

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Identificación de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del estado de Querétaro con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

TESIS INDIVIDUAL

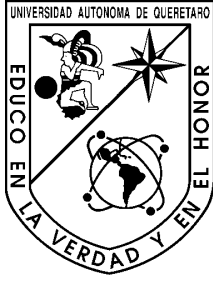
QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
TÍTULO DE

LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA
VÍCTOR JAVIER GARCÍA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR
Dr. EDGARDO ULISES ESQUIVEL NARANJO

C.U SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO, 2016.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Identificación de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del estado de Querétaro con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de
LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

Presenta:

Víctor Javier García Sánchez

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Director

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime
Secretario

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

Firma

Dr. Ramón Pelagio Flores
Suplente

Firma

Querétaro, Qro., a 16 de Enero de 2017.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: Identificación de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del estado de Querétaro con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del alumno Víctor Javier García Sánchez con número de expediente 177312 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

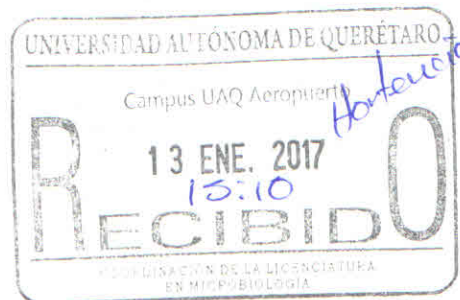
ATENTAMENTE

Esquivel Naranjo Edgardo U.

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

11699

Director



Querétaro, Qro., a 16 de Enero de 2017.

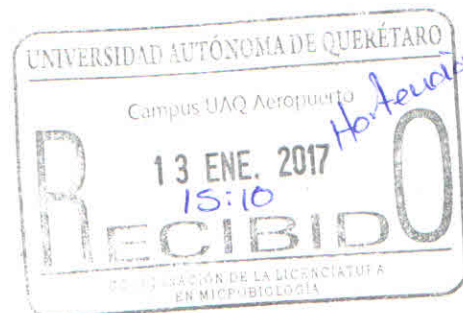
H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
PRESENTE

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: Identificación de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del estado de Querétaro con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del alumno Víctor Javier García Sánchez con número de expediente 177312 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

ATENTAMENTE

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Clave 11695
Asesor.



Querétaro, Qro., a 16 de Enero de 2017.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
PRESENTE

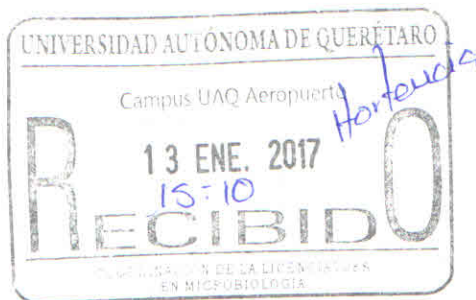
Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: Identificación de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del estado de Querétaro con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del alumno Víctor Javier García Sánchez con número de expediente 177312 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

ATENTAMENTE



Dr. Fidel Landeros Jaime
Clave 5370
Asesor.



Querétaro, Qro., a 16 de Enero de 2017.

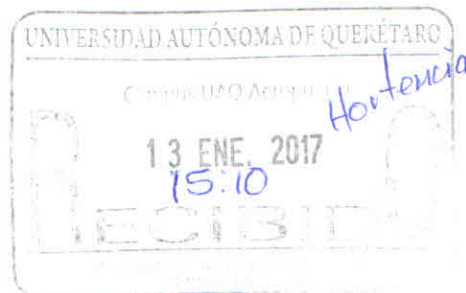
H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: Identificación de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del estado de Querétaro con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del alumno Víctor Javier García Sánchez con número de expediente 177312 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

ATENTAMENTE

Dr. Ramón Pelagio Flores
Investigador Posdoctoral, LANGEBIO, CINVESTAV-Irapuato.
Asesor



ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Resumen.....	1
Abstract.....	2

Índice general

I) Introducción.....	3
I.1) Interacción planta – hongo	3
I.2) Hongos fitopatógenos de importancia agrícola	4
I.3) Biología y epidemiología de <i>Fusarium oxysporum</i>	5
I.4) Desventajas del control químico de fitopatógenos.....	6
I.5) Control biológico	7
I.6) Ventajas y desventajas del control biológico.....	8
I.7) Género <i>Trichoderma</i>	10
I.8) <i>Trichoderma spp.</i> como agente de control biológico	11
I.9) Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i>	12
I.10) <i>Trichoderma spp.</i> contra especies de <i>Fusarium spp.</i>	16
II) Justificación	19
III) Hipótesis.....	20
IV) Objetivos.....	21
IV.1) General	21
IV.2) Específicos.....	21
V) Metodología	22
V.1) Toma de muestra	22
V.2) Aislamiento de hongos	22
V.3) Cepas y condiciones de los cultivos.....	22
V.4) Antibiosis por metabolitos no volátiles (ANV).....	23
V.5) Antibiosis por metabolitos volátiles (AV).	24
V.6) Pruebas de micoparasitismo	25
V.7) Identificación molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas.....	26
V.8) Análisis filogenético	28

V.9) Generación de una colección de cepas de <i>Trichoderma</i>	28
VI) Resultados y discusión	29
VI.1) Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma spp.</i>	29
VI.2) Antibiosis por metabolitos no volátiles (ANV) antibiosis por metabolitos volátiles (AV) y micoparasitismo.	29
VI.3) Identificación de las cepas de <i>Trichoderma spp.</i>	3736
VI.4) Analisis filogenetico de las cepas.....	3837
VII) Conclusión	4342
VIII) Perspectivas	4443
IX) Bibliografía	4544

Índice de figuras

Figura 1: Esquema del ensayo de antibiosis por metabolitos secundarios no volátiles.	24
Figura 2: Esquema del ensayo de antibiosis por metabolitos secundarios volátiles.....	25
Figura 3: Esquema del ensayo de micoparasitismo por cultivo dual.	26
Figura 4: Esquema de la región ITS1-5.8ARNr-ITS2.	27
Figura 5: Mapa del estado de Querétaro y zona de colectas..	29
Figura 6: <i>Micoparasitismo presentado por las cepas de Trichoderma spp. aisladas Vs F. oxysporum.</i>	3432
Figura 7: Electroforesis de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.	3733
Figura 8: Análisis filogenético de las cepas aisladas.....	4237

Índice de tablas

Tabla 1 Resumen de datos de los ensayos de antibiosis y micoparasitismo de las cepas	3331
Tabla 2: Análisis por homología usando la herramienta BLAST-nucleotide.....	3834
Tabla 3: Especies identificadas en este proyecto.....	4136

RESUMEN

Como cualquier industria, la agricultura está expuesta a diversas problemáticas que afectan de manera importante su sostenibilidad. Una de las problemáticas más serias en la industria agrícola es la presencia de organismos fitopatógenos, los cuales pueden repercutir severamente en la economía de los productores y consumidores. El control químico de estos organismos trae consigo una serie de problemas a la salud, afectaciones al ambiente y eventualmente la selección de cepas resistentes a fungicidas. Los hongos del género *Trichoderma* spp. han sido reconocidos como agentes de control biológico de distintos organismos fitopatógenos, entre los que resaltan una gran diversidad de hongos, incluido *Fusarium oxysporum*. A través de distintos mecanismos, *Trichoderma* es capaz de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, disminuyendo la incidencia de estos en cultivos agrícolas. En el presente trabajo se aislaron cepas de *Trichoderma* spp. de distintas regiones del estado de Querétaro. Las cepas aisladas se confrontaron en ensayos de antibiosis y de micoparasitismo contra *Fusarium oxysporum*; así mismo, las cepas aisladas fueron identificadas mediante un análisis filogenético del gen ribosomal ADN_r5.8S. En total se aislaron 51 cepas de *Trichoderma*, de las cuales la gran mayoría tuvo una importante actividad antagónica contra *F. oxysporum*, ya sea a través del micoparasitismo o la secreción de metabolitos secundarios volátiles o no volátiles. La antibiosis por metabolitos volátiles fue más efectiva que la antibiosis por metabolitos no volátiles. Así mismo, fueron identificadas 28 aislados de *Trichoderma* spp., entre los que se encuentran especies de *T. koningiopsis*, *T. gamsii*, *T. atroviride*, *T. tomentosum*, *T. saturnisporium*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, y una cepa cuya especie no pudo ser determinada en su totalidad, aunque se agrupó dentro del cluster *Longibrachiatum*. Estos datos sugieren que algunas cepas aisladas, como la AD3, o una formulación sinérgica entre cepas y/o especies, son capaces de actuar como agentes de control biológico contra *F. oxysporum* y probablemente contra otros hongos fitopatógenos.

(Palabras clave: Agricultura. Control Biológico, *Trichoderma*, *Fusarium oxysporum*, Antibiosis, Micoparasitismo, Filogenia)

ABSTRACT

As any industry, the agriculture is exposed to various problems that affect significantly their sustainability. One of the most serious problems in the agricultural industry is the presence of phytopathogenic organisms, which can severely affect the economy of producers and consumers. Chemical control of these organisms brings with it to health problems, damages to the environment and eventually, selection of resistant fungal strains. Fungi of the genus *Trichoderma* spp. have been recognized as biocontrol agents of various plant pathogenic organisms, including *F. oxysporum*. Through various mechanisms, *Trichoderma* is capable of inhibit the growth of phytopathogenic fungi, reducing its incidence in agricultural crops. In this project, strains of *Trichoderma* spp. were isolated from different regions of the state of Queretaro. The isolated strains were compared in tests of antibiosis and mycoparasitism against *Fusarium oxysporum*; also, strains isolates were identified by a phylogenetic analysis of the ribosomal gene 5.8S DNAr. In total, 51 strains of *Trichoderma* were isolated, of which the majority had an important antagonistic activity against *F. oxysporum*, through either the micoparasitism or secretion of volatile or nonvolatile secondary metabolites. Antibiosis by volatile metabolites was more effective than not volatile metabolites. Also, were identified 28 isolates of *Trichoderma* spp., among which are *T. koningiopsis*, *T. gamsii*, *T. atroviride*, *T. tomentosum*, *T. saturnisporium*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, and a strain which species couldn't be determined, although it was grouped within the cluster *Longibrachiatum*. These data suggest that some isolates, as AD3, or a synergistic formulation between strains and / or species, are capable of acting as biological control agents against *F. oxysporum*, and probably against other phytopathogenic fungi.

(Key words: Agriculture, Biological Control, *Trichoderma*, *Fusarium oxysporum*, Antibiosis, Mycoparaitism, Phylogeny)

I) Introducción

La agricultura representa un antes y un después en la historia de la humanidad, ya que a partir de la adopción de esta actividad fue que las civilizaciones de esa época comenzaron a establecerse en puntos fijos. La agricultura se define como aquella actividad en la que los seres humanos aprovechan los recursos naturales y energéticos de una región determinada, para producir y reproducir materia vegetal con el fin de cubrir las necesidades primarias de la población (Xolocotzi, 1988). En México la industria agrícola ha tenido un papel económico muy importante históricamente en cuanto a una gran relevancia económica, ya que representó hasta el último trimestre del 2015 un 3.1% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional y con tendencias a aumentar durante los próximos meses (INEGI, 2015). Sin embargo como muchos otros rubros del PIB, la agricultura también está expuesta a diversas problemáticas que ponen en riesgo su sustentabilidad, uno de los principales problemas que impactan negativamente la producción agrícola son las enfermedades causadas por organismos fitopatógenos.

I.1) Interacción planta – hongo

La mayoría de las relaciones simbióticas presentes entre plantas y hongos son interacciones específicas que pueden conferir una ventaja o una desventaja para el hospedero (Vyenkoornhuyse *et al.*, 2003; Zhou y Hyde, 2001). Sin importar que la relación sea mutualista, parasítica o comensalista, la historia evolutiva que conservan estos organismos ha conllevado a la selección de mecanismos de infección del hongo, como se ha evidenciado por la presencia de genes fúngicos específicos de virulencia para determinadas plantas (Bonfante y Genre, 2010; Staskawicz, 2001). De manera general, el proceso de infección de una planta por un hongo, inicia con el reconocimiento a distancia entre ambos organismos a través de moléculas mediadoras receptoras del hongo, lo cual conlleva a que se dé el contacto entre planta y fitopatógeno (Gupta *et al.*, 2015; Lo Presti *et al.*, 2015). Después del reconocimiento a distancia entre planta y hongo, éste último rodea las células vegetales para que después se dé la formación de estructuras especializadas de penetración y la síntesis de enzimas hidrolíticas por parte del hongo fitopatógeno, que penetren la pared celular de las células vegetales (Lo Presti

et al., 2015; Mendgen and Hahn, 2002; Knogge, 1998, 1996). Después se requiere que se activen mecanismos por parte del hongo para poder establecerse, colonizar, y mantenerse, lo que involucra la supresión de los sistemas de defensa de la planta (Lo Presti et al., 2015; Knogge, 1998).

De manera natural, las plantas son inmunes o no presentan ningún síntoma de enfermedad a la mayoría de los hongos de vida libre en el suelo (Rep, 2005). Hoy en día se acepta que la diferencia entre las interacciones mutualistas y las interacciones parasíticas, es que los hongos fitopatógenos son capaces de reconocer, evadir y suprimir las respuestas de defensa de las plantas (Lo Presti et al., 2015; Knogge, 1998).

Desde una perspectiva aplicada, el estudio de estas interacciones recae en la capacidad de reconocimiento de moléculas elicitoras, las cuales pueden modular de manera positiva la respuesta inmune vegetal, por lo que la manipulación de estas moléculas son una alternativa al control de fitopatógenos en plantas de importancia agrícola (Dodds y Rathjen, 2010).

I.2) Hongos fitopatógenos de importancia agrícola

La mayoría de las especies de hongos que existen en el planeta son estrictamente saprofitos (Knogge, 1996), es decir, que se nutren a partir de una digestión extracelular e intracelular de residuos orgánicos en descomposición. Sin embargo, cerca de 100,000 especies de hongos son capaces de colonizar material vegetal viva, de los cuales, unos pocos son capaces de provocar una enfermedad (Knogge, 1996).

A pesar de que son relativamente pocos los hongos fitopatógenos, la alta demanda de alimentos por parte de la población de los países industrializados, ha conllevado a la práctica del cultivo y cosecha de grandes hectáreas de granos y hortalizas en un sistema de monocultivo. En este tipo de cultivos, al estar las plantas de una misma especie concentrados en un mismo sitio, incrementa la incidencia por organismos patógenos.

Uno de los problemas en la agricultura es la presencia de hongos fitopatógenos, los cuales pueden tener repercusiones económicas muy severas para los productores. Además de esto, una vez cosechado el producto es muy probable que contenga moléculas trazas de micotoxinas, que impactan de manera severa la salud de los consumidores (Dean *et al.*, 2012).

Entre los fitopatógenos con un impacto mundial y más severo en los cultivos de interés agrícola se encuentran: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia spp.*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum spp.*, *Ustilago maydis*, *Melampsora lini* (Dean *et al.*, 2012), sin embargo también son de interés otras cepas de hongos fitopatógenos que atentan contra la calidad de los alimentos y la salud pública por la producción de micotoxinas y por la severidad de las enfermedades que generan en los humanos a concentraciones muy bajas (Beretta *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 1998; Petzinger y Weidenbach, 2002; Shundo *et al.*, 2006).

1.3) Biología y epidemiología de *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum es un complejo de hongos filamentoso que incluye varias cepas saprofitas y patógenas de plantas de interés agrícola (Groenewald, 2005), y que pertenece al phyla Ascomycota (Michielse & Rep, 2009). Es difícil de discernir entre cepas de *F. oxysporum*, generalmente se caracterizan por la formación de un micelio aéreo abundante con una coloración de entre blanco y púrpura (Ghag *et al.*, 2015; Groenewald, 2005; Ignjatov *et al.*, 2012; Michielse & Rep, 2009), la mayoría es capaz de crecer en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) a una velocidad de entre 4 y 7 mm por día, además de que son capaces de producir tres tipos de estructuras reproductivas asexuales: clamidosporas, micro y macro conidia, todas producidas en hifas ramificadas y no ramificadas (Ghag *et al.*, 2015; Ignjatov *et al.*, 2012, 2012; Szczechura *et al.*, 2013). Este hongo se presenta en suelos agrícolas de una gran variedad de ecosistemas, y es estudiado principalmente por su capacidad de infectar y enfermar diferentes especies de plantas (Ghag *et al.*, 2015; Gordon y Martyn, 1997; Groenewald, 2005; Ignjatov *et al.*, 2012).

Un rasgo que ayuda a distinguir entre cepas de *F. oxysporum* es la capacidad de colonizar potenciales hospederos, ya que existen cepas que son capaces de infectar a un amplio repertorio de plantas, mientras que otras cepas de *F. oxysporum* son patógenas exclusivas de una variedad de plantas en específico (Gordon y Martyn, 1997; Groenewald, 2005). Además de esto, son capaces de ser clasificados dependiendo de la severidad del daño que ocasionan (Groenewald, 2005).

La infección de las plantas por *F. oxysporum* se lleva a cabo en dos fases: una fase determinativa primaria en la que se incluye la penetración de la hifa infectiva dentro de la rizodermis, y su establecimiento y colonización en el córtex y la endodermis, y a partir de ahí al cuerpo vascular de la planta; la fase determinativa secundaria se enfoca en el estudio de las interacciones planta-*F. oxysporum*, en la que se da la colonización y establecimiento del fitopatógeno en los cuerpos vasculares (Rodríguez-Galvez y Mendgen, 1995).

Se sabe que la infección por *F. oxysporum* se manifiesta ligeramente antes o después de la floración; el principal signo que producen las cepas patogénicas de *F. oxysporum* es la marchitez progresiva de partes aéreas de la planta, sin embargo, son capaces de afectar y pudrir la raíz (Perveen y Bokhari, 2012), así como causar defoliación, clorosis y necrosis en las hojas (Jiménez y Granados, 2014; John *et al.*, 2010).

Aunque son capaces de infectar una gran variedad de plantas, la epidemiología de la enfermedad se ha enfocado sobre plantas de interés agrícola, por ejemplo: plátano por *F. oxysporum* f. sp. cubense, tomate por *F. oxysporum* f. sp. lycopersici, melón por *F. oxysporum* f. sp. niveum, algodón por *F. oxysporum* f. sp. vasinfectum, entre otras (Groenewald, 2005).

1.4) Desventajas del control químico de fitopatógenos

Ante esta problemática de los hongos fitopatógenos, la aplicación de fungicidas directamente en distintas zonas de la planta (semilla, hoja, tallo, etc.) parece ser la solución más adaptada por los productores debido a su rapidez y efectividad

(Capote *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015). Los fungicidas más utilizados actualmente son aquellos derivados del benceno, Tiocarbamatos y Bitiocarbamatos, derivados del cobre, Triazoles, y Polioxinas (Lorenz, 2009; Rouabhi, 2010; Sharma *et al.*, 2015).

Los fungicidas, si bien reducen de manera considerable la incidencia de la enfermedad y reducen la dispersión de las esporas, tienen severas consecuencias sobre la salud humana y el ambiente (Sharma *et al.*, 2015). Aparte de su relativa toxicidad y sus potenciales riesgos a la salud humana, algunos fungicidas tienen una importancia ecológica, ya que debido a su aplicación directa, éstos son capaces de afectar a otros hongos capaces de formar micorrizas o involucrados en los ciclos biogeoquímicos. Por ejemplo, Sukarno y colaboradores (1993) demostraron que la acción de algunos fungicidas tenían efecto en la colonización por hifas de hongos micorrízicos en algunas plantas, así como en el crecimiento de estas, aunque en algunos casos no se observaban efectos significativos. Recientemente, Channabasava y colaboradores (2015), también mostro que los fungicidas tienen un efecto negativo sobre el hongo benéfico *Rhizophagus fasciculatus* el cual se sabe qué forma micorrizas con distintas especies de plantas, incluyendo algunas de importancia agrícola (Allen *et al.*, 1982; Gerdemann, 1965; RV y Lakshman, 2014).

Adicionalmente, una desventaja que tiene el uso excesivo e indiscriminado de los fungicidas comerciales, es que favorecen la selección de cepas resistentes a los fungicidas, ya que actúan como una presión de selección en los hongos fitopatógenos que se intentan controlar (Benítez *et al.*, 2004).

1.5) Control biológico

El termino control biológico ha tenido diferentes acepciones a lo largo de la historia (Barrera, 2007), este término define por primera vez en el año de 1919, como la aplicación, introducción o manipulación de organismos enemigos naturales para el control de plagas (Barrera, 2007). Inicialmente el control biológico fue implementado para el control de insectos plagas, pero actualmente, es posible controlar una amplia variedad de agentes etiológicos fitopatógenos, por lo que el termino de control biológico se ha modificado hasta nuestros días.

Eilemberg (2001) define el control biológico como la implementación y uso de organismos vivos para el control de plagas, sin embargo, esta postura excluye el uso de virus, genes y metabolitos para el control de plagas, además de no considerar de manera importante los aspectos ecológicos que implica el control de plagas.

Considerando lo antes mencionado, entonces se puede definir el control biológico como: la introducción o manipulación de organismos enemigos naturales o sus biomoléculas, para reducir los niveles poblacionales de organismos con potencial impacto económico, entre los que se incluyen insectos, nematodos, bacterias, virus y hongos.

I.6) Ventajas y desventajas del control biológico

Desde una perspectiva ecológica el control de la población de organismos evita la pérdida de las funciones de los ecosistemas (Barrera, 2007). La utilización de agentes de control biológico para la protección de cultivos de importancia agrícola es de reciente interés científico, desde hace alrededor de 30 años el control biológico se instauró como disciplina científica y una alternativa a la utilización de químicos sintéticos sobre los sembradíos, así como a los frutos post-cosecha (Barrera, 2007).

Antes de la aplicación de agentes de control biológico se necesita tener evidencia suficiente de que la plaga en cuestión es una amenaza seria; como la implementación del control biológico no es un proceso reversible, por lo que debe ser evaluado y programado con mucho cuidado para evitar algún daño al ecosistema (Barrera, 2007).

Sin embargo, la aplicación de los sistemas de control biológico deben de ser considerados como parte del manejo integral de plagas: en este sistema se emplean métodos físico-químicos, biológicos, genéticos y moleculares para disminuir la población de organismos plaga de importancia económica (Barrera, 2007; Benjamin y Wesseler, 2016).

La nula presencia de daños colaterales, y la ausencia de organismos resistentes a los agentes de control biológico son algunas de las ventajas del control biológico; además de que se considera un sistema de acción a largo plazo, con una relación beneficio/costo positiva, y que fomenta la eliminación de productos químicos nocivos para la salud (Barrera, 2007).

A pesar de las ventajas que pueda representar el control biológico, la mayoría de los productores son reacios a considerarlo como una alternativa contra el combate de las plagas; las principales desventajas que consideran los productores sobre la implementación del control biológico es la obtención de resultados a largo plazo y no a corto plazo como ellos esperan, además de que el mantenimiento de este tipo de sistemas resulta costoso debido a la falta de especialistas en el tema y al poco apoyo económico que recibe por parte de organizaciones gubernamentales (Barrera, 2007).

Medir el éxito de un programa de control biológico es complicado (Hokkanen, 1985). Se puede referir el éxito del control biológico en la relación costo beneficio que obtienen los productores, mientras que en ocasiones otros autores lo adjudican al establecimiento del agente de control biológico y al control de la población de la plaga (Barrera, 2007; Hokkanen, 1985). DeBach (1968) indicó una aproximación que todavía es viable para medir el éxito de un programa de control biológico; clasifica el éxito del programa en tres partes: éxito completo que es cuando un agente de control biológico se establece en una área extensa de un ecosistema y actúa contra sus enemigos naturales al grado de disminuir casi en su totalidad la aplicación de productos químicos; el éxito sustancial es cuyo agente de control biológico se establece y actúa en áreas pequeñas, lo que deja al productor con una ganancia pequeña además de aplicar productos químicos de manera ocasional; por último el éxito parcial se refiere a aquel en el que el agente de control biológico se establece en una pequeña zona, por lo que sigue siendo necesaria la aplicación continua de productos químicos.

Generalmente el fracaso de un sistema de control biológico radica en la mala valoración del problema y en la inapropiada incorporación dentro del manejo integral

de plagas, así como en la mala planeación y diseño. Se considera que un programa de control biológico ha fracasado cuando el organismo antagónico no se establece en la región o ataca a las especies no blanco (Barrera, 2007). Sin embargo, como indica Funasaki y col. (1988), el fracaso de estos programas radica en la pobre valoración de los enemigos naturales en la región antes de su introducción.

1.7) Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* corresponde a un grupo de hongos filamentosos que se encuentra dentro del grupo de los Ascomycetos (Chaverri *et al.*, 2003; Jaklitsch *et al.*, 2014); se considera un género cosmopolita, ya que ese encuentra presente en la gran mayoría de ecosistemas del mundo, lo que conlleva a una alta diversidad de éste género (Cai *et al.*, 2015; John *et al.*, 2010; Samuels, 1996). *Trichoderma* se encuentra presente en todo tipo de suelos, incluyendo aquellos de uso agrícola; sin embargo no se restringe su presencia como un organismo endófito. El género *Trichoderma* se considera como un grupo anamorfo, es decir, que tienen un ciclo de vida asexual, sin embargo algunas especies están vinculadas genéticamente con el género *Hypocrea* que es su estado teleomorfo –con un ciclo de vida sexual- (Samuels, 1996).

El género *Trichoderma* se caracteriza por presentar conidióforos hialinos y conidios unicelulares en el extremo de las fialides de coloración que abarca el espectro amarillo y verde (Harman *et al.*, 2004; Samuels, 1996). Se considera un hongo de rápido crecimiento, ya que su micelio empieza a ser visible después de 8 horas de incubación en medio PDA a 27°C; el micelio de este hongo presenta septos simples y una coloración blanquecina (Samuels, 1996).

Por lo general las cepas de *Trichoderma* están establecidas en la rizosfera de una gran cantidad de plantas; la simbiosis existente entre las células vegetales y las células de *Trichoderma* acarrea beneficios a la planta como la resistencia a estrés osmótico, estrés hídrico, potenciador de la inmunidad vegetal, así como protección contra hongos fitopatógenos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012). Acerca del origen de esta simbiosis se ha propuesto que la presencia de hongos presa y la disponibilidad de nutrientes provenientes de la raíz

han actuado como atrayentes de los ancestros de *Trichoderma*, lo que permitió el establecimiento de este grupo de hongos en la rizosfera de las plantas y a la vez, la evolución de estrategias colaborativas con las células vegetales (Druzhinina *et al.*, 2011; López-Bucio *et al.*, 2015).

Desde una perspectiva genética, estos hongos son haploides (Goldman *et al.*, 2002); *Trichoderma* tiene como estado sexual a los hongos del género *Hypocrea*, sin embargo no a todas las especies descritas se les ha identificado un teleomorfo conocido (Gams & Bissett, 2002); por lo general las cepas presentes en suelo son heterocarióticas, además de poseer una gran diversidad genética intraespecie, lo que incrementa su interés y uso comercial (Harman *et al.*, 2002, 2004).

La gran mayoría de las especies de *Trichoderma* se consideran como especies competidoras agresivas de la rizosfera así como simbiontes oportunistas avirulentos de plantas (Harman *et al.*, 2004), inhibiendo la proliferación de otro tipo de hongos en su nicho ecológico a través de la secreción de metabolitos y enzimas (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Reino *et al.*, 2007); esta característica ha llamado el interés de la comunidad científica, a tal grado de considerarlo un organismo modelo para distintas áreas de investigación, como lo es la genética, control biológico, enzimología, genómica funcional, entre otras.

1.8) *Trichoderma spp.* como agente de control biológico

Una alternativa al uso de agentes químicos, es el uso de agentes de control biológico antagonistas para controlar las poblaciones de hongos fitopatógenos. Originalmente, el control biológico es definido como el uso intencional de organismos antagónicos naturales para el control poblacional de organismos plaga con importancia económica (Rodríguez del Bosque y Arredondo Bernal, 2007).

Uno de los agentes de control biológico más utilizado contra los hongos fitopatógenos son hongos antagonistas del género *Trichoderma*, principalmente *Trichoderma viride*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma harzianum* (Benítez *et al.*, 2004).

Trichoderma provee muchas ventajas para ser utilizado como agente de control biológico, como es la capacidad de modificar el microambiente de la rizosfera, promover el crecimiento vegetal, así como la síntesis de moléculas del sistema inmune de las plantas, su alta capacidad reproductiva, su plasticidad para adaptarse a múltiples ambientes, eficiencia en el uso de nutrientes, la existencia de una amplia información genética y genómica, así como un metabolismo secundario versátil capaz de secretar moléculas antagónicas contra fitopatógenos (Benítez *et al.*, 2004; Munir *et al.*, 2013).

Además, como una de las principales presentaciones en las cuales se pueden aplicar las formulaciones para el control biológico de plagas, es la aplicación de soluciones de esporas directamente sobre las plantas (Knudsen *et al.*, 1991), es necesario que el agente de control biológico sea capaz de producir una gran cantidad de esporas. *Trichoderma* es un hongo del que ya se ha descrito su abundante esporulación en condiciones de laboratorio (Said, 2009), por lo que su uso como agente de control biológico se considera como un método barato para inhibir el desarrollo de especies de fitopatógenos (Rajput & Shahzad, 2015). Bajo condiciones de laboratorio, *Trichoderma* es capaz de producir una abundante esporulación, aunque para eficientizar su producción, se han probado diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, por ejemplo, Jayaswal y col. (2003), reporto que la esporulación de *Trichoderma* aumenta al crecer el hongo en medio mínimo suplementado con peptona, sacarosa o trehalosa.

En general el control biológico por las cepas de *Trichoderma* se basa en el sinergismo de estrategias que emplea para inhibir y controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos, de manera general existen cinco mecanismos principales por los que *Trichoderma* actúa: a través de la estimulación de secreción de moléculas de defensa por la planta, competencia por nutrientes y espacio, fungistasis, antibiosis y micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004).

I.9) Mecanismos de acción de *Trichoderma*

La inhibición de la proliferación de organismos fitopatógenos se lleva a cabo a través de múltiples estrategias, como lo es por metabolitos secundarios volátiles,

metabolitos secundarios no volátiles, micoparasitismo, inducción de resistencia sistémica en la planta, entre otras (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Munir *et al.*, 2013).

Trichoderma se considera un buen agente de control biológico por competencia: mediante fungistasis, *Trichoderma* es capaz de sobrevivir y contraponerse a condiciones ambientales extremas provocadas por la liberación y presencia de moléculas fungitóxicas al medio por parte de las plantas, además de ello, múltiples cepas son naturalmente resistentes a moléculas tóxicas comercializadas para el control de malezas, insectos y hongos (Chet *et al.*, 1997).

Trichoderma también es capaz de competir por nutrientes con otros hongos del suelo (Benítez *et al.*, 2004): esto lo hacen a través de la liberación de altas concentraciones sideróforos, que son agentes quelantes de moléculas de hierro de bajo peso molecular, el cual es un elemento esencial para la viabilidad de hongos filamentosos (Benítez *et al.*, 2004; Chet y Inbar, 1994; Eisendle *et al.*, 2004); de esta manera al liberar los sideróforos incrementa la captura y toma de nutrientes y la tasa de crecimiento de *Trichoderma*, así como inhibir el crecimiento de otros hongos fitopatógenos. Esta característica de *Trichoderma* ha permitido controlar fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Pythium sp.* y *Botrytis cinérea* (Anke *et al.*, 1991; Bogumił *et al.*, 2013; Chakraborty y Chatterjee, 2008; Segarra *et al.*, 2010; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013; Vinale *et al.*, 2014). Además de que es un hongo con una velocidad de crecimiento superior a la de muchos hongos fitopatógenos, ya que por competencia por nutrientes o espacio, *Trichoderma* es capaz de inhibir el desarrollo de otros hongos, al no permitirle al fitopatógeno desarrollarse adecuadamente, por ejemplo, Singh y col. (Singh *et al.*, 2013) indican la ventaja del crecimiento acelerado en comparación con otros fitopatógenos, así como la importancia del pH en el comportamiento antagonista de *Trichoderma*.

Como se mencionó previamente, *Trichoderma* se considera como un simbiote oportunístico avirulento de plantas, capaces de colonizar raíces de las plantas similar a como lo hacen los hongos micorrízicos (Harman *et al.*, 2004). Mediante

esta colonización y penetración en las células del sistema radicular de las plantas, *Trichoderma* produce moléculas que estimulan el crecimiento general de la planta, además de la inducción de la producción de moléculas con la capacidad de activar los sistema de defensa de las plantas (Allen *et al.*, 1982; Benítez *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2015; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Hermosa *et al.*, 2012; López-Bucio *et al.*, 2015).

También, a través de la colonización de las raíces de las plantas, *Trichoderma* es capaz de inhibir el desarrollo de otros organismos, ya que invade la epidermis de las plantas, lo que induce la liberación de moléculas de defensas de manera localizada y sistémica por parte de las plantas con actividad fungicida (Harman *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2015). Ejemplo de estas moléculas son fitoalexinas, flavonoides, terpenoides, compuestos fenólicos y otros compuestos antimicrobianos (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004). Determinadas cepas de *Trichoderma* son resistentes a estas moléculas a diferencia de otros hongos fitopatógenos, por lo que las cepas de *Trichoderma* son más efectivas para la colonización y establecimiento en las raíces de las plantas (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004).

Además del efecto promotor de *Trichoderma* sobre el crecimiento de las plantas, mediado por la biofertilización y producción de fitohormonas, también puede inducir resistencia a diferentes estreses abióticos (Benítez *et al.*, 2004; Brotman *et al.*, 2013; Colla *et al.*, 2015; Guler *et al.*, 2016); sin embargo una de las ventajas para la planta de la presencia de *Trichoderma* en las raíces, es el efecto protector contra fitopatógenos como virus, bacterias y hongos, a través de la estimulación de los mecanismos de defensa, induciendo respuestas de hipersensibilidad, resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004). Un ejemplo de la inducción de la respuestas de hipersensibilidad y de resistencia sistémica adquirida es la acumulación de la enzima Fenil-Alanina Amonio-Liasa (PAL) y la Chalcona Sintasa, las cuales son promotoras de la biosíntesis de fitoalexinas, quitinasas, glucanasas, proteínas relacionadas a

patogénesis y enzimas involucradas en estrés osmótico y oxidativo (Chyra *et al.*, 2007; Karthikeyan *et al.*, 2006; Neuenschwyer *et al.*, 1995; Yedidia *et al.*, 2003).

A pesar de lo anterior, estudios han demostrado que no hace falta la presencia directa de las cepas de *Trichoderma* sobre las raíces de las plantas, ya que los genes involucrados en los sistemas de defensa de las plantas son activados por metabolitos de *Trichoderma* llamados elicitores (Benítez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2015), indicando que las cepas de *Trichoderma* son una fuente importante de elicitores con potencial aplicación en los programas de protección de cultivos. La presencia de estos elicitores puede inducir la biosíntesis de fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogénesis, ácido jasmónico, ácido salicílico etc., y de esa manera inducir la resistencia a fitopatógenos y a distintos tipos de estrés abiótico (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; de las Mercedes Dana *et al.*, 2001; Ming *et al.*, 2013; Reino *et al.*, 2007).

También, se ha demostrado que cepas de *Trichoderma* son capaces de modificar el pH del suelo en donde se desarrollan, acidificándolo y adaptándolo a las condiciones ideales para su desarrollo, lo que a su vez reduce la virulencia de otros fitopatógenos presentes en el suelo, ya que algunos factores de virulencia no son sintetizados en ambientes con pH ácido (Arst y Peñalva, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Caracuel *et al.*, 2003; Drori *et al.*, 2003; Prusky y Yakoby, 2003).

Las reacciones de antibiosis ocurren cuando moléculas difusibles de bajo peso molecular de *Trichoderma* entran en contacto con organismos fitopatógenos, inhibiendo su desarrollo (Benítez *et al.*, 2004). Los metabolitos que se han caracterizado a estas reacciones de antibiosis son el ácido harziánico, alamecicinas, tricolinas, peptabioles, 6-pentil- α -pirona, lactonas, viridinas, glioviridinas, gliotóxicas, entre otras (Benítez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2015; Reino *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2014). Estas moléculas antibióticas han demostrado efectividad en el control de plagas de fitopatógenos al purificarlas y aplicarlas directamente en cultivos, por lo que es capaz de inhibir a los organismos fitopatógenos sin la necesidad de contar con *Trichoderma* en el suelo (Benítez *et al.*, 2004). Además de la producción de las moléculas antibióticas mencionadas anteriormente, el efecto

de antibiosis se incrementa al combinarse con enzimas hidrolíticas, lo que aumenta el antagonismo contra hongos fitopatógenos (Di Pietro *et al.*, 1993; Howell, 2003; Lorito *et al.*, 1996; Schirmböck *et al.*, 1994).

El micoparasitismo involucra una relación antagónica directa entre las cepas de *Trichoderma spp.* contra otros hongos, muchos de ellos fitopatógenos (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004). Esta relación compleja involucra una serie de eventos secuenciales como lo son el reconocimiento a distancia entre las hifas de los hongos, después un contacto directo entre las hifas y un posterior ataque y penetración de las hifas de *Trichoderma* en las hifas del hongo hospedero hasta su posterior muerte (Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008). Se considera que un paso importante durante el reconocimiento a distancia, inicia cuando las hifas de *Trichoderma* secretan quitinasas, glucanasas y proteasas; cuando estas enzimas inician la hidrólisis de los componentes de la pared celular del hongo hospedero se liberan oligómeros que inician el proceso de micoparasitismo (Chet *et al.*, 1997; Vinale *et al.*, 2008). Después del reconocimiento a distancia, las hifas de *Trichoderma* experimentan quimiotropismo, creciendo en dirección al fitopatógeno y se unen a la pared celular del hospedero mediante la acción de lectinas. Una vez que se une, las hifas rodean la hifa del hongo hospedero y se da la formación del apresorio, a partir del cual empiezan a secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y peptaiboles (Howell, 2003); y que en conjunto permite a *Trichoderma* ingresar y empieza a parasitar internamente a las hifas del hongo hospedero, asimilando su contenido intracelular rico en nutrientes (Benítez *et al.*, 2004).

I.10) *Trichoderma spp.* contra especies de *Fusarium spp.*

Como organismo de vida libre en el suelo, *F. oxysporum* es de interés científico en la actualidad ya que se considera como un patógeno emergente, con la capacidad de causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Boutati y Anaissie, 1997; Nucci y Anaissie, 2007), sin embargo el principal motivo por el que se estudia es su fitopatogenicidad. Entre los métodos de control de *F. oxysporum* están

aquellos basados en las características micoparásitas de *Trichoderma* (Nucci y Anaissie, 2007; Reino *et al.*, 2007; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013).

Trichoderma es un hongo utilizado como agente de biocontrol, a partir del cual se han desarrollado distintas formulaciones comerciales con la finalidad de erradicar ciertos patógenos, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsi*, *Pythium arrhenomanes*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *F. oxysporum* (Benítez *et al.*, 2004; John *et al.*, 2010; Reino *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2014).

Distintas cepas de *Trichoderma* son evaluadas en ensayos *in vitro* e *in vivo* para conocer sus capacidades antagónicas y su actividad como biofungicida, sin embargo solo algunas pueden ser consideradas como agentes de control biológico contra *F. oxysporum* (Chakraborty y Chatterjee, 2008; Chen *et al.*, 2016; Ghag *et al.*, 2015; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013).

Entre las principales especies de *Trichoderma* aisladas y/o aplicadas como agentes de control biológico son: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma polysporum* (Ahluwalia *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2015; Dubey *et al.*, 2011; Innocenti *et al.*, 2015; John *et al.*, 2010; Keswani *et al.*, 2014; Reino *et al.*, 2007; Segarra *et al.*, 2010; S Nosir, 2016; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013; Vinale *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014a).

Ensayos *in vitro* de la actividad antagónica de aislados de *Trichoderma* sobre fitovarietades de *F. oxysporum* indican que los metabolitos secundarios y las enzimas producidas por *Trichoderma* juegan un papel importante en la regulación del crecimiento de *F. oxysporum*, por lo que se ha planteado la aplicación de extractos purificados de *Trichoderma*, junto con la aplicación de enzimas líticas para inhibir su desarrollo (Reino *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2014). Algunos de los metabolitos secundarios de *Trichoderma*, caracterizados con actividad anti *F. oxysporum* son: Trichodermol, koningioninas y 6-pentil- α -pirona, de este último se sabe que puede inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* hasta un 31% en dos días (Reino *et al.*, 2007).

Respecto a ensayos *in vivo*, se sabe que cepas de *Trichoderma viride* pueden actuar como bioestimulantes en plantas de soya e inhibir el desarrollo de *F. oxysporum*, aumentando la productividad de un cultivo por hectárea (John *et al.*, 2010). Un resultado similar se obtiene con otras cepas de *Trichoderma* en plantas de frijol, reduciendo la incidencia de *F. oxysporum* (Hernández-Mendoza *et al.*, 2011; Otadoh *et al.*, 2011), lo que evidencia la importancia de aplicar cepas de *Trichoderma* como una estrategia de control biológico, dentro del marco del manejo integral de plagas.

II) Justificación

Debido a la excesiva aplicación de fungicidas químicos, potencialmente nocivos para la salud, que se emplean en las zonas agrícolas del estado de Querétaro, es importante seleccionar y caracterizar cepas de *Trichoderma* como potenciales agentes de control biológico contra *Fusarium oxysporum* que representen una alternativa al uso de los fungicidas químicos.

III) Hipótesis

Existen cepas nativas de *Trichoderma* en el estado de Querétaro que son capaces de micoparasitar y/o afectar el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* por contacto y/o a través de la secreción de moléculas antibióticas.

IV) Objetivos

IV.1) General

Formar una colección de cepas de *Trichoderma spp.*, nativas del Estado de Querétaro que sean capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* para su posterior uso como posibles agentes de control biológico.

IV.2) Específicos

- 1) Aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma spp.* asociadas a suelo y rizosfera de plantas
- 2) Identificar mediante herramientas de biología molecular las cepas aisladas de *Trichoderma spp.*
- 3) Realizar bioensayos *in vitro* para determinar la capacidad antagónica y micoparasítica de los aislados de *Trichoderma spp.* contra *F. oxysporum*.

V) Metodología

V.1) Toma de muestra

Se colectaron muestras de aproximadamente 100g de suelo asociado a la rizosfera de distintas plantas de cultivos agrícolas dentro del estado de Querétaro, México, excavando a una profundidad de entre 5-10 cm. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico selladas herméticamente y fueron transportadas en condiciones de oscuridad al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, Campus Aeropuerto, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro para el aislamiento de hongos del género *Trichoderma*.

V.2) Aislamiento de hongos

Para el aislamiento de los hongos de interés en este estudio, se utilizó el método de diluciones en serie con base 10 y cultivo por dispersión en placa. Para esto, las muestras que se colectaron se homogenizaron y, posteriormente, se tomaron 10g de suelo que fueron disueltos en 90 ml de agua destilada estéril, luego de esta dilución se hicieron diluciones seriadas con base 10 hasta llegar a una dilución 10^{-4} . De la dilución 10^{-3} y 10^{-4} se tomaron 100 μ l de la mezcla que se colocaron sobre placas de PDA suplementado con Tritón X-100 al 0.5% y cloranfenicol 34 μ g/ml y se cultivaron por el método de dispersión. Las cajas se incubaron como se describió anteriormente por 10 días. Las colonias de *Trichoderma* se identificaron mediante las características macroscópicas propias de este género y posteriormente se obtuvieron cultivos axénicos realizando un cultivo monospórico en medio de cultivo PDA con Tritón X-100 al 0.5%. Los cultivos axénicos se incubaron en iluminación constante a 28°C por 7 días para obtener abundante conidiación de los aislados de *Trichoderma* y los conidios se colectaron haciendo una suspensión en agua por fricción con un asa metálica esterilizada con flama.

V.3) Cepas y condiciones de los cultivos

Todos los cultivos se realizaron dentro de una campana de flujo laminar. Las cepas de *Trichoderma spp.*, se propagaron en placas Petri con medio de cultivo PDA, e

incubadas en iluminación constante a 28°C. El tiempo de incubación varió y dependió de la velocidad de crecimiento radial de cada aislado.

Para realizar los ensayos de antibiosis y micoparasitismo, se utilizó una cepa de *F. oxysporum*, que previamente se caracterizó como un agente causal de la roña del aguacate (Pérez Reséndiz, 2015). Este fitopatógeno fue propagado durante todo el experimento, inoculando un disco de micelio de 5 mm en medio de cultivo PDA bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para las cepas de *Trichoderma*.

V.4) Antibiosis por metabolitos no volátiles (ANV)

Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, se prepararon cajas Petri con medio PDA cubiertas con discos de papel celofán estéril de 9 cm de diámetro (Figura 1). Sobre el papel celofán se colocaron discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada uno de los aislados de *Trichoderma spp.* Los cultivos se incubaron por 48 horas, hasta la formación de una colonia de 6 cm de diámetro aproximadamente. Después de este tiempo, se retiró el papel celofán junto con el micelio de la cepa de *Trichoderma* para posteriormente colocar en el centro de la caja Petri un disco de micelio de 5 mm de diámetro de *F. oxysporum*. Posteriormente, los cultivos del fitopatógeno se incubaron bajo las mismas condiciones descritas previamente.

Para los ensayos control, se siguieron las mismas condiciones de los experimentos, con la diferencia de que en la caja Petri con celofán, no se inoculó cepa alguna de *Trichoderma*. Posteriormente se retiró el papel celofán y se inoculó el disco de micelio de *F. oxysporum* como se describió anteriormente. Se evaluó el diámetro del micelio de las colonias del fitopatógeno justo cuando el ensayo control alcanzó el borde de la caja. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento, se tomaron fotografías de cada colonia y se analizaron con el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left\{ \left[\frac{(D_2) (100)}{D_1} \right] \right\}$$

Donde D_1 es el diámetro de la colonia del ensayo control sin tratamiento y D_2 es el diámetro de la colonia del ensayo con tratamiento de los antibióticos de *Trichoderma*.

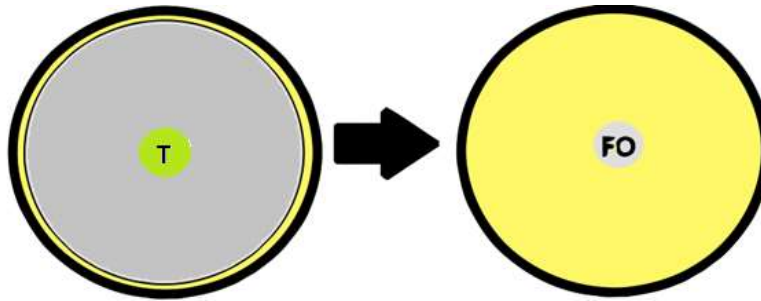


Figura 1: Esquema del ensayo de antibiosis por metabolitos secundarios no volátiles. El círculo gris representa el papel celofán que posterior a 48h se retira junto al micelio de *Trichoderma*. T, representa *Trichoderma* y FO, representa *F. oxysporum*.

V.5) Antibiosis por metabolitos volátiles (AV).

Para determinar la inhibición de crecimiento por metabolitos volátiles de las cepas de *Trichoderma*, primero se inocularon las cepas de *Trichoderma* en placas de medio de cultivo PDA y *F. oxysporum* en otra para generar preinoculos. Posteriormente, en una caja petri se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro del preinoculo de *Trichoderma* a evaluar y en la otra caja Petri se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro del preinoculo del fitopatógeno (Figura 2). Las cajas de los cultivos se sellaron una sobre otra con plástico auto adherible, de manera que los inóculos queden encontrados y exista una interacción indirecta entre los hongos (Figura 2). Para los controles, se utilizó el mismo procedimiento con la diferencia de que en ambas cajas Petri se colocaron los discos de micelio de *F. oxysporum*. Las cajas se incubaron a 28°C con iluminación constante hasta que las colonias control llegaron a la orilla de la caja Petri. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

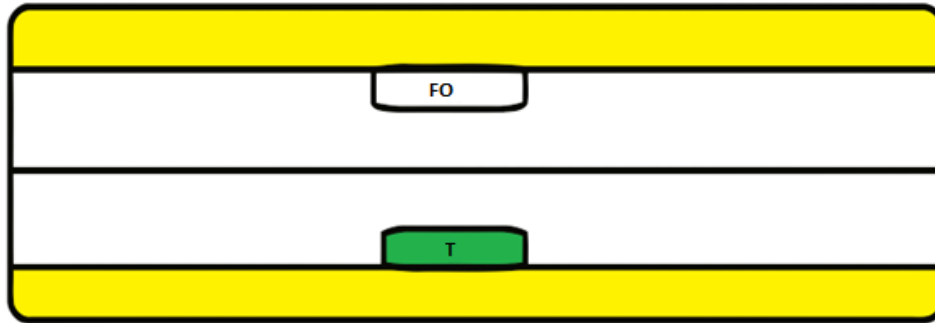


Figura 2: Esquema del ensayo de antibiosis por metabolitos secundarios volátiles. T, representa *Trichoderma* y FO, representa *F. oxysporum*

V.6) Pruebas de micoparasitismo

Para determinar el comportamiento micoparasítico de las cepas de *Trichoderma*, se realizó un co-cultivo en una misma placa con medio PDA (Figura 3): primero se colocó un disco de micelio del fitopatógeno, 1.5 cm de distancia de la orilla de la caja Petri, 3 días antes de inocular en la misma placa una cepa de *Trichoderma*, debido a que *F. oxysporum* es un hongo con un crecimiento más lento, por lo que inocularlo antes permite que el micelio del patógeno llegue al mismo tiempo al centro de la placa que la cepa de *Trichoderma*. Posterior a los 3 días, se colocó un disco de micelio de la cepa de *Trichoderma sp.* a evaluar del lado opuesto en la misma caja Petri (Figura 3). Los co-cultivos se incubaron a 28°C con iluminación constante por dos semanas. La capacidad micoparasítica se determinó mediante la capacidad de sobrecrecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre las colonias de *F. oxysporum*, según la escala de Bell y col. (1982), que indica que una cepa clase 1 es aquella en la que *Trichoderma* es capaz de sobrecrecer por completo al fitopatógeno, clase 2 si *Trichoderma* sobrecrece al menos 2/3 partes del fitopatógeno, clase 3 si no hay antagonismo entre las dos cepas, clase 4 si el fitopatógeno sobrecrece al menos 2/3 de *Trichoderma* y clase 5 en la que el fitopatógeno sobrecrece totalmente al *Trichoderma*. Los experimentos se analizaron cada semana.

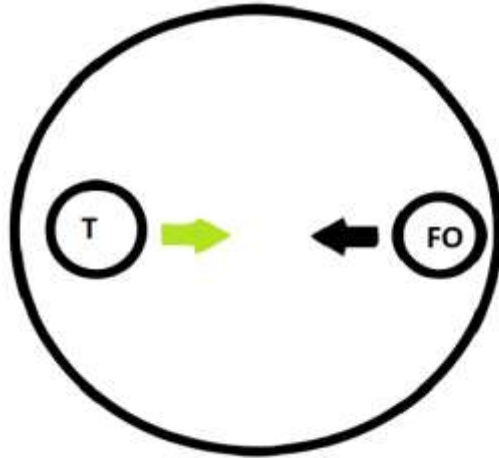


Figura 3: Esquema del ensayo de micoparasitismo por cultivo dual. La cepa del fitopatógeno se inoculó tres días antes de la inoculación de la cepa de *Trichoderma*. T, representa *Trichoderma* y FO, representa *F. oxysporum*

V.7) Identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* aisladas

La extracción de ADN genómico nuclear de las cepas de *Trichoderma*, se realizó con base en los protocolos propuestos por Prabha y col. (2012) y Raeder y Broda (1985) con algunas modificaciones: Placas de PDA cubiertas con celofán se inocularon con 2 microlitros de esporas y se incubaron a 28°C en completa oscuridad hasta que la colonia cubrió la superficie de la placa. El micelio se colectó con una espátula directamente del celofán, se envolvió en papel aluminio y se congeló en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta el procesamiento de las muestras. Para la extracción de los ácidos nucleicos, el micelio se pulverizó en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido hasta que se formó un polvo blanco muy fino, el cual se colocó en un tubo de plástico de 1.5 ml. El micelio en el tubo eppendorf se trató por 5 minutos en 600µl de buffer de urea en agitación en un vortex y posteriormente se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la reacción se centrifugó por 1 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril al que se le aplicó un lavado con un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, el tubo se centrifugó por 2 minutos; el lavado se repitió dos veces más. El sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo eppendorf y se le agregó 300µl de isopropanol al que se le agitó suavemente hasta observar hebras blancas. El tubo se centrifugó por 5 minutos al que después se le

descartó el sobrenadante. La pastilla de ácidos nucleicos se lavó con etanol frío al 70% y se dejó secar por 15 minutos. La pastilla se disolvió y se almacenó en 100µl de buffer TE a -20°C hasta su posterior uso. Las centrifugaciones hechas durante los ensayos se realizaron a 10,000 rpm. La calidad del ADN genómico se analizó mediante espectrofotometría en un nanodrop y una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 400 mA. La presencia del ADN se visualizó en un fotodocumentador.

Las muestras de ADN genómico obtenidas, se diluyeron a una concentración de 100 ng/µl, cantidad usada para realizar las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de PCR se realizaron bajo las indicaciones del proveedor de la enzima DreamTaq DNA polimerase Thermo Scientific®. Los oligonucleótidos que se utilizaron para estas reacciones son: ITS1 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) que amplifican aproximadamente 600 pb de los ITS1 e ITS2, incluyendo el gen ribosomal 5.8S (Figura 4). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25µl a las siguientes condiciones: se realizó un paso inicial de 3 min a 95°C y subsecuentes 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C, 1 min a 72°C, y un paso final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

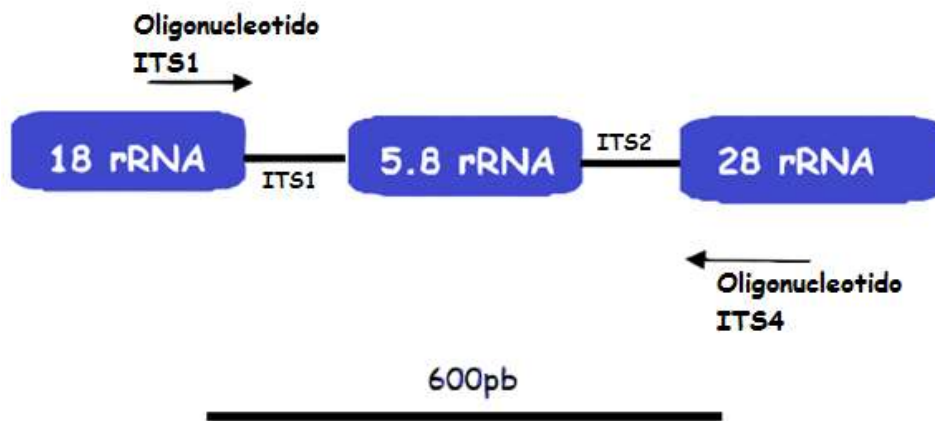


Figura 4: Esquema de la región ITS1-5.8ARNr-ITS2. Región génica amplificada por los cebadores ITS1 e ITS4, así como el tamaño del amplicón esperado

Los amplicones resultantes se purificaron por columnas QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), según las indicaciones del proveedor. Después de la purificación de las muestras, estas se mandaron a secuenciar en el del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

V.8) Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se editaron con el software Chromas, a modo de eliminar los extremos de las secuencias, para después exportar las secuencias en formato Fasta. Las secuencias se compararon contra secuencias obtenidas de la base de datos GenBank, reportadas previamente por Kulling-Gradinger y col. (2002); para ello se realizó una matriz en el software MacClade y así alinear las secuencias y posteriormente agruparlas en clusters de secuencias. La Matriz posteriormente fue analizada para determinar la filogenia de las especies utilizando los software RaxML, Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist y Huelsenbeck, 2003) y TNT (Goloboff *et al.*, 2008), que ocupan los métodos de máxima verosimilitud, estadística bayesiana y máxima parsimonia respectivamente. Los arboles filogenéticos generados se analizaron con el software Dendroscope (Huson y Scornavacca, 2012) y posteriormente fueron editados realizando un árbol filogenético consenso.

V.9) Generación de una colección de cepas de *Trichoderma*

Las cepas aisladas de *Trichoderma spp.* se propagaron en placas petri de 60x15mm con medio de cultivo PDA por una semana, las cuales posteriormente se utilizaron para obtener una suspensión de esporas. Las esporas se colectaron por arrastre con agua destilada estéril, que se congelaron a -20°C en glicerol al 25% para formar la colección.

V.10) Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos de antibiosis se analizaron con el software JMP 13.0. Se hizo una comparación entre las medias de los tratamientos AV y ANV por un análisis t-student. Se evaluó la normalidad de los datos con una prueba de bondad de ajuste y un análisis de varianza para observar diferencias entre los tratamientos (distintas cepas de *Trichoderma* aisladas).

VI) Resultados y discusión

VI.1) Aislamiento de cepas de *Trichoderma spp.*

Se realizaron 26 colectas de suelo en distintas regiones del estado de Querétaro y en una gran variedad de ecosistemas que abarcaban del clima semiárido a zonas boscosas (Figura 5). Con las muestras de suelo/rizosfera y después de los pasos monospóricos se obtuvieron en total 54 cepas de *Trichoderma spp.*, las cuales se seleccionaron con base en sus características morfológicas en medio PDA, como son, su típica esporulación verde, un crecimiento rápido e invasivo y en algunos casos el aroma a coco (piranos) secretados por algunas cepas de *Trichoderma*. Las cepas de *Trichoderma spp.* obtenidas se utilizaron para los ensayos de antibiosis por metabolitos no volátiles, antibiosis por metabolitos volátiles, micoparasitismo y para realizar su posterior identificación molecular.

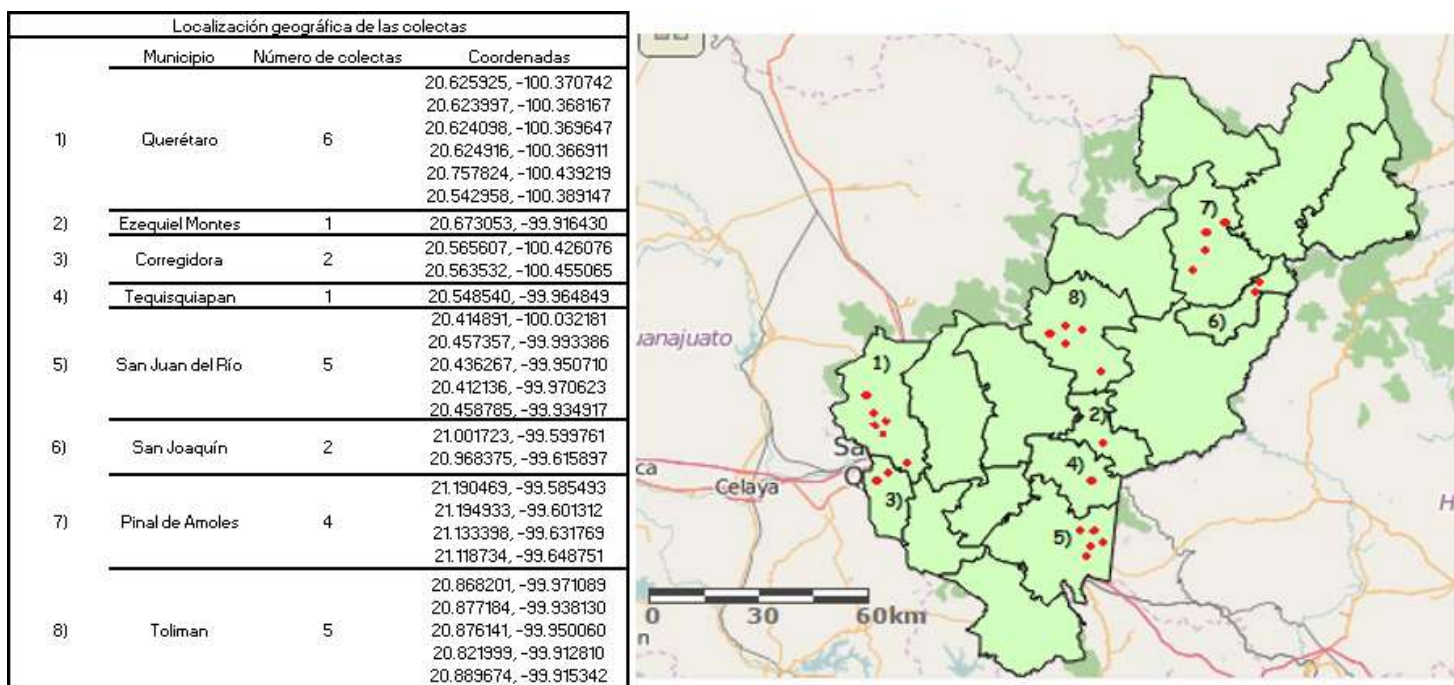


Figura 5: Mapa del estado de Querétaro y zona de colectas. Los puntos rojos indican el sitio donde se realizó una colecta de suelo.

VI.2) Antibiosis por metabolitos no volátiles (ANV) antibiosis por metabolitos volátiles (AV) y micoparasitismo.

El incremento del uso de pesticidas sobre los campos agrícolas ha propiciado la selección de cepas de fitopatógenos resistentes a estos compuestos químicos, optando por aumentar la dosis aplicada en los campos de producción, aun conociendo las consecuencias a la salud del ecosistema, animal y humana (Baraldi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2015). En el presente estudio se analizó la diversidad de cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro, lo que representa uno de los primeros estudios de aislamiento e identificación de especies de este género para formar una colección que pueda ser explorada para minimizar los problemas de enfermedades ocasionadas por hongos, en los cultivos de importancia económica de nuestro estado. El género *Trichoderma*, como ya se ha mencionado anteriormente, es conocido por sus propiedades bioestimulantes, pero además, por ser un hongo potencialmente aplicado para el control de fitopatógenos.

La marchitez y pudrición de las plantas como consecuencia de la infección por fitovirididades de *F. oxysporum* es una de las enfermedades más difíciles de controlar a nivel mundial (Alam *et al.*, 2010; Arici *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014). Hasta inicios del siglo XXI, la mejor alternativa para el control de la fusariosis era la aplicación de productos químicos, sin embargo la presencia de cepas resistentes a fungicidas ha encaminado la investigación hacia nuevas formas de control. Hasta hace relativamente poco tiempo, comenzó la búsqueda de agentes de control biológico para tratar esta enfermedad, sin embargo, debido a la alta diversidad de cepas de *F. oxysporum*, además de la variabilidad de resultados en la aplicación de estos tratamientos, se insta a la búsqueda continua de nuevos agentes de control biológico que permitan elevados porcentajes de biocontrol.

Respecto a la antibiosis por metabolitos no volátiles, se observó un efecto antagónico contra *F. oxysporum*, a través de las moléculas secretadas que pasan la membrana del celofán y se dispersan sobre el medio PDA. Interesantemente la mayoría de las cepas de *Trichoderma* mostraron un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *F. oxysporum* (Tabla 1; Apéndice 1); pero solo tres de ellas tuvieron el mayor efecto, la cepa T3-1 la cual logró un 54.31% de inhibición del crecimiento de

F. oxysporum fue la de mayor actividad, seguido de la cepa RE-15 con un 42.80% y la cepa TSR1-5 un 41.07%. Aunque, en estos experimentos también se encontraron cepas cuyos metabolitos no volátiles eran incapaces de inhibir el desarrollo de *F. oxysporum*, como fue el caso de la cepa RE-17, la cepa RE-19 y la cepa MB2, que inhibían menos del 5% el crecimiento de *F. oxysporum* respecto al control (Tabla 1). Se encontró con una prueba de bondad de ajuste que los datos se ajustan a una distribución normal, ya que la prueba de Shapiro-Wilk establece un valor de $P(W=0.9217|155 \text{ g. l.}) < 0.001$; al distribuirse de una manera normal, el análisis de varianza mostro que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P < 0.001$).

A diferencia de lo encontrado en los ensayos de ANV, en los cuales solo unas pocas cepas de *Trichoderma* inhiben eficientemente el crecimiento de *F. oxysporum*, la antibiosis mediada por metabolitos volátiles presentó un mayor efecto antagónico (Tabla 1: Apéndice 3). Las tres cepas que tuvieron un mayor porcentaje de inhibición fueron la cepa RE-03, SM3-2 y NI-1 con porcentajes de inhibición de 70.69%, 68% y 63.39%, respectivamente. Aunque la gran mayoría de los tratamientos inhibieron por lo menos un 40% el crecimiento de *F. oxysporum*, indicando que las cepas de *Trichoderma* son más efectivas para inhibir a este fitopatógeno, mediante la producción de metabolitos secundarios volátiles. Se encontró con una prueba de bondad de ajuste que los datos se ajustan a una distribución normal, ya que la prueba de Shapiro-Wilk establece un valor de $P(W=0.9814|155 \text{ g. l.}) = 0.0341$ ($P \leq 0.05$); al distribuirse de una manera normal, el análisis de varianza mostro que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P \leq 0.001$).

Respecto a los ensayos de ANV como de la AV que ejerce *Trichoderma* sobre *F. oxysporum*, no parece haber cepas que inhiban el crecimiento del patógeno combinando las dos estrategias de antibiosis. Una prueba t de student de comparación de pares, mostro que las 8 cepas con mayor actividad antagónica no afectan el desarrollo de *F. oxysporum* combinando las dos estrategias de antibiosis. Por ejemplo la cepa RE-15 inhibe el desarrollo del hongo principalmente por vía ANV en un 42.8% en contraste que por AV en 36.99% ($P = 0.384$) por la vía de ANV

y AV existen diferencias entre la aplicación de los tratamientos. Mismo caso para la cepa AD3 ($P=0.01$).

Tabla 1 Resumen de datos de los ensayos de antibiosis y micoparasitismo de las cepas; se esquematiza también el sitio de origen de la cepa así como la clave con la que fue aislada. En azul las cepas más efectivas por ANV, y en amarillo metabolitos AV y rosa igual de efectiva en ANV y AV.

Cepa	Sitio de muestra/Asociado a	Clasificación micoparásita	Control biológico Vs <i>Fusarium oxysporum</i>			
			Antibiosis No Volátiles		Antibiosis Volátiles	
			Inhibición de crecimiento (%)	Desviación estandar	Inhibición de crecimiento (%)	Desviación estandar
Control	-	-	0.00	0.0000	0.00	0.0000
RE-02	Pinal de Amoles/ Maíz	2	6.23	0.0897	47.74	0.1223
RE-03	Pinal de Amoles/ Maíz	4	16.12	0.2198	70.69	0.0724
RE-04	Pinal de Amoles/ Maíz	2	16.56	0.1106	51.11	0.2592
RE-05	Pinal de Amoles/ Maíz	2	26.67	0.1843	56.12	0.0663
RE-06	Pinal de Amoles/ Maíz	2	20.46	0.1427	35.34	0.1816
RE-07	Pinal de Amoles/ Maíz	2	17.35	0.2832	36.50	0.1056
RE-08	Pinal de Amoles/ Maíz	4	29.80	0.1757	54.23	0.1752
RE-09	Pinal de Amoles/ Maíz	2	17.03	0.1483	51.23	0.1660
RE-10	Pinal de Amoles/ Maíz	2	27.75	0.1528	51.41	0.1149
RE-11	Pinal de Amoles/ Maíz	4	21.79	0.0644	53.36	0.0604
RE-12	Pinal de Amoles/ Maíz	5	26.88	0.2619	48.43	0.1135
RE-12.1	Pinal de Amoles/ Maíz	4	19.73	0.1971	47.86	0.1593
RE-13	Pinal de Amoles/ Maíz	5	18.08	0.2190	51.26	0.0451
RE-13.1	Pinal de Amoles/ Maíz	2	32.54	0.1039	26.17	0.3055
RE-15	Pinal de Amoles/ Maíz	5	42.80	0.0939	36.99	0.1187
RE-17	Pinal de Amoles/ Maíz	2	1.76	0.1336	43.07	0.1527
RE-18	Pinal de Amoles/ Maíz	4	8.37	0.1208	42.48	0.1131
RE-19	Pinal de Amoles/ Maíz	3	2.32	0.1180	40.73	0.1884
RE-20	Pinal de Amoles/ Maíz	2	9.54	0.1280	37.21	0.2362
RE-21	Pinal de Amoles/ Maíz	5	5.67	0.0478	42.49	0.0580
AD3	Toliman/Aguacate	2	34.04	0.0727	58.41	0.2071
GY5	Toliman/Guayaba	4	33.74	0.0490	52.27	0.0638
MB1	Toliman/Maíz	4	20.53	0.2974	33.06	0.0806
NI-1	Toliman/Nispero	3	17.12	0.1228	63.39	0.0240
NZ1	Toliman/Nuez	4	37.17	0.3069	33.77	0.0629
NZ3	Toliman/Nuez	2	21.82	0.1113	36.11	0.1937
NZ4	Toliman/Nuez	4	21.65	0.0607	26.82	0.2702
SM3-1	San Joaquin/Aguacate	4	26.39	0.0760	49.54	0.1628
SM3-2	San Joaquin/Aguacate	4	28.67	0.2345	68.00	0.2700
T1-1	Querétaro/Mesquite	4	35.00	0.1674	43.95	0.0805
T2-2	Querétaro/Higuerilla	2	26.35	0.1184	44.55	0.0523
TEM-1	Ezequiel Montes/Maíz	2	23.70	0.2650	44.40	0.0259
T3-1	Corregidora/Higuerilla	3	54.31	0.0848	48.15	0.0659
T2-1	Querétaro/Higuerilla	2	33.03	0.0901	54.54	0.0207
*028	Querétaro/Frijol	3	31.94	0.1660	46.88	0.3303
TM9	Querétaro/Maíz	2	19.01	0.1561	45.73	0.1920
TQ1	Corregidora/Alfalfa	2	12.54	0.1416	47.46	0.1574
TQ2	Querétaro/Nopal	2	39.99	0.1214	46.09	0.1563
TQ3	Querétaro/Mesquite	2	39.27	0.3695	45.41	0.0753
TQ4	Querétaro/Mesquite	2	18.81	0.1001	44.60	0.3000
TQ5	Querétaro/Mesquite	3	22.90	0.1023	57.47	0.5122
TQ6	Querétaro/Mesquite	5	25.07	0.1208	55.73	0.1325
TSR1-2	San Juan del Río/Hierba	2	31.65	0.1477	42.83	0.2104
TSR1-3	San Juan del Río/Hierba	5	29.65	0.1973	49.39	0.0734
TSR1-4	San Juan del Río/Maíz	2	29.05	0.0785	32.71	0.0774
TSR1-5	San Juan del Río/Frijol	4	41.07	0.2186	45.45	0.2341
TSR1-6	San Juan del Río/Hierba	3	21.87	0.0570	59.93	0.2914
TSR1-7	San Juan del Río/Suelo	2	19.67	0.1251	45.76	0.0785
MB2	Toliman/Maíz	3	4.45	0.3460	45.68	0.0924
TSR1-9	San Juan del Río/Suelo	4	23.79	0.1746	38.90	0.1290
TTX2	Tequisquiapan/Maíz	3	28.31	0.2284	52.28	0.0393

El micoparasitismo es un comportamiento característico de las especies del género *Trichoderma*, sin embargo la agresividad del parasitismo está relacionada con la especie del hongo a atacar. En este proyecto, se encontró que la cepa de *F. oxysporum* utilizada es un hongo difícil de micoparasitar, ya que ninguna de las cepas de *Trichoderma* aisladas en este proyecto fue capaz de sobrecrecer totalmente al fitopatógeno (Apéndice 2). De acuerdo con la clasificación de Bell y col. (1982), la mayoría de las cepas de *Trichoderma spp.* analizadas en este estudio son clasificación 2 y 3 (Figura 6), es decir, que solo micoparasita menos del 66% al fitopatógeno (clase 2), o que el fitopatógeno y *Trichoderma* crece aproximadamente hasta el centro de la placa, sin crecer el uno sobre el otro. En seis ensayos, *F. oxysporum* sobrecreció en 2/3 a la cepa de *Trichoderma spp.*, por lo que se consideraron a esas cepas como de clase 4. Ninguna cepa de *Trichoderma spp.* micoparásitó completamente al fitopatógeno, así como que en ningún caso el fitopatógeno sobrecreció en su totalidad a la cepa de *Trichoderma* (Tabla 1; Figura 6).

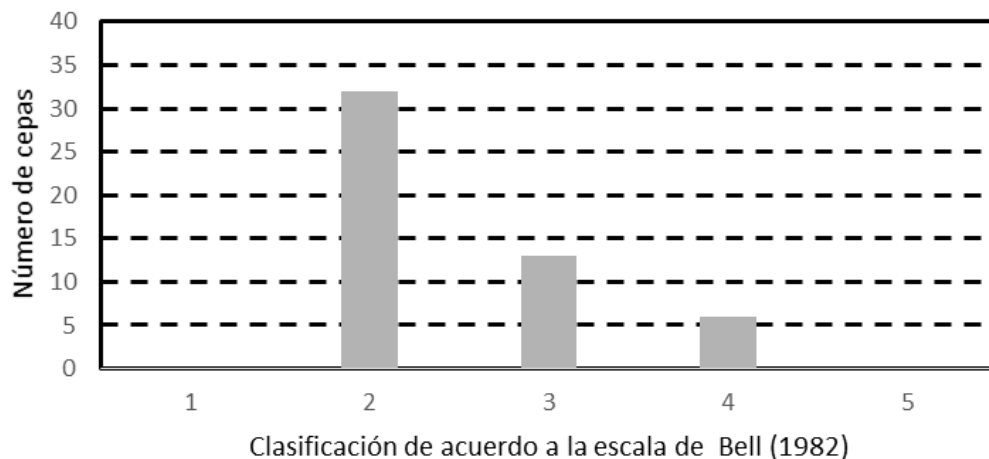


Figura 6: Micoparasitismo presentado por las cepas de *Trichoderma spp.* aisladas Vs *F. oxysporum*. El número encima de la barra indica el número de cepas de su respectiva clasificación (Bell et al., 1982).

Actualmente la principal manera de control biológico de *F. oxysporum* radica en la prevención de la enfermedad, y para ello, las cepas de *Trichoderma* podrían ser una buena alternativa. En este estudio, las cepas de *Trichoderma* aisladas provenían

exclusivamente de suelo asociado a plantas, por lo que se considera que son cepas potencialmente capaces de interactuar directamente con las células vegetales, algo que es muy deseable y que se busca al momento de hacer el escrutinio de cepas de *Trichoderma spp.*, potencialmente aplicables al control biológico.

El antagonismo por vía de metabolitos no volátiles, metabolitos volátiles y el micoparasitismo son las vías antagónicas más caracterizadas en las cepas del género *Trichoderma*; por lo que fueron esas estrategias las evaluadas en este proyecto. En general, las cepas aisladas presentaron diferentes capacidades antagónicas que inhibían el desarrollo en distintos grados de *F. oxysporum*. La inhibición fue mayor por la vía de AV que la de ANV por parte de las cepas aisladas en este trabajo. En otros trabajos se ha demostrado que los metabolitos no volátiles son más efectivos para inhibir el desarrollo de los fitopatógenos (Ajith and Lakshmidivi, 2010; Altinok and Erdogan, 2015; Bhramaramba *et al.*, 2013; Raut *et al.*, 2014a, 2014b; Raza *et al.*, 2013; Siameto *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que las especies de *Trichoderma* usan diversas estrategias para inhibir el desarrollo de los hongos fitopatógenos, y el hecho de que nuestra colección sea más efectiva para inhibir mediante la producción de volátiles sugiere que su implementación en programas de control biológico debe ser mediante inóculos que se establezcan en la rizosfera.

En este ensayo, los metabolitos más efectivos para el control de *F. oxysporum* fueron los volátiles, algo similar a lo que ocurrió en el estudio de Perveen y Bokhari (2012), en el sentido de que los metabolitos volátiles tuvieron un mayor efecto antagónico que los metabolitos filtrados. Aunque el antagonismo fue notorio en este tipo de ensayos, el efecto puede ser mayor al incrementar la cantidad de inóculo, tal y como ocurre en el estudio de El-Katatny (2006), donde en experimentos *in vitro*, al aumentar la cantidad de inóculo de la cepa de *T. harzianum* se inhibe gradualmente el desarrollo de *F. oxysporum*. Otro ensayo donde se observaron resultados similares, fue el estudio de Raza y col. (2013), donde una cepa de *F. oxysporum* tienen un crecimiento radial menor en confrontación con metabolitos volátiles que con metabolitos no volátiles.

En un estudio previo, se describió como *F. oxysporum* inducía la producción de metabolitos secundarios volátiles, tales como pentadecanos, 2,4-Di-tert-butilfenol, β -Bisaboleno, α -curcumeno, sin embargo de los metabolitos liberados en mayor cantidad entre estos dos hongos son el verticilol y lignoceranós, los cuales son metabolitos a los que se les ha probado su actividad antibacteriana y antifúngica (Dambolena *et al.*, 2008; Reino *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014a). De igual manera se sabe que las moléculas piranos son excelentes agentes inhibitorios de especies de *F. oxysporum*, por lo que muy probablemente el efecto antibiótico que se observó sea una sinergia en la acción de diferentes moléculas.

De las ocho cepas más efectivas para controlar a *F. oxysporum* por AV, solo la cepa TQ6 se logró identificar el cluster de *Trichoderma spp.* a la que pertenece a nivel molecular (*T. longibrachiatum*) y por ANV, se lograron identificar a nivel molecular las cepas RE-15 y TQ2 (*T. tomentosum* y *T. asperellum*), por lo que una formulación comprendida entre *T. longibrachiatum* y *T. tomentosum/T. asperellum* podría inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* de manera sinérgica; esta clase de tratamiento ya se ha aplicado de manera experimental en semillas de chícharo, en la cual una formulación hecha a base de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii* logró un efecto protector contra el fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, incluso mayor que inoculando las semillas solo con una especie de *Trichoderma*. Así mismo, Shahid y col. , (2014) indica que la gran variedad de genotipos de *Trichoderma*, soporta la idea de la aplicación conjunta para el control de fitopatógenos para obtener un efecto sinérgico. Bajo este enfoque, la combinación de la cepa de *T. longibrachiatum* y *T. tomentosum* o *T. longibrachiatum* y *T. asperellum* aisladas en este trabajo podría inhibir de manera significativa el desarrollo de *F. oxysporum*. En el caso de *T. longibrachiatum*, se ha caracterizado como un agente de control biológico contra especies de nematodos, por lo que, la aplicación de la cepa TQ6 podría reducir de igual manera el desarrollo de otros fitopatógenos (Zhang *et al.*, 2014b, 2015).

Ensayos en donde se confronta mediante un cultivo dual cepas de *Fusarium* y *Trichoderma*, se observa que este último es capaz de inhibir el crecimiento del

fitopatógono (Barari, 2016; Naglot *et al.*, 2015; Raza *et al.*, 2013; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013), sin embargo el antagonismo presentado se refería más hacia la capacidad de *Trichoderma spp.* de crecer y desarrollarse más rápido que el fitopatógono, que de igual manera es una estrategia de control biológico. De las cepas aisladas en este proyecto, ninguna tuvo la capacidad de micoparasitar totalmente la colonia de *F. oxysporum*, aunque la mayoría se clasificaron en la categoría 2, en el sentido de que es capaz de micoparasitar a *F. oxysporum* en 2/3 partes al fitopatógono, como se presentó en el trabajo de Michel-Aceves y col. (2009), por lo que es probable que en conjunto con otras estrategias, se inhiba totalmente al patógono.

VI.3) Identificación de las cepas de *Trichoderma spp.*

Se extrajo ADN genómico de las cepas de *Trichoderma spp.*, con las cuales se realizó una dilución a 100ng/μl de ADN para realizar reacciones de PCR. Se obtuvieron amplicones con un tamaño de banda de entre 500 y 600pb, que es el tamaño esperado para este marcador molecular (Figura 6).



Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos -ITS1 e ITS4. En los carriles laterales se cargó un marcador de peso molecular de 1Kb. La imagen muestran los amplicones de los aislados 43-51 y un control positivo que corresponde a una cepa de *T. harzianum* ya caracterizada en el laboratorio, sin embargo la presencia de las bandas de 600pb se confirmó para los otros aislados,

Tras la purificación de los productos de PCR, y su posterior secuenciación, se comparó la secuencia obtenida con las presentes en la base de datos GenBank, utilizando para ello la herramienta BLAST-Nucleotide. Como se observa en el Tabla 2, los resultados por homología coinciden en que la identidad de los aislados corresponde a secuencias de diferentes especies del género *Trichoderma*, sin embargo, la utilización de solo un marcador molecular no determina identidad de las cepas pero si nos da una aproximación (Druzhinina *et al.*, 2004; Jaklitsch and Voglmayr, 2015).

Tabla 2: Análisis por homología usando la herramienta BLAST-nucleotide. A partir de la secuencia determinada para cada amplicón obtenido con los cebadores ITS1 e ITS4. En la tabla solo se incluyen las cepas a las que se les fue posible realizar un análisis filogenético. Las cepas se identificaron en la base de datos nr del NCBI. Se indica también el % de identidad, el código de GenBank y el E-value según la base de datos del GenBank.

Muestra	Especie	% Identidad	Código GenBank	Evalue
NZ4	<i>Trichoderma atroviride</i>	100	KR868247.1	0
RE02	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP316423.1	0
RE04	<i>Trichoderma gamsii</i>	100	KX009500.1	0
RE-06	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP316423.1	0
RE07	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP316423.1	0
RE08	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KX227644.1	0
RE09	<i>Trichoderma gamsii</i>	100	KX009501.1	0
RE10	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KX227644.1	0
RE11	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP316423.1	0
RE12	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KX227644.1	0
RE12.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP316423.1	0
RE13	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KX227644.1	0
RE13.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP340267.1	0
RE15	<i>Trichoderma tomentosum</i>	99	FJ860744.1	0
RE17	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP340267.1	0
RE18	<i>Trichoderma tomentosum</i>	100	FJ860744.1	0
RE19	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	KU710282.1	0
RE20	<i>Trichoderma tomentosum</i>	100	FJ860744.1	0
RE21	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	KP340267.1	0
T22	<i>Trichoderma saturnisporium</i>	100	KC884818.1	0
T3-1	<i>Trichoderma atroviride</i>	100	KR868253.1	0
TQ1	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KU865566.1	0
TQ2	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KT445769.1	0
TQ4	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	KU341014.1	0
TQ6	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	LC185084.1	0
TSR12	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	EF596966.1	0
TSR14	<i>Trichoderma saturnisporium</i>	100	KC884818.1	0
TTX2	<i>Trichoderma atroviride</i>	100	KU847881.1	0

VI.4) Análisis filogenético de las cepas.

Se realizó un análisis filogenético de 68 secuencias, entre las que se encuentran algunas previamente identificadas por Kulling-Gradinger y col. (2002) y 28 secuencias de cepas de este proyecto. El análisis filogenético agrupa a las cepas en clusters de especies, ya que desde el 2002 la filogenia de este género ha implementado la agrupación de estas especies en grupos de secuencias, debido al número creciente de cepas identificadas, además de que no se ha implementado un método de identificación universal para determinar especies de *Trichoderma*. Los

clusters utilizados en esta filogenia son los mismos que reporta Kulling-Gradinger y col. (2002). Previo al nombre de la especie dentro del filograma, se identifica a las especies con la sigla A, B1, B2, B3, B4, B5, C y D. Las especies identificadas en este análisis filogenético agrupa a las especies en 3 clusters (Figura 8) , los cuales son los clusters A, B4 y C que corresponden a la sección *Trichoderma*, *Pachybasium* y *Longibrachiatum*. Dentro de los clusters de especies, las cepas se agrupan en 7 clados: 2 cepas en el clado de *Trichoderma saturnisporum*, 3 cepas en el clado de *Trichoderma asperellum*, 14 en el clado de *Trichoderma koningiopsis*, 1 cepa en el clado de *Trichoderma harzianum*, 3 cepas en el clado de *Trichoderma tomentosum* y 2 cepa en un clado sin determinar (TQ6 y TSR1-2). En el caso de la cepa TQ6, el análisis filogenético no logra diferenciar si la cepa corresponde a *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma citrinoviride*, aunque el análisis con la herramienta Blast-nucleotide, la identifica con un 100% de identidad como un *T. longibrachiatum* (Tabla 2). Los soportes de cada clado se muestran en el filograma, aunque solo se agregaron aquellas que superen el 50% de soporte bajo el método de máxima parsimonia y máxima verosimilitud y el 90% bajo el método bayesiano. Las cepas se agruparon en clados bien soportados al menos por un método, a excepción de las agrupadas en el clado de *Trichoderma tomentosum*. La Tabla 2 indica que existen cepas que se identifican como *Trichoderma gamsii*, mientras que en el análisis filogenético se agrupan como *T. koningiopsis*; sin embargo ambas son cepas muy similares que se agrupan inclusive dentro del mismo cluster, con mínima variación entre ellos. Un error a nivel de secuencias de 23 cepas aisladas no permitió incluirlas en el análisis filogenético, ya que una vez en la matriz, las cepas no se agrupaban dentro de los cluster definidos, por lo que a pesar de presentar características morfológicas propias del género *Trichoderma*, a nivel de secuencia no se tenía la certeza total de que las cepas pertenecieran al género, aunque esto no las excluye de manera definitiva del género.

Recientemente, se aislaron cepas de *Trichoderma* de insectos descortezadores en el municipio de Pinal de Amoles, en el estado de Querétaro, a los cuales se les menciona su posible uso como agentes de control biológico (Gijón-Hernández *et al.*,

2015). Esto hace suponer de la gran variedad de estrategias antagónicas contra otros organismos fitopatógenos, por lo que las cepas aisladas en este trabajo, pueden ser potencialmente aplicadas para el control biológico, no solo de hongos fitopatógenos, sino también como hongos entomopatógenos.

A diferencia de las cepas de *Trichoderma spp.* aisladas por Gijón-Hernández y col. (2015), las cepas de este estudio estaban asociadas a la rizosfera de distintas plantas; además en ese estudio no se realizó la identificación con marcadores moleculares para corroborar la especie a la que pertenecían. Además, en un estudio realizado por Mendoza-Elos y col. (2012), en el que estudiaron la diversidad de hongos asociados a la rizosfera de Maíz, reportaron la presencia de cuatro cepas de *Trichoderma spp.* en el municipio de Apaseo el Grande, Guanajuato (un sitio que se encuentra a 25 minutos del municipio de Corregidora, Querétaro) y que tienen condiciones ambientales muy similares; en este estudio se reportó la presencia de *Trichoderma* levemente superior a la presente en el municipio de Corregidora, siendo que ambas presentan condiciones ambientales muy similares.

Parte de la importancia sobre el análisis de la diversidad de cepas de *Trichoderma* en zonas agrícolas recae en las alteraciones en las comunidades de hongos de una región al implementarse las actividades agrícolas, ya que tal y como reporta Samaniego-Gaxiola y Chew-Madinaveitia (2007), la actividad agrícola favorece el establecimiento del género *Trichoderma spp.*; esto soporta el hecho de que la mayoría de las cepas utilizadas en este proyecto fueron aisladas de suelo con uso agrícola.

A pesar de que se aislaron una gran cantidad de cepas, 23 cepas no se pudieron identificar con el marcador molecular utilizado, por lo que la utilización de otro marcador molecular podría elucidar la identidad de las cepas aisladas.

Tabla 3: Especies identificadas en este proyecto. Se representa en la tabla el número de aislados obtenidos de *Trichoderma spp.*, así como agrupándolos con su respectiva especie con base en la secuencias obtenidas. También se indican las cepas que se identificaron con esa especie.

Número de aislados	Especie	Cepas
12	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	RE-02; RE-06; RE-07; RE-08; RE-10; RE-11; RE-12; RE-12.1; RE-13; RE-13.1; RE-17; RE-21
2	<i>Trichoderma gamsii</i>	RE-04; RE-09
3	<i>Trichoderma atroviride</i>	NZ4; TTX2; T3-1
3	<i>Trichoderma tomentosum</i>	RE-15; RE-18; RE-20
2	<i>Trichoderma saturnisporium</i>	T22; TSR1-4
2	<i>Trichoderma harzianum</i>	RE-19; TSR1-2
1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TQ6
3	<i>Trichoderma asperellum</i>	TQ1; TQ2; TQ4

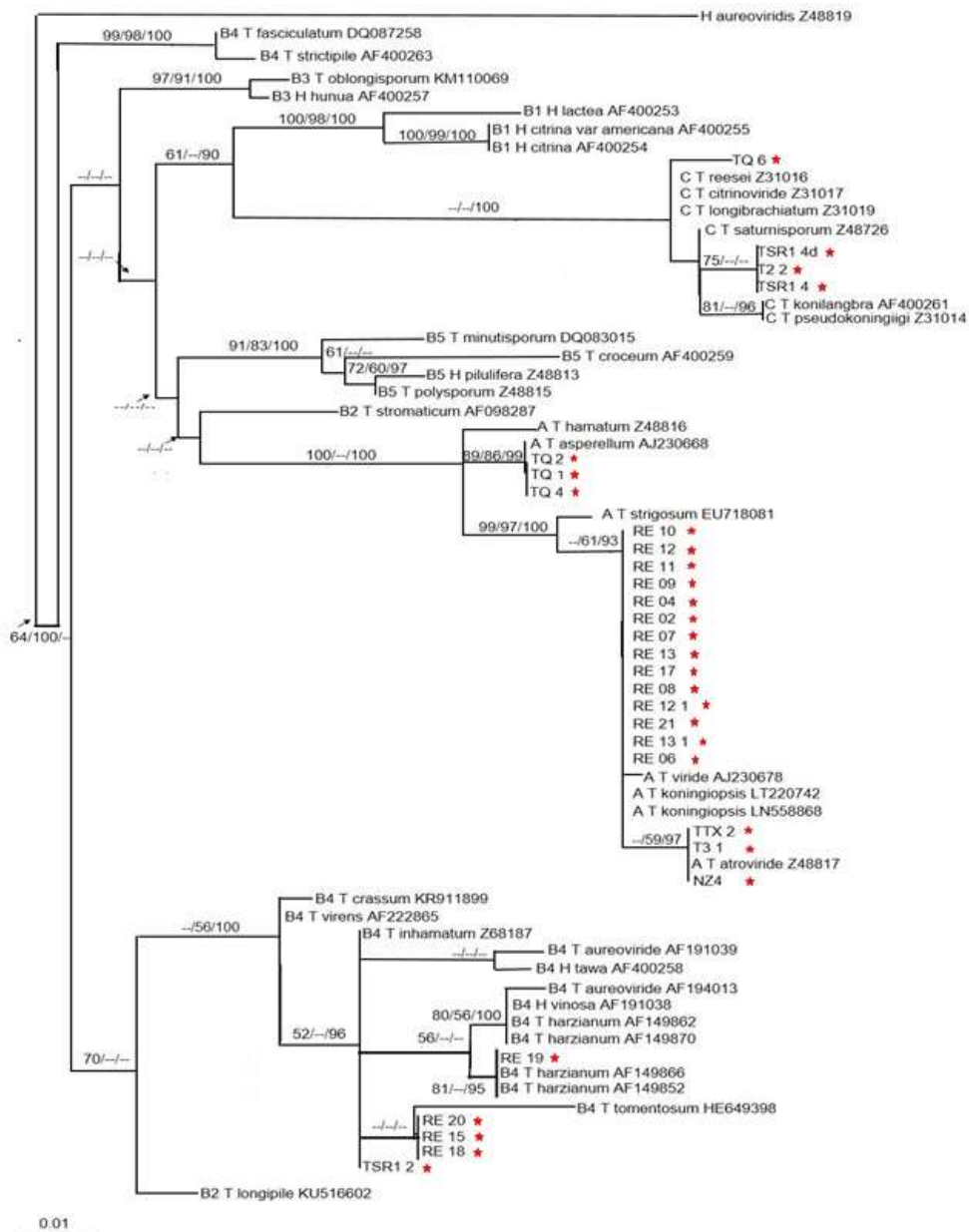


Figura 8: Análisis filogenético de las cepas aisladas. El Filograma representa el análisis filogenético de las cepas aisladas y su agrupación dentro de los clusters de especies según Kulling-Gradinger y col. (2002). El filograma se realizó a partir de un análisis por máxima verosimilitud, máxima parsimonia y estadística bayesiana, por lo que en cada rama se agrega el soporte respectivo de las ramas. En casos donde el porcentaje de soporte fuera menor a 50% en máxima verosimilitud o máxima parsimonia, el soporte se indica con un doble guion. El caso es el mismo para el método bayesiano en caso de que el soporte fuera menor a 90%. Estrellas rojas después del nombre, señala a las cepas aisladas en este trabajo.

VII) Conclusión

Este es el primer estudio en el que se logra identificar aislados de *Trichoderma spp.* a nivel especie a gran escala en la región, por lo que es una primera exploración hacia determinar la biodiversidad de cepas de *Trichoderma* presentes en los distintos tipos de suelo de Querétaro.

En función de los ensayos de antagonismo se puede concluir que las cepas de T. (especie) y T. (especie), son las que presentaron mayor capacidad antagónica y los potenciales agentes de control biológico, ya que se demostró que algunas de ellas son capaces de inhibir a *F. oxysporum*.

A pesar de lo anterior, no hay que olvidar que el efecto antagónico que puede presentar una cepa de *Trichoderma spp.* puede actuar como un sistema sinérgico, en el que cepas complementarias puedan actuar de modo que de distintos mecanismos de inhibición actúen a fin de controlar la población de *F. oxysporum*.

Los resultados indican una alta prevalencia de *T. koningiopsis* asociado a maíz en Pinal de Amoles, sin embargo, entre ellas existe variabilidad fenotípica en las pruebas de antibiosis y micoparasitismo.

No todas las especies de *Trichoderma* aisladas en este proyecto lograron ser identificadas por el marcador molecular seleccionado, a pesar de que la base de datos del GenBank nos agrupa todas las especies del género *Trichoderma*, por lo que es necesario incluir en el análisis otros marcadores moleculares para determinar las relaciones filogenéticas de todos los aislados.

VIII) Perspectivas.

En este trabajo se aislaron 51 cepas, sin embargo es necesario aumentar la colección de cepas de *Trichoderma* presentes en el suelo, y asociadas a la rizosfera de las plantas, de manera que se obtenga un análisis más profundo sobre la diversidad de cepas de *Trichoderma*. Así mismo, se pretende realizar el análisis filogenético total de las cepas aisladas, utilizando para ello otros marcadores moleculares además de la región 5.8S del ARN ribosomal, como lo puede ser el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1- α*).

Aunque este trabajo profundiza sobre la capacidad antagonista por ANV y AV de las cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro, se considera necesaria la exploración de la antibiosis que se pueda presentar contra otros fitopatógenos presentes en la región, así como confrontarlos para ver su comportamiento contra otros hongos fitopatógenos, tales como *M. oryzae*, *B. cinérea* o *Puccinia spp.* así como con otros organismos plagas, como nematodos o insectos, por lo que nuevos ensayos deben ser desarrollados a fin de obtener una mejor valoración sobre estas cepas de *Trichoderma* y su potencial aplicación en campo en un sistema integrado de manejo de plagas.

Sobre las cepas con una mayor capacidad antibiótica contra otros organismos fitopatógenos, se sugieren análisis por UHPLC y LC-MS para determinar las moléculas involucradas en la antibiosis, y desarrollar estrategias para purificar esos compuestos y analizar su capacidad antibiótica *in vitro*

Desarrollar ensayos de interacción plantas-*Trichoderma*, y su capacidad promotora de crecimiento vegetal; haciendo énfasis en aquellas cepas que mostraron una importante actividad antagónica contra *F. oxysporum*.

Desarrollar biofungicidas que sean capaces de inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* en alimentos pre y post cosecha, así como otros fitopatógenos de importancia agrícola.

IX) Bibliografía

- Ahluwalia, V., Walia, S., Sati, O.P., Kumar, J., Kundu, A., Shankar, J., and Paul, Y.S. (2014). Isolation, characterisation of major secondary metabolites of the Himalayan *Trichoderma koningii* and their antifungal activity. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 47, 1063–1071.
- Ajith, P.S., and Lakshmidēvi, N. (2010). Effect of Volatile and Non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell peppers. *Nat. Sci.* 8, 265–269.
- Alam, S.S., Sakamoto, K., Amemiya, Y., Inubushi, K., Gilkes, R.J., and others (2010). Biocontrol of soil-borne *Fusarium* wilts of tomato and cabbage with a root colonizing fungus, *Penicillium* sp. EU0013. In 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World,.
- Allen, M.F., Moore Jr, T.S., and Christensen, M. (1982). Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Can. J. Bot.* 60, 468–471.
- Altinok, H.H., and Erdogan, O. (2015). Determination of the In vitro Effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 43, 494.
- Anke, H., Kinn, J., Bergquist, K.-E., and Sterner, O. (1991). Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. *Biol. Met.* 4, 176–180.
- Arici, S.E., Bozat, G., and Akbulut, I. (2013). Investigation of Potential Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-Lycopersici* by Essentials Oils, Plant Extract and Chemical Elicitors in vitro. *Pak J Bot* 45, 2119–2124.
- Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* 19, 224–231.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., and Pratella, G.C. (2003). Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears, pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathol.* 52, 362–370.
- Barrera, J.F. (2007). Introducción, Filosofía y Alcance del Control Biológico. In *Teoría Y Aplicación Del Control Biológico*, (México: Sociedad Mexicana de Control Biológico), pp. 2–18.
- Bell, D.K., Wells, H.D., and Markham, C.R. (1982). In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. *Ecol. Epidemiol.* 72, 379–382.

- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., and Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260.
- Benjamin, E.O., and Wesseler, J.H.H. (2016). A socioeconomic analysis of biocontrol in integrated pest management: A review of the effects of uncertainty, irreversibility and flexibility. *NJAS - Wagening. J. Life Sci.* 77, 53–60.
- Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C.L., and Restani, P. (2000). Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit. Contam.* 17, 399–406.
- Bhramaramba, S., Nagamani, A., and others (2013). Antagonistic *Trichoderma* isolates to control bakanae pathogen of rice. *Agric Sci Dig.* 33, 104–108.
- Bogumił, A., Paszt, L.S., Lisek, A., Trzciński, P., and Harbuzov, A. (2013). Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Hortic.* 25.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 1–11.
- Boutati, E.I., and Anaissie, E.J. (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90, 999–1008.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A.R., Chet, I., Viterbo, A., and Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. *PLoS Pathog.* 9, e1003221.
- Cai, F., Chen, W., Wei, Z., Pang, G., Li, R., Ran, W., and Shen, Q. (2015). Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant Soil* 388, 337–350.
- Capote, N., Aguado, A., Pastrana, A.M., and Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance (INTECH Open Access Publisher).
- Caracuel, Z., Roncero, M.I., Espeso, E.A., González-Verdejo, C.I., García-Maceira, F.I., and Di Pietro, A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48, 765–779.
- Carvalho, D.D., Lobo Junior, M., Martins, I., Inglis, P.W., and Mello, S. (2014). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Trop. Plant Pathol.* 39, 384–391.

- Chakraborty, M.R., and Chatterjee, N.C. (2008). Control of fusarium wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biol. Plant.* 52, 582–586.
- Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A., and Saxena, P. (2007). Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiol. Plant.* 29, 361–367.
- Channabasava, A., Lakshman, H.C., and Jorquera, M.A. (2015). Effect of fungicides on association of arbuscular mycorrhiza fungus *Rhizophagus fasciculatus* and growth of Proso millet (*Panicum miliaceum* L. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 35–45.
- Chaverri, P., Samuels, G.J., and others (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores (Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht).
- Chen, C.J., Yu, J.J., Bi, C.W., Zhang, Y.N., Xu, J.Q., Wang, J.X., and Zhou, M.G. (2009). Mutations in a beta-tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides. *Phytopathology* 99, 1403–1411.
- Chen, S.-C., Zhao, H.-J., Wang, Z.-H., Zheng, C.-X., Zhao, P.-Y., Guan, Z.-H., Qin, H.-Y., Liu, A.-R., Lin, X.-M., and Ahammed, G.-J. (2016). *Trichoderma harzianum*-induced resistance against *Fusarium oxysporum* involves regulation of nuclear DNA content, cell viability and cell cycle-related genes expression in cucumber roots. *Eur. J. Plant Pathol.*
- Chet, I., and Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48, 37–43.
- Chet, I., Inbar, J., and Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships.*, (Berlin: Springer-Verlag), pp. 165–184.
- Colla, G., Roupheal, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., and Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1706–1715.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L., Cortes-Penagos, C., and Lopez-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 1579–1592.
- Dambolena, J.S., López, A.G., Cánepa, M.C., Theumer, M.G., Zygadlo, J.A., and Rubinstein, H.R. (2008). Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon* 51, 37–44.

- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* *13*, 414–430.
- DeBach, P. (1968). Exitos, tendencias y posibilidades futuras. In *Control Biológico de Las Plagas de Insectos Y Malas Hierbas.*, (México: CECSA), pp. 789–831.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C.K., Broadway, R.M., and Harman, G.E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, Characterization, and Synergistic Antifungal Activity in Combination with Gliotoxin. *Mol. Plant Pathol.* *83*, 308–313.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 539–548.
- Drori, N., Kramer-Haimovich, H., Rollins, J., Dinoor, A., Okon, Y., Pines, O., and Prusky, D. (2003). External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of Pectate Lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 3258–3262.
- Druzhinina, I.S., Chaverri, P., Fallah, P., Kubicek, C.P., and Samuels, G.J. (2004). *Hypocrea flaviconidia*, a new species from Costa Rica with yellow conidia. *Stud Mycol* *50*, 401–407.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., and Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 749–759.
- Dubey, S.C., Aradhika, T., Dureja, P., and Grover, A. (2011). Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. *Indian J. Agric. Sci.* *81*, 455–461.
- Eilemberg, J., Hayek, A., and Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* *387–400*.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., and Haas, H. (2004). Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell* *3*, 561–563.
- El-Katatny, M.H., Abdelzaher, H.M.A., and Shoukamy, M.A. (2006). Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* *39*, 289–301.
- Funasaki, G.Y., Lai, P.Y., Nakahara, L.M., Beardsley, J.W., and Ota, A.K. (1988). A review of biological control introductions in Hawaii. *Proc Hawaii Entomol Soc* *105–160*.

- Gams, W., and Bissett, J. (2002). Morphology and identification of Trichoderma. In *Trichoderma Y Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, (USA: Taylor & Francis), p. 270.
- Gerdemann, J.W. (1965). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Formed on Maize and Tuliptree by *Endogone fasciculata*. *Mycologia* 57, 562.
- Ghag, S.B., Shekhawat, U.K.S., and Ganapathi, T.R. (2015). Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. *Int. J. Pest Manag.* 61, 250–263.
- Gijón-Hernández, A.R., Trejo-Sandoval, Z., López-Guzman, C.-M., Ramírez-Huerta, L., Arriola-Padilla, V.-J., and Pérez-Gálvaez, I.M. (2015). Caracterización y efectividad de *Trichoderma* spp. sobre insectos descortezadores de pino. *Entomol. Mex.* 2, 293–299.
- Goldman, G.H., Pellizzon, C.H., Marins, M., Mcinerney, J.O., and Goldman, M.H.S. (2002). *Trichoderma* spp. genome and gene structure. In *Trichoderma Y Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, (Taylor & Francis), p. 270.
- Goloboff, P., Farris, J., and Nixon, K. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24, 774–786.
- Gordon, T.R., and Martyn, R.D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 111–128.
- Groenewald, S. (2005). Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Magister Scientiae*. University of Pretoria.
- Guler, N.S., Pehlivan, N., Karaoglu, S.A., Guzel, S., and Bozdeveci, A. (2016). *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 38.
- Gupta, R., Lee, S.E., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Park, S., Wang, Y., and Kim, S.T. (2015). Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory. *Front. Plant Sci.* 6.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., and Ondik, K.L. (2002). Asexual genetics in *Trichoderma* and *Gliocladium*: Mechanisms and implications. In *Trichoderma Y Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, (USA: Taylor & Francis), pp. 243–270.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25.

Hernández-Mendoza, J.L., Sánchez-Pérez, M.I., García-Olivares, J.G., Mayek-Pérez, N., González-Prieto, J.M., and Quiroz-Velásquez, J.D. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13, 176–185.

Hokkanen, H.M.T. (1985). Success in classical biological control. *CRC Crit Rev Plant Sci* 35–72.

Howell, C.R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Dis.* 87, 4–10.

Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 407–415.

Huson, D.H., and Scornavacca, C. (2012). Dendroscope 3- An interactive viewer for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* doi: 10.1093/sysbio/sys062.

Ignjatov, M., Milosevic, D., Nikolic, Z., Gvozdanovic-Varga, J., Jovicic, D., and Zdjelar, G. (2012). *Fusarium oxysporum* as causal agent of tomato wilt and fruit rot. *Pestic. Fitomedicina* 27, 25–31.

INEGI (2015). PRODUCTO INTERNO BRUTO EN MÉXICO DURANTE EL TERCER TRIMESTRE DE 2015 (Cifras desestacionalizadas) (Aguascalientes, Ags.: Instituto Nacional de Estadística y Geografía).

Innocenti, G., Roberti, R., and Piattoni, F. (2015). Biocontrol ability of *Trichoderma harzianum* strain T22 against *Fusarium* wilt disease on water-stressed lettuce plants. *BioControl* 60, 573–581.

Jaklitsch, W.M., and Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Stud. Mycol.* 80, 1–87.

Jaklitsch, W.M., Lechat, C., and Voglmayr, H. (2014). The rise and fall of *Sarawakus* (Hypocreaceae, Ascomycota). *Mycologia*.

Jayaswal, R.K., Singh, R., and Lee, Y.S. (2003). Influence of Physiological and Environmental Factors on Growth and Sporulation of an Antagonistic Strain of *Trichoderma viride* RSR 7. *Mycobiology* 31, 36–41.

Jiménez, J.V., and Granados, X.M. (2014). Diagnosis of *Fusarium oxysporum* in the cultivation of pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. *Net J. Agric. Sci.* 2, 107–112.

John, R.P., Tyagi, R.D., Prévost, D., Brar, S.K., Pouleur, S., and Surampalli, R.Y. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Prot.* 29, 1452–1459.

- Karthikeyan, M., Radhika, K., Mathiyazhagan, S., Bhaskaran, R., Samiyappan, R., and Velazhahan, R. (2006). Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. *Braz. J. Plant Physiol.* *18*, 367–377.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B.K., Singh, S.P., and Singh, H.B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 533–544.
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. *Plant Cell* *8*, 1711–1722.
- Knogge, W. (1998). Fungal pathogenicity. *Curr. Opin Plant Biol.* *1*, 324–328.
- Knudsen, G.R., Eschen, D.J., Dandurand, L.M., and Wang, Z.G. (1991). Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* *57*, 2864–2867.
- Kulling-Gradinger, C.M., Szakacs, G., and Kubicek, C.P. (2002). Phylogeni and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* *106*, 757–767.
- Larsen, T.O., Frisvad, J.C., Ravn, G., and Skaaning, T. (1998). Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Addit. Contam.* *15*, 671–675.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., and Herrera-Estrella, A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* *196*, 109–123.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. (2015). Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* *66*, 513–545.
- Lorenz, E.S. (2009). *Potential Health Effects of Pesticides (Pennsylvania: Pennsylvania State University)*.
- Lorito, M., Woo, S.L., Ambrosio, M.D., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P., and Scala, F. (1996). Synergistic Interaction Between Cell Wall Degrading Enzymes and Membrane Affecting Compounds. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *9*, 206–213.
- Ma, Z., Yoshimura, M., and Michailides, T.J. (2003). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 7145–7152.
- Mendgen, K., and Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* *7*, 352–356.

- Mendoza-Elos, M., Figueroa-Rivera, M.G., and Andrio-Enríquez, E. (2012). Diversidad de hongos del suelo asociados al cultivo del maíz. *Biodivers. En Guanaj. Estud. Estado* Vol II 2, 78–82.
- de las Mercedes Dana, M., Limón, M.C., Mejías, R., Mach, R.L., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A., and Kubicek, C.P. (2001). Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 38, 335–342.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Solano-Pascacio, L.Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., and Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la “ Escoba de Bruja ” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 27, 18–26.
- Michielse, C.B., and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10, 311–324.
- Ming, Q., Su, C., Zheng, C., Jia, M., Zhang, Q., Zhang, H., Rahman, K., Han, T., and Qin, L. (2013). Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 64, 5687–5694.
- Munir, S., Jamal, Q., Bano, K., Sherwani, S.K., Bokhari, T.Z., Khan, T.A., Khan, R.A., Jabbar, A., and Anees, M. (2013). Biocontrol ability of *Trichoderma*. *Int. J. Agric. Crop Sci.* 6, 1246.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J. (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8, 227–233.
- Nucci, M., and Anaissie, E. (2007). *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 695–704.
- Otadoh, J.A., Okoth, S.A., Ochanda, J., and Kahindi, J.P. (2011). Assessment of *Trichoderma* Isolates for Virulence Efficacy on *Fusarium oxysporum* F. sp. *Phaseoli. Trop. Subtrop. Agroecosystems* 13, 99–107.
- Perveen, K., and Bokhari, N.A. (2012). Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 3348–3353.
- Petzinger, E., and Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livest. Prod. Sci.* 76, 245–250.
- Prabha, T.R., Revathi, K., Vinod, M.S., Shanthakumar, S.P., and Bernard, P. (2012). A simple method for total genomic DNA extraction from water moulds. *Curr Sci* 104, 345–347.




- Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G., Kelly, D.E., and Kelly, S.L. (2015). Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens: Mode of action and resistance mechanisms to azole fungicides. *Pest Manag. Sci.* 71, 1054–1058.
- Prusky, D., and Yakoby, N. (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol. Plant Pathol.* 4, 509–516.
- Raeder, U., and Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1, 17–20.
- Rajput, A.Q., and Shahzad, S. (2015). Growth and sporulation of *Trichoderma polysporum* on organic substrates by addition of carbon and nitrogen sources. *Pak. J. Bot.* 47, 979–986.
- Raut, I., Badea-Doni, M., Calin, M., Oancea, F., Vasilescu, G., Sesan, T.E., and Jecu, L. (2014a). Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. *Rev. Chim.* 65, 1285–1288.
- Raut, I., Calin, M., Vasilescu, G., Doni, M.B., Sesan, T., Jecu, L., Badea-Doni, M., and Oancea, F. (2014b). Effect of non volatile compounds of *Trichoderma* spp. against *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Sci. Bull. Ser. F Biotechnol.* 18, 178–181.
- Raza, W., Faheem, M., Yousaf, S., Rajer, F.U., and Yameen, M. (2013). Volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Sci Lett* 1, 21–24.
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R., and Collado, I.G. (2007). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.* 7, 89–123.
- Rep, M. (2005). Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 19–27.
- Rodríguez del Bosque, L.A., and Arredondo Bernal, H.C. (2007). El Concepto y la Premisa Fundamental. In *Teoría Y Aplicación Del Control Biológico*, (México: Sociedad Mexicana de Control Biológico),.
- Rodriguez-Galvez, E., and Mendgen, K. (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189, 61–72.
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Rouabhi, R. (2010). *Introduction and Toxicology of Fungicides* (INTECH Open Access Publisher).




- RV, A., and Lakshman, H.C. (2014). Tripartite bioinoculants beneficial to *Phaseolus aureus* roxb. (Green Gram) to improve plant growth biomass production. *Int. J. Bioassays* 3, 3008–3010.
- Said, S.D. (2009). Spore production of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*: Effect of C/N ratio and glucose concentration. *J. Rekayasa Kim. Lingkungan*. 6, pp – 35.
- Samaniego-Gaxiola, J.A., and Chew-Madinaveitia, Y. (2007). Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 78, 383–390.
- Samuels, G.J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 8, 923–935.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.-L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., and Kubicek, C.P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4364–4370.
- Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., and Trillas, I. (2010). *Trichoderma asperellum* Strain T34 Controls *Fusarium* Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron. *Microb. Ecol.* 59, 141–149.
- Shahid, M., Srivastava, M., Singh, A., Kumar, V., Pandey, S., Sharma, A., Rastogi, S., Pathak, N., and Srivastava, K. (2014). Production of a novel of bioformulation of *Trichoderma/Hypocrea* using biotechnological approaches. *Afr. J. Microbiol. Res.* 9, 1895–1905.
- Sharma, P., Sharma, A., Jasuja D., N., Sharma, N., and Joshi C., S. (2015). A Review on Toxicological Effects of Fungicides. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 6, 348–360.
- Shundo, L., Almeida, A.P. de, Alaburda, J., Ruvieri, V., Navas, S.A., Lamardo, L.C., and Sabino, M. (2006). Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37, 533–537.
- Siameto, E.N., Okoth, S., Amugune, N.O., and Chege, N.C. (2010). Antagonism of *Trichoderma farzianum* isolates on soil borne plant pathogenic fungi from Embu District, Kenya. *J. Yeast Fungal Res.* 1, 47–54.
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., and Kumar, V. (2013). Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virol. Mycol.* 03.
- S Nosir, W. (2016). *Trichoderma harzianum* as a Growth Promoter and Bio-Control Agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi*. *Adv. Crop Sci. Technol.* 04.




- Staskawicz, B.J. (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol.* 125, 73–76.
- Sukarno, N., Smith, S.E., and Scott, E.S. (1993). The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 125, 139–147.
- Sundaramoorthy, S., and Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 1, 36–40.
- Szczechura, W., Staniaszek, M., and Habdas, H. (2013). *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*—the cause of *Fusarium* crown and root rot in tomato cultivation. *J. Plant Prot. Res.* 53, 172–176.
- Vandenkoornhuise, P., Ridgway, K.P., Watson, I.J., Fitter, A.H., and Young, J.P.W. (2003). Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities: DIVERSITY OF AM FUNGI IN GRASSLAND. *Mol. Ecol.* 12, 3085–3095.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Sheridan, L.W., and Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1–10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., et al. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8.
- Xolocotzi, E.H. (1988). La agricultura tradicional en México. *Comer. Exter.* 3.
- Yedidia, I., Shoresh, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. (2003). Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7343–7353.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., and Mukherjee, P.K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biol. Rev.* 30, 74–90.
- Zhang, F., Yang, X., Ran, W., and Shen, Q. (2014a). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS Microbiol. Lett.* 359, 116–123.
- Zhang, S., Gan, Y., and Xu, B. (2014b). Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. *BioControl* 59, 319–331.
- Zhang, S., Gan, Y., and Xu, B. (2015). Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. *Appl. Soil Ecol.* 94, 21–29.

Zhou, D., and Hyde, K. (2001). Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycol. Res.* 105, 1449–1457.


Anexo I

Pruebas de Antibiosis por metabolitos no volátiles de <i>Trichoderma spp.</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i>.	
Cepa de <i>Trichoderma spp.</i>	Foto
CONTROL	
028	
AD3	




GY5	
MB1	
N1-1	

NZ1	
NZ3	
NZ4	

RE-01	 A petri dish containing a white, fuzzy mold growth on a dark agar surface. The mold is concentrated in the center and spreads outwards, with a small yellowish spot in the middle.
RE-03	 A petri dish containing a white, fuzzy mold growth on a dark agar surface. The mold is concentrated in the center and spreads outwards, with a small yellowish spot in the middle.
RE-04	 A petri dish containing a white, fuzzy mold growth on a dark agar surface. The mold is concentrated in the center and spreads outwards, with a small yellowish spot in the middle.

RE-05	 A petri dish containing a dark blue agar medium. A large, circular, white, fuzzy mold colony is growing in the center, with a small, distinct yellowish-brown spot at its very center.
RE-06	 A petri dish containing a dark blue agar medium. A large, circular, white, fuzzy mold colony is growing in the center, with a small, distinct yellowish-brown spot at its very center.
RE-07	 A petri dish containing a dark blue agar medium. A large, circular, white, fuzzy mold colony is growing in the center, with a small, distinct yellowish-brown spot at its very center.

<p>RE-08</p>	
<p>RE-09</p>	
<p>RE-10</p>	

<p>RE-11</p>	 A petri dish containing a circular, dense growth of white, fuzzy mold on a dark agar surface. The mold has a slightly yellowish center.
<p>RE-12.1</p>	 A petri dish showing a circular, white, fuzzy mold growth on a dark agar surface. The mold has a yellowish center and some faint reddish-brown streaks radiating from the center.
<p>RE-12</p>	 A petri dish with a circular, white, fuzzy mold growth on a dark agar surface. The mold has a yellowish center.

RE-13.1








RE-13







RE-15







RE-17	
RE-18	
RE-19	




RE-20	
RE-21	
SM3-1	




<p>SM3-2</p>	
<p>T1-1</p>	
<p>T1-2</p>	




T2-1	
T2-2	
T2-3	

<p>T2-5</p>	
<p>T5-1</p>	
<p>TEM-1</p>	

TM9	
TQ1	
TQ2	

TQ3	
TQ4	
TQ5	

<p>TQ6</p>	
<p>TSR1-2</p>	
<p>TSR1-3</p>	

<p>TSR1-4</p>	
<p>TSR1-5</p>	
<p>TSR1-6</p>	

TSR1-7









TSR1-9





TTX2







Anexo II




Pruebas de Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i>.		
Cepa de <i>Trichoderma</i> spp.	Día 7	Día 14
Control		
028		
AD3		




GY5		
MB1		




Anexo III

Pruebas de Antibiosis por metabolitos volátiles de <i>Trichoderma spp.</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i>.	
Cepa de <i>Trichoderma spp.</i>	Foto
CONTROL	
028	




<p>AD3</p>	
<p>GY5</p>	
<p>MB1</p>	



<p>MB2</p>	
<p>N1-1</p>	
<p>NZ1</p>	


<p>NZ3</p>	
<p>NZ4</p>	
<p>RE-01</p>	




RE-03	
RE-04	
RE-05	




<p>RE-06</p>	
<p>RE-07</p>	
<p>RE-08</p>	

<p>RE-09</p>	
<p>RE-10</p>	
<p>RE-11</p>	

<p>RE-12.1</p>	
<p>RE-12</p>	
<p>RE-13.1</p>	




RE-13	
RE-15	
RE-17	




<p>RE-18</p>	
<p>RE-19</p>	
<p>RE-20</p>	


<p>RE-21</p>	
<p>SM3-1</p>	
<p>SM3-2</p>	




T1-1	
T1-2	
T2-1	

T2-2	
T2-3	
T2-5	

<p>T5-1</p>	
<p>TEM-1</p>	
<p>TM9</p>	

TQ1	
TQ2	
TQ3	

<p>TQ4</p>	
<p>TQ5</p>	
<p>TQ6</p>	

<p>TSR1-2</p>	
<p>TSR1-3</p>	
<p>TSR1-4</p>	

TSR1-5



TSR1-6



TSR1-7



TSR1-9



TTX2

