de suelo colectadas se encontraron dos cepas nativas (SS1 y SS2) de *Trichoderma* spp. En la cepa nativa SS1 se seleccionó el cultivo monospórico SS1-6 como el cultivo que presentó la mayor área de crecimiento micelial (13,992 cm<sup>2</sup>) y mayor concentración de esporas (3,1 x 10<sup>7</sup> conidios·mL<sup>-1</sup>) con marcadas diferencias significativas respecto al resto de los cultivos monospóricos obtenidos en la cepa SS1.

Sin embargo, en la cepa SS2 se seleccionó el cultivo monospórico SS2-5. El cual mostró la mayor concentración de esporas (2,8 x 10<sup>6</sup> conidios·mL<sup>-1</sup>) y 10,481 cm<sup>2</sup> en su área de crecimiento micelial del hongo antagonista; con diferencias significativas con el resto de los cultivos obtenidos en la cepa SS2 (Cuadro 1).

Por otro lado, de forma visual se observaron diferencias cualitativas en el crecimiento micelial en ambas cepas crecidas en el medio de cultivo PDA. En la cepa SS1-6 se observó la presencia de colonias con micelio blanco algodonoso y compacto a medida de la edad del cultivo del hongo; y la presencia de tonalidades verdosas con apariencia de anillos concéntricos como resultado de la producción de conidios (Figura 1-A).

Cuadro 1.- Determinación del área de crecimiento y la concentración de esporas del hongo antagonista en las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Cultivos monospóricos de las cepas nativas	Área del crecimiento micelial del antagonista (cm <sup>2</sup> )	Concentración de esporas del antagonista (conidios·mL <sup>-1</sup> )
SS1-1	10,915	2,2 x 10 <sup>7</sup>
SS1-2	11,456	3,2 x 10 <sup>7</sup>
SS1-3	13,544	1,8 x 10 <sup>7</sup>
SS1-4	13,328	2,6 x 10 <sup>7</sup>
SS1-5	11,108	1,3 x 10 <sup>7</sup>
SS1-6*	13,992	3,1 x 10 <sup>7</sup>
SS2-1	10,677	1,7 x 10 <sup>6</sup>
SS2-2	10,488	1,5 x 10 <sup>6</sup>
SS2-3	10,447	1,8 x 10 <sup>6</sup>
SS2-4	10,473	2,2 x 10 <sup>6</sup>
SS2-5*	10,481	2,8 x 10 <sup>6</sup>
SS2-6	11,106	2,1 x 10 <sup>6</sup>

\* cultivos monospóricos seleccionados en las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

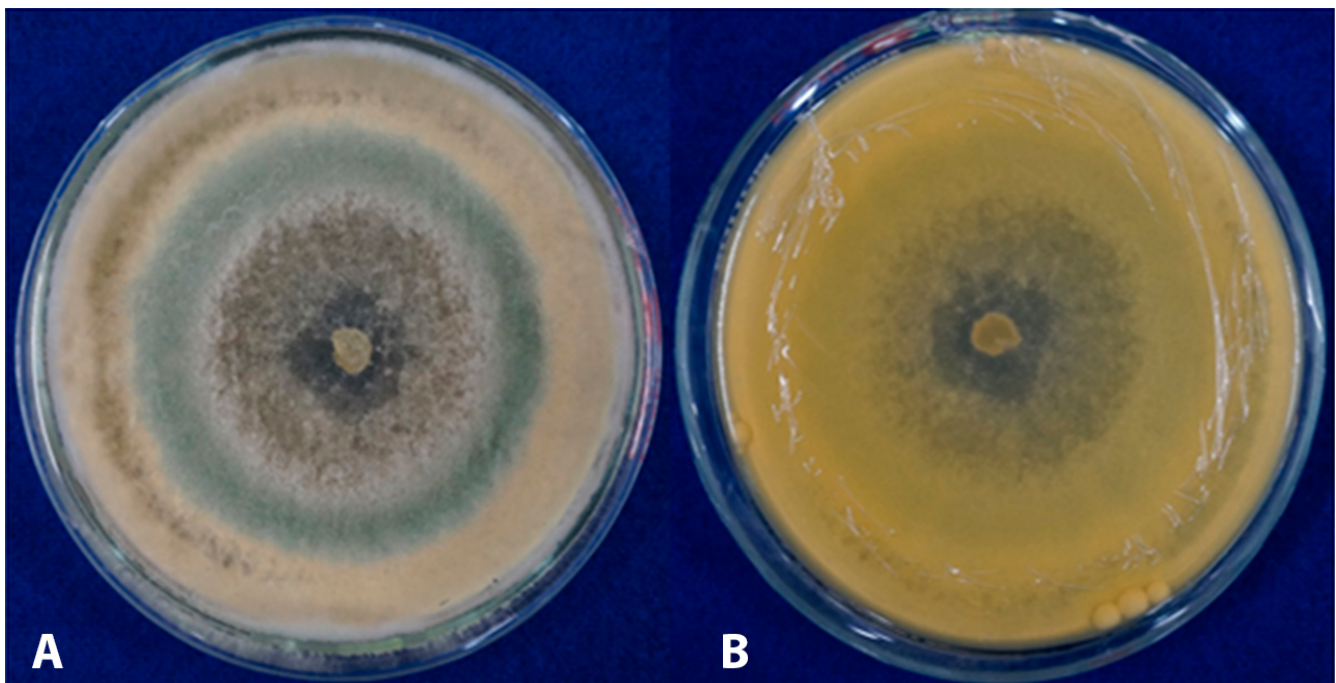


Figura 1. Cultivo monospórico de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. SS1-6. A: anverso de la placa; B: reverso de la placa

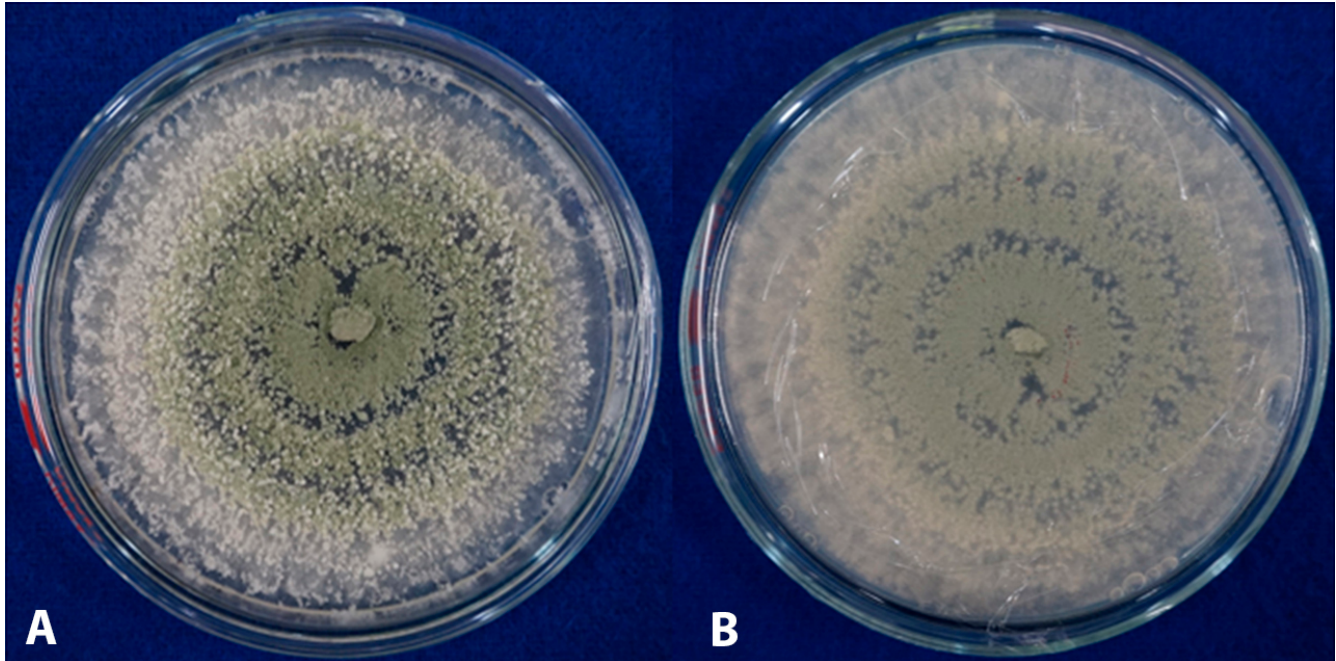


Figura 2. Cultivo monospórico de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. SS2-5. A: anverso de la placa; B: reverso de la placa

Además, se apreció una pigmentación amarillenta (Figura 1-B). Sin embargo, en la cepa SS2-5 se observó un crecimiento micelial en forma de anillos concéntricos y grumos donde se agrupan los conidios (Figura 2-A) y una pigmentación blanca (Figura 2-B).

En este sentido, Ibarra-Medina *et al.* (2010) con el interés de obtener microorganismos potenciales para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* realizaron el aislamiento de cepas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelo. Mediante la técnica de trampas con esclerocios obtuvieron setenta y un aislados fúngicos de *Trichoderma*. Seguidamente, evaluaron su capacidad micoparasítica sobre el micelio; y esclerocios de ambos patógenos.

Por otro lado, Samaniego-Fernández *et al.* (2018) describen el uso de trampas a base de arroz cocido o de forma directa en el medio de cultivo PDA para el aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. Para ello determinaron el crecimiento lineal diario (radios de las colonias), la velocidad de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los antagonistas. Las cepas autóctonas de *Trichoderma* aisladas e identificadas fueron *Trichoderma* 2T-aislado, *T. harzianum* 6(A-53)2 y *T. viride* 4(TS-3)1. *Trichoderma* 2T-aislado resultó el

antagonista *in vitro* más eficiente contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium* spp. y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Seguida de *T. viride* 4(TS-3)1 (biocontrolador de *R. solani* y *S. rolfsii*; y con menor capacidad antagonica contra *Fusarium* spp.) y *T. harzianum* 6(A-53)2.

Mientras que Herrera-Jiménez *et al.* (2018) obtuvieron un aislamiento de *T. tomentosum* a partir de raíces de plantas de maíz; el cual mostró efecto de estimulación del crecimiento en el cultivo.

#### Identificación morfológica del género de las cepas nativas

Las características encontradas en ambas cepas nativas (SS1-6 y SS2-5) corresponden con las planteadas por otros autores para el género *Trichoderma* spp. En ambas cepas se observaron las siguientes características morfológicas: micelio septado con pigmentación de color verde; conidióforos ramificados; fiálides en forma de botella y verticiladas; y conidios ovalados de color verde (Figura 3 A y B).

En la cepa nativa SS1-6 se obtuvo que los conidios resultaron en promedio 0,232  $\mu\text{m}$  de largo y 0,161  $\mu\text{m}$  de ancho. El largo de las fiálides fue de 1,263  $\mu\text{m}$ , con una base de 0,124  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, los conidios en

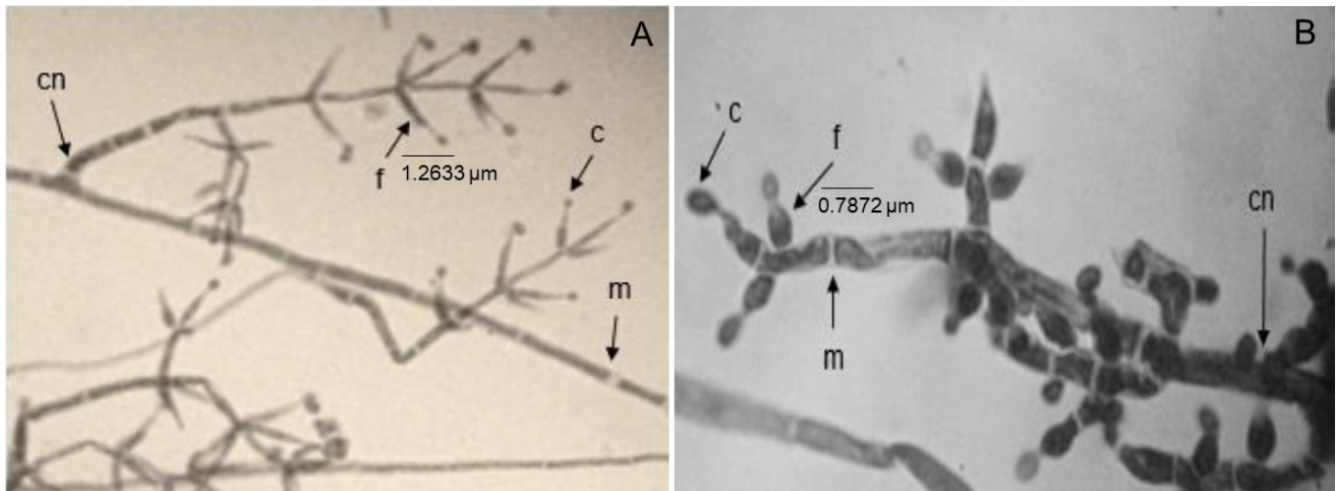


Figura 3. Identificación morfológica de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Micelio septado (m), conidióforos (cn), fiálides (f) y conidios (c). (A) Cepa nativa SS1-6 y (B) cepa nativa SS2-5, 100x.

la cepa SS2-5 midieron en promedio 0,31  $\mu\text{m}$  de largo y 0,149  $\mu\text{m}$  de ancho. Las fiálides 0,787  $\mu\text{m}$  de largo y 0,250  $\mu\text{m}$  en su base (Cuadro 2). Guigón-López *et al.* (2010) determinaron que seis cepas nativas seleccionadas morfológicamente fueron similares a *T. harzianum* y a *T. viride*. Las cepas nativas TC74, TC74M y T341 desarrollaron colonias cuyas características, en conjunto con el patrón de ramificación y morfología de los conidióforos, color y forma de los conidios fueron similares a las características de *T. harzianum*. Mientras que las cepas T359 y T479 mostraron características similares a las descritas para *T. viride*.

### Identificación molecular de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. a nivel de especie

Las secuencias de nucleótidos obtenidas y alineadas mediante la base de datos GenBank (NCBI 2019) mostraron que las cepas nativas obtenidas pertenecen a dos especies del género *Trichoderma* spp. La cepa SS1-6 se alineó con el aislamiento con número de acceso KR995108.1 correspondiente a *T. tomentosum* Bissett. La cepa SS2-5 se alineó con el aislamiento con el código de acceso MH863657.1 con 100 % correspondiente a *T. barbatum* Samuels (Cuadro 3). En la actualidad existen alrededor de 348 especies de este género (COL 2018). Sin embargo, su

Cuadro 2.- Identificación morfológica de las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Cepas nativas	Conidios					
	Largo ( $\mu\text{m}$ )			Ancho ( $\mu\text{m}$ )		
	Máximo	Mínimo	X*	Máximo	Mínimo	X*
SS1-6	0,35	0,09	0,232	0,24	0,04	0,161
SS2-5	0,65	0,12	0,31	0,36	0,06	0,149
Cepas nativas	Fiálides					
	Largo ( $\mu\text{m}$ )			Bases ( $\mu\text{m}$ )		
	Máximo	Mínimo	X*	Máximo	Mínimo	X*
SS1-6	1,76	0,86	1,263	0,25	0,06	0,124
SS2-5	1,84	0,3	0,787	0,79	0,08	0,25

\* promedio de 30 estructuras de las cepas nativas de *Trichoderma* spp



Cuadro 3.- Identificación molecular de las cepas nativas de *Trichoderma* spp., alineadas con especies mantenidas en el GenBank.

Cepas nativas	Cebadores	Nucleótidos (#)	Especies identificadas	Número de acceso GenBank	Similitud (%)	Datos de las accesiones	
						Hospedero / sustrato	Origen geográfico
SS1-6	ITS4	571	<i>T. tomentosum</i>	KR995108.1	100	Colección	Lituania
	ITS5	571	<i>T. tomentosum</i>	KR995108.1	100	-	-
SS2-5	ITS4	574	<i>T. barbatum</i>	MH863657.1	99,83	raíz de <i>Fragaria</i> sp.	Michigan USA
	ITS5	573	<i>T. barbatum</i>	MH863657.1	100	-	-

utilización como agentes para el control biológico de enfermedades se limitan para pocas especies entre ellas encontramos: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. viridae*, *T. hamantum*, *T. reesei* y *T. koningii* (Martínez *et al.* 2013, Duarte-Leal *et al.* 2018).

En la actualidad se encuentran pocos estudios relacionados con el uso de las especies *T. tomentosum* y *T. barbatum* como agentes biológicos en plantas. Herrera-Jiménez *et al.* (2018) compararon el efecto de dos cepas de *Trichoderma* (*T. tomentosum*: EMMFRS1C2 y *T. harzianum*: MichV6S3C2) productoras de indol con respecto a la aplicación de dos fitohormonas exógenas IAA (ácido indolacético) e IBA (ácido indol-3-butírico) en el crecimiento de plantas de maíz. Según los parámetros evaluados tales como altura, longitud de la raíz, área de la hoja, raíz, tallo y peso seco total, las mejores respuestas de crecimiento en las plantas se lograron en las plantas inoculadas con conidios de las cepas de *T. tomentosum* (EMMFRS1C2) y *T. harzianum* (MichV6S3C2). En otro estudio realizado por Hicks *et al.* (2014) demostraron que *T. barbatum* inhibe la enfermedad causada por *Rhizoctonia* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* Bert. ex Walp.) en condiciones controladas. A su vez promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas.

#### Determinación de los mecanismos de acción in vitro de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *R. necatrix*

##### Competencia

En el crecimiento antagonico de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el cultivo dual con *R. necatrix* se observó que ambas cepas (SS1-6 y SS2-5) lograron su

primer contacto con el patógeno a partir del tercer y cuarto día, después del proceso de inoculación e incubación del cultivo dual. No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Figura 4).

Sin embargo, según la clasificación de antagonismo descrito por Ruíz (2011), la cepa SS1-6 se clasifica en la clase 1, con marcadas diferencias respecto a la cepa SS2-5. Por otra parte, en la cepa SS1-6 se obtuvieron los mayores valores en el área de intersección del hongo antagonista (5,51 cm<sup>2</sup>). Se logró la menor área de crecimiento micelial del patógeno (5,51 cm<sup>2</sup>) y un porcentaje de inhibición de 89 %, con diferencias significativas en relación a la cepa SS2-5 y con el tratamiento control (Cuadro 4).

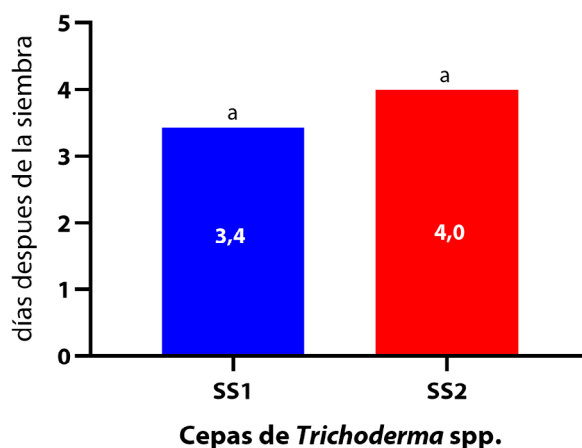


Figura 4. Crecimiento antagonico de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el cultivo dual con *Rosellinia necatrix*. Medias con letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, LSD: P>0,05).

Cuadro 4.- Área de crecimiento micelial de *Rosellinia necatrix* en cultivos duales con *Trichoderma* spp., después de 15 días de inoculación de ambos microorganismos.

Cepas nativas	Clasificación de antagonismo <sup>¶</sup>	Área de intersección (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Inhibición (%) <sup>*</sup>
SS1-6	1a	5,51a	5,51a	89,0
SS2-5	4,29b	8,88a	15,27b	69,3
Testigo	No aplica	No aplica	49,81c	No aplica

<sup>¶</sup>: cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. <sup>\*</sup> respecto al testigo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, LSD: P>0,05).

*Trichoderma* spp. presenta distintos mecanismos de acción para ejercer su antagonismo. Lo cual depende de las características de la cepa, del patógeno; y de las condiciones ambientales. Puede actuar por medio de competencia, antibiosis, micoparasitismo, inducción de resistencia sistémica y estimulación de crecimiento vegetal (Waghunde *et al.* 2016). En este sentido, Alonso *et al.* (2018) aislaron cepas nativas de *Trichoderma* spp., y probaron el efecto *in vitro* frente a *R. necatrix* y *Verticillium dahlia*. Ambos, organismos patógenos importantes en el cultivo de rosa (*Rosa* spp.), en la región florícola del sur del Estado de México. En dicho estudio determinaron el grado de competencia por medio de cultivo dual y metabolitos volátiles de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (SS1, SS2, y Cu-B).

Los resultados mostraron que las cepas SS1 y Cu-B en el cultivo dual presentaron los mayores porcentajes de inhibición respecto a ambos agentes patógenos. Sin embargo, en el efecto de metabolitos volátiles las cepas SS2 y Cu-B alcanzaron los mejores porcentajes de inhibición con respecto a los hongos fitopatógenos evaluados. Ello indicó que las cepas de *Trichoderma* presentan diferentes mecanismos de acción *in vitro*. Estos resultados evidencian la importancia de realizar estudios previos para la selección de la cepa según su especificidad y mecanismo de acción con la finalidad de garantizar el éxito en la formulación y su posterior aplicación en campo.

Por otro lado, Sanabria y Graboswski (2016) evaluaron el efecto de aislados nativos de *Trichoderma* spp. para el control del patógeno radicular *Rosellinia* sp., en condiciones *in vitro* y *ex vitro*, en el cultivo de macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden y

Betche). En condiciones *in vitro* los aislados nativos de *Trichoderma* spp. obtenidos de diferentes parcelas productoras de macadamia presentaron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento; el grado de sobreposición micelial; y su capacidad de inhibición de crecimiento *in vitro* de *Rosellinia* sp. Los aislados seleccionados de *Trichoderma* spp. que presentaron mayor potencial antagonístico contra *Rosellinia* sp. fueron: GS13, GS18, GS10, GS8, GS4, GS1, GS11, GS6, GS19, GS2, GS15, GS9, GS14, GS12, GS7, GS4 y GS3. La inhibición en el crecimiento *in vitro* para este patógeno se logró en un intervalo de 42,8 a 80,2 %.

### Antibiosis por metabolitos volátiles

El efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. se evidenció en ambas cepas (SS1-6 y SS2-5) con marcadas diferencias respecto al tratamiento control. El mayor porcentaje de inhibición se logró en la cepa SS2-5 (48,3 %) (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Cepas nativas	Área de crecimiento micelial del patógeno (cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	Inhibición (%) <sup>*</sup>
SS1-6	21,41a	45,7
SS2-5	20,36a	48,3
Testigo	39,4b	No aplica

<sup>¶</sup>: cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. <sup>\*</sup> respecto al testigo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, LSD: P>0,05).

Qualhato *et al.* (2013) evaluaron el antagonismo y la producción de enzimas hidrolíticas de cuatro especies de *Trichoderma* contra varios patógenos de plantas entre ellos: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Los resultados mostraron que las especies *T. harzianum* y *T. asperellum* fueron los antagonistas más efectivos contra los patógenos de plantas probados.

Por otra parte, la mayoría de las especies de *Trichoderma* probadas produjeron metabolitos volátiles tóxicos con efectos significativos en la inhibición del crecimiento y desarrollo de los patógenos vegetales mencionados. Arjona-Girona *et al.* (2014) determinaron el efecto de metabolitos de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *R. necatrix*, agente causal de la pudrición de la raíz blanca en el aguacate. Los resultados demostraron que los metabolitos secundarios 6PP (6-pentyl- $\alpha$ -pyrone), cerinolactona (3-hidroxi-5-(6-isopropil-3-metilen-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-2-il) dihidrofuran-2-ona) y T39 butenólido (4-hexa-2,4-dienil-3-(2-oxo-propil)-5H-furan-2-ona) de la cepa *T. atroviride* presentaron elevada efectividad contra *R. necatrix* inhibiendo entre el 25 y 91 % de crecimiento micelial del patógeno.

### Antibiosis por metabolitos difusibles

El efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp. no presentó diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del patógeno en el tratamiento donde se utilizó la cepa SS2-5 (13,4 %) con diferencias marcada respecto a la cepa SS1-6. Por otra parte, no se encontró efecto de los metabolitos difusibles respecto al porcentaje de estimulación en las cepas nativas estudiadas (Cuadro 6).

Las propiedades antagonistas de este hongo se basan en la activación de múltiples mecanismos que también promueven la producción de compuestos y metabolitos específicos que funcionan como factores de crecimiento vegetal, y mejoran su resistencia sistémica frente a las enfermedades en plantas (Hernández-Melchor *et al.* 2019).

### Micoparasitismo

El micoparasitismo del microorganismo antagonista sobre *R. necatrix* se evidenció sólo en la cepa SS1-6.

Cuadro 6.- Efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por las cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Cepas nativas	Área de crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> ) <sup>†</sup>	Inhibición (%) <sup>*</sup>	Estimulación (%)
SS1-6	41,08a	3,54	0
SS2-5	36,89a	13,4	0
Testigo	42.59a	No aplica	No aplica

<sup>†</sup>: cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. <sup>\*</sup> respecto al testigo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, LSD: P>0,05).

El micelio de *T. tomentosum* (cepa SS1-6) se observó enrollando el micelio del patógeno. Igualmente se apreció la lisis celular de *R. necatrix* (Figura 5). Diferentes estudios indican que el proceso del micoparasitismo constituye el principal mecanismo antagonista mostrado por *Trichoderma*. Este inicia cuando el hongo antagonista reconoce al hospedador y se une a las hifas por apresorios. Luego, degrada la pared celular secretando enzimas; en especial la quitinasa y la  $\beta$ -1,3-glucanasas, celulasas, proteasas y fosfatasas (Qualhato *et al.* 2013).

En los ensayos de confrontamiento Peláez-Álvarez *et al.* (2016) mostraron la capacidad de *T. asperellum* (T8a) para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* (ATCCMYA456) en un 91 %. Esto a través de mecanismos micoparasíticos observando un sobrecrecimiento en el hongo fitopatógeno por la cepa T8a, evidenciando la capacidad antagonista como alternativa promisorio de control de origen microbiano contra el agente causal de la antracnosis en el mango (de los Santos-Villalobos *et al.* 2013).

Martínez-Martínez *et al.* (2020), en las cepas T1 y T2 de *T. harzianum* demostraron microscópicamente los mecanismos de micoparasitismo sobre ocho cepas de fitopatógenos. Por lo general se observó enrollamiento, penetración y vacuolización. El comportamiento micoparasítico observado en la cepa SS1-6 ha sido evidenciado para el género *Trichoderma* (estado teleomorfo: Hypocrea). Esta capacidad para micoparasitar mediante la biosíntesis de enzimas líticas se ha utilizado de forma amplia para la protección de plantas contra diversas enfermedades fúngicas (Atanasova *et al.* 2013).

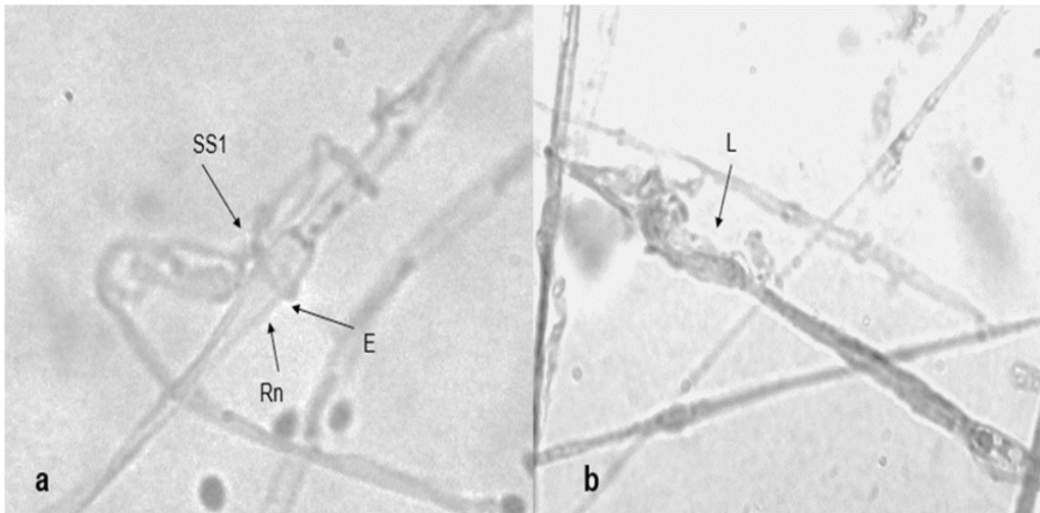


Figura 5. Micoparasitismo de *Trichoderma tomentosum* en el patógeno. (a) Micelio de *T. tomentosum* (SS1-6) enrollando (E) al micelio de *R. necatrix* (Rn). (b) Lisis (L) del micelio de *R. necatrix* (B), 100x.

### CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos cepas nativas *T. tomentosum* (SS1-6) y *T. barbatum* (SS2-5). Los mecanismos de antagonismos evidenciados por ambos antagonistas fueron competencia, antibiosis por metabolitos volátiles y difusibles. El micoparasitismo sólo se observó en la cepa nativa SS1-6. Se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición en la cepa SS1-6.

En ambas cepas se evidenció efecto de los metabolitos volátiles con actividad antifúngica secretados. El efecto de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica secretados por el antagonista se logró mayor porcentaje de inhibición del patógeno con la cepa SS2-5. Ambas cepas mostraron ser promisorias para su utilización en el control de *R. necatrix* en el cultivo de la rosa en la región sur del Estado de México.

### LITERATURA CITADA

- Allori-Stazzonelli, E; Yasem, MG; Ploper, LD. 2014. Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del género *Trichoderma* (en línea). Revista Agronómica del Noroeste Argentino 34(2):197- 199. Consultado 9 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3vLt9DI>
- Alonso, A; López, H; Domínguez, G; García, R. 2018. Actividad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Rosellinia necatrix* y *Verticillium dahlia* (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología 36(3):S27-S28. Consultado 9 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3cTQEBt>
- Arcia, A. 1995. Uso de antagonistas en el control de fitopatógenos del suelo. In Control microbial de insectos plagas y enfermedades en cultivos. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Venezuela. p. 185-204.
- Arjona-Girona, I; Vinale, F; Ruano-Rosa, D; Lorito, M; López-Herrera, C.J. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado White root rot (en línea). European Journal of Plant Pathology 140(2):385-397. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2Olvrm5>
- Askew, DJ; Lang, MD. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species (en línea). Plant Pathology 42(5):686-690. Consultado 22 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3vGyOud>
- Atanasova, L; Le Crom, S; Gruber, S; Couplier, F; Seidl-Seiboth, V; Kubicek, CP; Druzhinina, IS. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism (en línea). BMC Genomics 14:121. Consultado 18 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3cORq2x>

- Barnett, HL; Hunter, BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi (4 ed.). Macmillan Publishing Co. New York, EUA. 218 p.
- Bell, DK; Wells, HD; Markaham, CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens (en línea). *Phytopathology* 72:379-382. Consultado 10 dic. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3lw0TQe>
- COL (Catalogue of Life, Netherlands). 2018. Catalogue of life: 2018 Annual Checklist (en línea). Consultado 18 may. 2019 Disponible en <https://bit.ly/3lzbkN>
- Companioni-González, B; Domínguez-Arismendi, G; García-Velasco, R. 2019. *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura (en línea). *Revista Biotecnología Vegetal* 19(4):237-248. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3cOvCnD>
- de los Santos-Villalobos, S; Guzmán-Ortiz, DA; Gómez-Lim, MA; Délano-Frier, JP; de-Folter, S; Sánchez-García, P; Peña-Cabriales, JJ. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) (en línea). *Biological Control* 64(1):37-44. Consultado 7 nov. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3r2WEgh>
- Dennise, C; Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: I. Production of volatile antibiotics (en línea). *Transaction of the British Mycological Society* 57:25-39. Consultado 22 oct. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3vFEN2q>
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2017. Infostat (en línea, programa informático). Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba. Consultado 10 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3l4HBjN>
- Duarte-Leal, Y; Pozo-Martínez, L; Martínez-Coca, B. 2018. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislados de *Fusarium* spp. (en línea). *Revista de Protección Vegetal* 33(1):1-10. Consultado 9 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2NzkOKJ>
- Gams, W; Bissett, J. 2002. Basic biology, taxonomy and genetics. In Kubicek, C; Harman, G. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1. Taylor & Francis p. 3-31. ISBN 0-7484-0572-0. Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3r9ldHh>
- García C, J; George, A; Argyle, T; Hoopen, M; Krauss, U. 2005. ¿Existe la tolerancia genética del Cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*? (en línea). *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 75:21-31. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/313twL2>
- García-Velasco, R; Domínguez-Arismendi, G; Chavarro-Carrero, EA; Mora-Herrera, ME. 2017. Pathogenicity of *Verticillium dahliae* Klebahn in rootstock rose cv. Manetti (en línea). 2017 APS Annual Meeting, San Antonio, Texas. p.S5-113. Consultado 5 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3sCGiMQ>
- García-Velasco, R; González-Díaz, JG; Domínguez-Arismendi, G; Ayala-Escobar, V; Aguilar-Medel, S. 2012. *Rosellinia necatrix* en *Rosa* sp. y su evaluación a sensibilidad de fungicidas (en línea). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18(1):39-54. Consultado 11 ago. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3rZlGhw>
- Guigón L, C; González G, PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) (en línea). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1):117-124. Consultado 12 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3s3jDJx>
- Guigón-López, C; Guerrero-Prieto, V; Vargas-Albores, F; Carvajal-Millán, E; Ávila-Quezada, GD; Bravo-Luna, L; Ruocco, M; Lanzuise, S; Woo, S; Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos (en línea). *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2):87-96. Consultado 22 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3c28TW9>
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41:95-98.
- Hernández-Melchor, DJ; Ferrera-Cerrato, R; Alarcón, A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para

- producir biomasa y enzimas de interés industrial (en línea). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 35(1):98-112. Consultado 19 oct. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2OWF801>
- Herrera-Jiménez, E; Alarcón, A; John, L; Ferrera-Cerrato, R; Cruz-Izquierdo, S; Ferrera-Rodríguez, MR. 2018. Comparative effects of two indole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan (en línea). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 18(1):188-201. Consultado 11 ago. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3s8NEHE>
- Hicks, E; Bienkowski, B; Braithwaite, M; Mclean, K; Fallon, R; Stewart, A. 2014. *Trichoderma* strains suppress *Rhizoctonia* diseases and promote growth of potato (en línea). *Phytopathologia Mediterranea* 53(3):502-514. Consultado 11 ago. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3rD54ez>
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts (en línea). *Plant Disease* 87(1):4-10. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3s7PAjz>
- Ibarra-Medina, VA; Ferrera-Cerrato, R; Alarcón, A; Lara-Hernández, ME; Valdez-Carrasco, JM. 2010. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* (en línea). *Revista Mexicana de Micología* 31:53-63. Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2PetLk5>
- Martínez, B; Infante, D; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en cultivos (en línea). *Protección vegetal* 28(1):1-11. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3s4d8pE>
- Martínez-Bolaños, M; Nieto-Angel, DA; Teliz-Ortiz, D; Rodríguez-Alcázar, J; Martínez-Damian, MT; Vaquera-Huerta, H; Carrillo M, O. 2008. Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa Duch*) de cultivares mexicanos y estadounidenses (en línea). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2):113-119. Consultado 2 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/317dpfu>
- Martínez-Martínez, TO; Guerrero-Aguilar, BZ; Pecina-Quintero, V; Rivas-Valencia, P; González-Pérez, E; Angeles-Núñez, JG. 2020. *Trichoderma harzianum* antagonism against chickpea fusariosis and its biofertilizing effect (en línea). *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 11(5):1135-1147. Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3r7IFa0>
- Mihuta-Grimm, L; Rowe, C. 1986. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems (en línea). *Phytopathology* 76(3):306-312. Consultado 19 jun. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3lD30Sr>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). 2019. GenBank Resources (en línea, página web). Consultado 9 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3cYtJfF>
- Peláez-Álvarez, A; de los Santos-Villalobos, S; Yépez, EA; Parra-Cota, F; Reyes-Rodríguez, RT. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y Captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (en línea). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(6):1401-1412. Consultado 9 jun. 2019. Disponible en <https://bit.ly/392udZ>
- Pérez-Jiménez, RM. 2006. A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* - The cause of white root rot disease of fruit trees and other plants (en línea). *Journal of Phytopathology* 154(5):257-266. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2P8CPqx>
- Pineda-Insuasti, JA; Benavides-Sotelo, EN; Duarte-Trujillo, AS; Burgos-Rada, CA; Soto-Arroyave, CP; Pineda-Soto, CA; Fierro-Ramos, FJ; Mora-Muñoz, ES; Álvarez-Ramos, SE. 2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión (en línea). *ICIDCA sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 51(1):47-52. Consultado 11 may. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31290ui>
- Qualhato, TF; Lopes, FAC; Steindorff, AS; Brandao, RS; Jesuino, RSA; Ulhoa, CJ. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production (en línea). *Biotechnology letters* 35(9):1461-1468. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3s3ZYTh>

- Ramírez, RM; Urzúa, HMC; Camacho, CA; Tsuzuki, RG; Esquivel, R. 2015. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. Editorial Trillas. México. 375 p.
- Ruiz, RA. 2011. Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* - *Sclerotium rolfsii* (en línea). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, México. 81 p. Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3cVPCVC>
- Samaniego-Fernández, LM; Harouna, M; Corbea, O; Rondón-Castillo, AJ; Placeres-Espinoza, I. 2018. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo (en línea). Revista de Protección Vegetal 33(3):1-11. Consultado 9 nov. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3lAyMPQ>
- Sanabria, A; Graboswski, C. 2016. Control biológico de *Rosellinia* sp. causantes de la muerte súbita de macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp. (en línea). Investigación Agraria 18(2):77-86. Consultado 5 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3s9F1ga>
- Schneider, CA; Rasband, WS; Eliceiri, KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis (en línea). Nature Methods 9:671-675. Consultado 22 oct. 2019 Disponible en <https://doi.org/gcwb4q>
- Schirawski, J; Perlin, MH. 2018. Plant-microbe interaction 2017: The good, the bad and the diverse (en línea). International Journal Molecular Sciences 19(5):1374. Consultado 5 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2Pc8QOD>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México). 2018. Avance de siembra y cosechas resumen por estado (en línea, pág. web). Consultado 11 ago. 2018. Disponible en <https://bit.ly/314S06>
- SIAMI (Sistema de Información Arancelaria Vía Internet, México). 2019. Sistema de información arancelaria vía internet (en línea, pág. web). Consultado 22 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3vMXzFi>
- Stringlis, IA; Zhang, H; Pieterse, CMJ; Bolton, MD; Jonge, R. 2018. Microbial small molecules - weapons of plant subversion (en línea). Natural Product Reports 35:410-433. Consultado 9 may. 2019. Disponible en <https://rsc.li/3f2dmtN>
- Waghunde, RR; Shelake, RM; Sabalpara, AN. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment (en línea). African Journal of Agricultural 11(22):1952-1965. Consultado 22 oct. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3s8ioJ5>
- White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, MA; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ. (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, California, EUA. Academic Press. p. 315-322. Consultado 18 ago. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3c5ScJb>
- Youssef, S; Tartoura, K; Abdelraouf, G. 2016. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani* (en línea). Biological Control 100:79-86. Consultado 9 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3c8h3fO>