

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Evaluación del efecto fungicida de cepas de *Trichoderma*
nativas del estado de Querétaro

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

Lic. VÍCTOR JAVIER GARCÍA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dr. EDGARDO ULISES ESQUIVEL NARANJO

C.U SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO, 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Evaluación del efecto fungicida de cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Víctor Javier García Sánchez

Dirigido por:

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Director

Esquivel Naranjo Edgardo U.
Firma

Dr. Martha Dolores Bibbins Martínez
Co-Directora

[Firma]
Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime
Secretario

[Firma]
Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

[Firma]
Firma

Dr. Ramón Pelagio Flores
Suplente

[Firma]
Firma

[Firma]
Dra.C.S. Juana Elizabeth Elton Puente
Director de la Facultad

[Firma]
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2018

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención brindada durante los estudios del posgrado.

Al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo por su confianza, paciencia, compañerismo y todo el conocimiento que me ha brindado, pero sobre todo el apoyo que recibí en todo momento y que han hecho que todos los años bajo su tutoría sean inolvidables.

A la Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez por la confianza y el trato tan ameno en todo momento, pero sobre todo a los excelentes comentarios recibidos a lo largo de la duración de la maestría.

Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez, al Dr. Fidel Landeros Jaime y al Dr. Ramón Pelagio Flores por su enorme ayuda, apoyo técnico y valiosos comentarios sobre la realización de esta tesis, mil gracias!.

A la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez por su enorme ayuda y apoyo en la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por permitirme ser parte de su comunidad desde el 2008 y ayudar en mi formación ética y profesional.

A Anai, mi pareja en toda la extensión de la palabra, que en todo momento me ha dado su apoyo incondicional, su ayuda y calma que me motiva a seguir y no darme nunca por vencido. Gracias por tu paciencia, tu fe, tu alegría y tu amor. Gracias por guiarme en mis momentos de mayor confusión. Gracias por crecer conmigo.

A mis padres, sin ellos nada de esto fue posible, gracias por todo el amor que me han dado, por la confianza y el apoyo para ingresar en el posgrado. Por las lecciones brindadas. Simplemente no hay palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí.

Al Laboratorio de Microbiología Molecular. A Ceci, a Evelia, a Edda: los momentos en las clases y en el laboratorio son momentos que siempre se atesorarán.

A Nami por su valiosa amistad y comentarios. Sin duda de las personas que más llevo presente en el corazón.

A los trabajadores y ejidatarios del estado de Querétaro por su apoyo en la recolección de muestras.

Resumen

En la agricultura, los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* se ha implementado como un agente de control biológico de diferentes fitopatógenos en diferentes regiones a nivel mundial, observándose efectos nocivos no sólo sobre el patógeno blanco, sino también en la microbiota endógena. Con la finalidad de aumentar la eficacia y especificidad de este tipo de tratamientos, se han evaluado cepas nativas de *Trichoderma*, así como también, extractos libres de células. En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de filtrados de cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii*. En total se aislaron 133 cepas de *Trichoderma* provenientes de diferentes zonas del estado; de las cuales, dos cepas (RE-11 y NI-1) inhibieron el crecimiento de los fitopatógenos antes mencionados en más de un 75% en medio PDA. Así mismo se determinó que las cepas RE-11 y NI-1 presentan mayor actividad inhibitoria al crecer en medio PDB en comparación a cuando son crecidas en medio mínimo Vogel's. Las cepas RE-11 y NI-1 crecidas en medio PDB presentan una disminución drástica en la actividad antifúngica; sin embargo al concentrar los filtrados a través de una liofilización, la actividad inhibitoria es comparable con el fungicida químico (benomilo). Simultáneamente las cepas aisladas fueron identificadas realizando análisis filogenéticos de dos marcadores moleculares (5.8 ADNr y *tef-1α*). Las cepas aisladas corresponden a las especies *T. atroviride* (38 cepas), *T. koningiopsis* (24 cepas), *T. harzianum* (17 cepas), *T. atrobrunneum* (5 cepas), *T. cerinum* (3 cepas), *T. asperellum* (12 cepas), *T. capillare* (10 cepas), *T. tomentosum* (5 cepas) y *T. longibrachiatum* (1 cepa) así como 18 cepas que no lograron ser identificadas. Estos datos muestran que los filtrados liofilizados de las cepas NI-1 y RE-11 correspondientes a *T. asperellum* y *T. koningiopsis* respectivamente, pueden inhibir el desarrollo de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii*, por lo que ambas cepas pueden ser consideradas en la formulación de biofungicidas.

(Palabras clave: *Trichoderma*, Control biológico, Hongos fitopatógenos, Antibiosis, Filtrados, Filogenia)

Abstract

In agriculture, fungi belonging to the genus *Trichoderma* has been implemented as a biocontrol agent of different phytopathogens in different regions worldwide, being observed harmful effects not only on the target pathogen, but also in the endogenous mycobiota. In order to increase the efficacy and specificity of this type of treatment, *Trichoderma* native strains have been evaluated, as well as cell-free extracts. In this work, the *in vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma* strains native from the State of Querétaro against the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Sclerotium rolfsii* was evaluated. In total 133 strains of *Trichoderma* were isolated from different areas of the state; of which 133, two strains (RE-11 and NI-1) inhibited the growth of the above mentioned phytopathogens by more than 75% in PDA medium. Likewise, it was determined that the strains RE-11 and NI-1 have greater inhibitory activity when growing in PDB medium compared to when they are grown in Vogel's minimum medium. Strains RE-11 and NI-1 grown in PDB medium present a drastic decrease in antifungal activity; however, by concentrating the filtrate through lyophilization, the inhibitory activity is comparable with a chemical fungicide (benomyl). Simultaneously, the isolated strains were identified by carrying out phylogenetic analyzes of two molecular markers (5.8 rDNA and *tef-1α*). The isolates correspond to the species *T. atroviride* (38 strains), *T. koningiopsis* (24 strains), *T. harzianum* (17 strains), *T. atrobrunneum* (5 strains), *T. cerinum* (3 strains), *T. asperellum* (12 strains), *T. capillare* (10 strains), *T. tomentosum* (5 strains) and *T. longibrachiatum* (1 strain) as well as 18 strains that could not be identified. These data suggest that the lyophilized filtrates of strains NI-1 and RE-11 corresponding to *T. asperellum* and *T. koningiopsis* respectively, can inhibit the development of *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Sclerotium rolfsii*, so both strains can be considered in the formulation of biofungicidas.

(Keywords: *Trichoderma*, Biocontrol, Phytopathogenic fungi, Antibiosis, Filtrates, Phylogeny)

Índice de Contenido

Índice General.....i

Índice de Figuras.....iv

Índice de Tablas.....vii

Índice General

1.	INTRODUCCIÓN-----	1
2.	ANTECEDENTES-----	2
2.1	Hongos fitopatógenos-----	2
2.2	Agricultura en el estado de Querétaro y plagas de hongos-----	3
2.3	Control de hongos fitopatógenos-----	3
2.4	Control biológico con <i>Trichoderma</i> -----	4
2.5	Mecanismos de antagonismo del género <i>Trichoderma</i> -----	7
2.5.1	Antibiosis mediada por metabolitos secundarios. -----	7
2.5.2	Competencia por nutrientes y espacio. -----	11
2.5.3	Fungistasis y tolerancia a compuestos tóxicos.-----	11
2.5.4	Micoparasitismo-----	12
2.5.5	Inducción de sistemas de defensa en las plantas-----	13
2.6	Biología, ecología y sistemática del género <i>Trichoderma</i> -----	15
2.7	Problemas del control biológico con <i>Trichoderma</i> -----	16
2.8	Filtrados de <i>Trichoderma</i> -----	17
3.	JUSTIFICACIÓN -----	19
4.	HIPÓTESIS-----	20
5.	OBJETIVOS -----	21
5.1	General -----	21
5.2	Específicos-----	21
6.	METODOLOGÍA-----	22
6.1	Toma de muestras de suelo.-----	22
6.2	Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma spp.</i> -----	22
6.3	Generación de una colección de cepas de <i>Trichoderma</i> . -----	23
6.4	Extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares -----	23

Unknown

Field Coc

8.1	Identificación y biodiversidad de los aislados de <i>Trichoderma</i> -----	83	Unknown Field Coc
8.2	Antagonismo de los aislados de <i>Trichoderma</i> y caracterización de las cepas NI-1 y RE-11 -----	84	Bernardo Deleted
8.3	Actividad antifúngica de filtrados -----	85	Unknown Field Coc
8.4	Efecto antifúngico de filtrados liofilizados -----	88	Bernardo Deleted
8.5	Metabolitos de <i>Trichoderma</i> analizados a través de CG-EM -----	90	Unknown Field Coc
9.	CONCLUSIONES -----	95	Bernardo Deleted
10.	PERSPECTIVAS -----	97	Bernardo Deleted
11.	BIBLIOGRAFÍA -----	98	Unknown Field Coc

Índice de Figuras.

Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo.	31
Figura 2. Productos de PCR utilizando dos protocolos de extracción de ADN.....	32
Figura 3. Amplificación del marcador ITS.	33
Figura 4. Amplificación del marcador <i>tef-1α</i>	34
Figura 5. Árbol filogenético realizado con el marcador molecular ITS.....	36
Figura 6. Árbol filogenético realizado con el marcador molecular <i>tef1a</i>	37
Figura 7. Cladograma del clado Hamatum.....	38
Figura 8. Filograma del clado Hamatum.	39
Figura 9. Cladograma del clado Viride.	40
Figura 10. Filograma del clado Viride.....	41
Figura 11. Cladograma del clado Longibrachiatum.	42
Figura 12. Filograma del clado Longibrachiatum.	43
Figura 13. Cladograma del clado Harzianum.....	44
Figura 14. Filograma del clado Harzianum.	45
Figura 15. Total de especies identificadas en las cepas aisladas..	46
Figura 16. Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra <i>S. rolfsii</i>	48
Figura 17. Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra <i>F. oxysporum</i>	49
Figura 18. Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra <i>R. solani</i>	49
Figura 19: Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra <i>C. gloeosporioides</i>	50
Figura 20:.....	51
Figura 21. Morfología colonial de las cepas con mayor actividad antifúngica.	51
Figura 22. Capacidad antagónica de las cepas NI-1 y la cepa RE-11 contra cuatro hongos fitopatógenos.....	52
Figura 23. Cinéticas de crecimiento en distintas fuentes de carbono.....	53
Figura 24. Efecto de fuentes de carbono en la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> contra <i>R. solani</i>	55
Figura 25. Efecto de las fuentes de carbono en la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> contra <i>F. oxysporum</i>	56

Unknown

Field Coc

Figura 26. Efecto de las fuentes de carbono en la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> contra <i>S. rolfsii</i>	57	Unknown Field Coc
Figura 27. Efecto de las fuentes de carbono en la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> contra <i>C. gloeosporioides</i>	58	Unknown Field Coc
Figura 28. Actividad antifúngica de la cepa RE-11 en medio líquido contra <i>R. solani</i> en relación al tiempo.	59	Unknown Field Coc
Figura 29: Actividad antifúngica de la cepa NI-1 en medio líquido contra <i>R. solani</i> en relación al tiempo.	60	Unknown Field Coc
Figura 30. Efecto de los filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 suplementados en el medio de cultivo.	62	Unknown Field Coc
Figura 31. Efecto de los filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 al estar en contacto directo con el micelio de los fitopatógenos.....	64	Unknown Field Coc
Figura 32. Efecto de los filtrados liofilizados de la cepa RE-11 en el desarrollo de hongos fitopatógenos.	66	Unknown Field Coc
Figura 33. Efecto de los filtrados liofilizados de la cepa RE-11 en el desarrollo de hongos fitopatógenos.	68	Unknown Field Coc
Figura 34. Efecto de los filtrados sobre la germinación de las esporas de <i>C. gloeosporioides</i>	69	Unknown Field Coc
Figura 35. Comparación del efecto de los filtrados en la germinación de las esporas de <i>C. gloeosporioides</i>	70	Bernardo Deleted
Figura 36. Efecto de los filtrados sobre la viabilidad de las esporas de <i>F. oxysporum</i>	72	Unknown Field Coc
Figura 37. Comparación del efecto de los filtrados en la germinación de las esporas de <i>F. oxysporum</i>	73	Bernardo Deleted
Figura 38. Acción sinérgica de los filtrados de la cepa NI-1 y RE-11 sobre la germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>F. oxysporum</i>	74	Unknown Field Coc
Figura 39. Inhibición de germinación de esporas utilizando una mezcla de filtrados de las cepas NI-1 y RE-11.	74	Bernardo Deleted
Figura 40. Primera sección del cromatograma de la cepa NI-1.....	77	Unknown Field Coc
Figura 41. Segunda sección del cromatograma de la cepa NI-1.	78	Bernardo Deleted

Figura 42. Primera sección del cromatograma de la cepa RE-11. Análisis por CG-EM del filtrado de la cepa RE-11..... 80

Figura 43. Segunda sección del cromatograma de la cepa RE-11..... 81

Figura 44. Sensibilidad de las cepas NI-1 y RE-11 a higromicina B..... 82

Unknown
Field Coc
Bernardo
Deleted
Bernardo
Deleted
Unknown
Field Coc
Unknown
Field Coc
Bernardo
Deleted

Índice de Tablas.

Tabla 1. Lista de los principales metabolitos secundarios secretados por distintas especies de <i>Trichoderma</i>	9
Tabla 2. Elicitores identificados en cepas de <i>Trichoderma</i>	14
Tabla 3. Lista de especies de <i>Trichoderma</i> con su correspondiente número de acceso utilizadas como referencia para los análisis filogenéticos.	26
Tabla 4. Especies de <i>Trichoderma</i> descritas en México	47
Tabla 5. Metabolitos volátiles de la cepa NI-1 obtenidos tras el análisis CG-EM. .	75
Tabla 7. Metabolitos volátiles de la cepa RE-11 obtenidos tras el análisis CG-EM.	79

Unknown

Field Coc

Bernardo

Deleted

1. INTRODUCCIÓN

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. Actualmente 12 especies de plantas abarcan el 70% del alimento mundial, y de estas 12 plantas, 4 (maíz, trigo, papa y arroz) ocupan el 50% de la dieta promedio de una persona (García-Ortiz, 2015). En este tipo de cultivos, al estar las plantas de una misma especie concentrados en un mismo sitio, incrementa la incidencia por organismos patógenos y/o plagas entre los que destacan los hongos fitopatógenos.

Trichoderma provee muchas ventajas para ser utilizado como agente de control biológico, como son 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, así como un metabolismo secundario versátil capaz de secretar un gran arsenal de moléculas antagonicas contra fitopatógenos (Benítez et al., 2004; Munir et al., 2013).

Sin embargo, la principal problemática que representa esta estrategia de control biológico es la que involucra la incorporación de inóculos de las cepas de *Trichoderma*, en sitios ajenos al origen de las mismas lo que hace que estas formulaciones tengan una aplicación regional y por lo tanto, sin tener un efecto real en la producción total de un cultivo (Srivastava et al., 2016); además, se han reportado casos en los que el agente de control biológico no es compatible con el ecosistema en el que se quiere aplicar el tratamiento y termina por no establecerse. Por lo anterior, una de las premisas del control biológico es el utilizar organismos nativos de un sitio (Altieri, 1999; García-Nuñez et al., 2012).

Para contrarrestar la problemática anterior, se ha comenzado a comercializar los ingredientes activos de los biofungicidas, que se considera que son las moléculas o metabolitos secundarios, los cuales, tras la aplicación en sistemas *in vitro* han demostrado tener la misma efectividad en el control de fitopatógenos que

biofungicidas con base en células, y fungicidas químicos comerciales (Jayaraj et al., 2008; Soliman-Derbalah et al., 2012).

En este trabajo se pretende realizar un catálogo con las cepas nativas de *Trichoderma* del estado de Querétaro, con el fin de seleccionar las más efectivas como agentes de control biológico para los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*; para que a partir de ellas producir filtrados que prevengan el establecimiento y la aparición de enfermedades agrícolas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hongos fitopatógenos

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).

La presencia de hongos fitopatógenos puede tener repercusiones económicas muy severas para los productores. Además de esto, una vez cosechado el producto es muy probable que contenga inóculo de fitopatógenos en estado latente que deterioran los frutos post-cosecha o 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, entre ellos *Aspergillus flavus*. (Beretta et al., 2000; Larsen et al., 1998; Petzinger and Weidenbach, 2002; Shundo et al., 2006).

2.2 Agricultura en el estado de Querétaro y plagas de hongos

Datos oficiales indican que el maíz tuvo una producción total de un millón de toneladas cultivadas en 115,000 hectáreas durante el 2017; tan solo en el primer semestre de 2017, la derrama económica del maíz abarcaba el 59% de la ganancia total agrícola en el estado (SEDEA and Red Agropecuaria- WEB, 2018a, 2018b), así mismo en el primer semestre del 2018 la producción de maíz total en el estado fue de 122,000 toneladas siendo en ese sentido el cultivo más importante del estado. A pesar de la importancia de este cultivo, y como tal de la agricultura en la región, no se tienen datos sobre la prevalencia o incidencia de hongos fitopatógenos en la zona; sin embargo existen reportes aislados sobre la presencia de estos organismos, por ejemplo se ha detectado la presencia de *Botrytis cinerea* en cultivos de vid (Juárez-Campusano et al., 2016), cepas de *Fusarium spp.* en palmeras y cultivos de pimiento morrón, frijol y maíz (Montiel González et al., 2005; Pérez et al., 2008; Pérez-Aragón et al., 2013; Sánchez-García et al., 2006; Sandoval-Chávez et al., 2011), *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* en cultivos de chile (Hernández-Castillo et al., 2014; Montero-Tavera et al., 2013), *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii* en cultivos de cebolla (Becerra-Morales, 2014; Rodríguez-Pagaza, 2009), *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivos de brócoli y en aguacate (Ayala-Garay et al., 2014; Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato A.C., 2018), *Phytophthora cinnamomi*, *Verticillium alboatrum*, *Nectria galligena* y *Sphaceloma perseae* en aguacate (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato A.C., 2018).

2.3 Control de hongos fitopatógenos

Ante la 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 adoptada 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, se ha demostrado que la acción de algunos fungicidas tienen 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 (Sukarno et al., 1993). Así mismo, se ha reportado que los fungicidas tienen un efecto negativo sobre el hongo benéfico *Rhizophagus fasciculatus* (Allen et al., 1982), el cual se sabe que forma micorrizas con distintas especies de plantas, incluyendo algunas de importancia agrícola (Allen et al., 1982; Gerdemann, 1965; RV and 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). Ante las problemáticas expuestas anteriormente, se hace énfasis en la aplicación del control biológico para mitigar los efectos de los organismos plaga, sin afectaciones a la sustentabilidad de un ecosistema. Como alternativa al uso de fungicidas y el control químico se ha utilizado desde hace años el control biológico.

2.4 Control biológico con *Trichoderma*

El control biológico o Biocontrol se definió en 1919 como la aplicación, introducción o manipulación de organismos enemigos naturales para el control de plagas (Barrera, 2007). A partir de innovaciones y nuevos enfoques en esta ciencia ha quedado definido al 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 (Barrera, 2007; Benítez et al., 2004).

Uno de los agentes de control biológico más utilizado contra los hongos fitopatógenos son los hongos antagonistas, principalmente del género *Trichoderma* (Benítez et al., 2004). Este Ascomiceto posee 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 eficacia 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 and Shahzad, 2015).

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).

Actualmente, ya se comercializan productos biofungicidas con base en células de *Trichoderma* para el control de hongos fitopatógenos, por ejemplo, en un estudio realizado por Begum y colaboradores implementan un sistema de control biológico de cepas ya comercializadas de *Trichoderma* de Bangladesh en frutos de chile, para prevenir la infección de *Alternaria tenuis* (Begum et al., 2010); en ese trabajo demostraron que la aplicación por aspersión en hojas del fruto disminuye la incidencia de la enfermedad en un sistema controlado por invernadero, además de que en algunos casos, se incrementaba la biomasa de los frutos.

El control biológico utilizando cepas de *Trichoderma* ha sido una estrategia implementada desde hace varios años en México para remplazar el uso de agentes químicos para el control de hongos fitopatógenos, y aunque son ensayos aislados se han obtenido resultados promisorios para la aplicación de cepas de *Trichoderma* para el control de enfermedades agrícolas: En 2001 se realizó un experimento de campo en el que evaluaron la capacidad colonizadora de cepas de *Trichoderma harzianum* en campos de Irapuato y Cortazar, Guanajuato (Avila Miranda et al., 2006). En este ensayo la cepa C44 fue la que tuvo una mayor capacidad colonizadora en estos campos, así como una alta dispersión en la parcela; aunado a esto redujo la incidencia de *Sclerotium cepivorum* en parcelas de ajo; los autores mencionan que la capacidad colonizadora y su tasa de dispersión deben ser variables a evaluar durante la selección de cepas como potenciales agentes de control biológico en una zona.

En 2006 se realizaron ensayos de control biológico contra cepas de *Fusarium* en plantas de Agave, en la región de los Altos de Jalisco, utilizando cepas de *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. virens* (Tlapal Bolaños et al., 2014); en todos los casos se encontró una alta capacidad colonizadora de estas cepas en las raíces y sustratos de la planta, reduciendo la cantidad de UFC de *Fusarium* sp. en raíces y en sustrato (< 100 UFC).

En 2013 se realizó un ensayo de control biológico utilizando cepas de *Trichoderma* aisladas de una huerta de mango en el municipio de Tuxpan, Guerrero, y compararon su efectividad para el control de la enfermedad “escoba de bruja”

causada por especies de *Fusarium* (Aceves et al., 2013); así mismo compararon su eficacia contra dos fungicidas comerciales (benomilo y benzotiazol) y contra una cepa de *Trichoderma* comercial (*Trichoderma lignorum* Mycobac®) durante dos años; en este ensayo no sólo las cepas nativas fueron más efectivas que los otros tratamientos al haber un mayor número de inflorescencias sanas, sino que también incrementaron la producción total de fruto en la región y reduciendo la incidencia de la enfermedad tras dos años de aplicación. Este mismo grupo de trabajo evaluó la capacidad protectora de otras cepas de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* en invernadero de cacahuate (Michel-Aceves et al., 2013), obteniendo resultados similares; incrementó la producción del grano, favoreció el desarrollo de la planta y redujo la incidencia de la enfermedad incluso de una manera más eficiente que utilizando pentacloro nitrobenzeno, por lo que el uso de agentes derivados de *Trichoderma* en México resultan una promisoría estrategia para el control de enfermedades agrícolas y reemplazar el uso de fungicidas químicos al tener incluso una mayor capacidad protectora a largo plazo.

2.5 Mecanismos de antagonismo del género *Trichoderma*

En el control biológico utilizando como base *Trichoderma* se aprovechan las diferentes características propias del género, el cual ya se ha evaluado su eficacia en el control *in vivo* e *in vitro* sobre diferentes patógenos. Los principales mecanismos de acción de *Trichoderma* para antagonizar a otros hongos involucran la antibiosis a través de la secreción de metabolitos secundarios al ambiente, lo que inhibe el desarrollo y establecimiento de fitopatógenos (Tabla 1), la competencia por nutrientes y espacio, fungistasis, micoparasitismo y la inducción de respuestas de defensa de las plantas.

2.5.1 Antibiosis mediada por metabolitos secundarios.

Trichoderma se considera como un género altamente productor de metabolitos secundarios con actividades micotóxicas, al producir una gran cantidad de

antibióticos capaces de inhibir el desarrollo y establecimiento o incluso matar a microorganismos competidores (Benítez et al., 2004; Prasun K. Mukherjee et al., 2012; Reino et al., 2008). Además de eso es capaz de producir y secretar pigmentos que tienen actividad antioxidante para defenderse de la presencia de otros organismos o establecerse en ambientes desfavorables (Reino et al., 2008; Vinale et al., 2012). Muchos de estos metabolitos son de bajo peso molecular (<3 kDa) y están particularmente asociados a prevenir el establecimiento de microorganismos y adaptar el nicho para el correcto desarrollo de *Trichoderma* (Reino et al., 2008; Vinale et al., 2014). Así mismo se sabe que el tipo de metabolito, así como la cantidad y calidad están asociados a diferentes variables como son: la cepa y la especie, la presencia de otros microorganismos, la tasa de biosíntesis o biotransformación de moléculas presentes en el medio y las condiciones de crecimiento de la cepa en cuestión (Vinale et al., 2014).

Compuestos como las antraquinonas y los sesquiterpenos están relacionadas a la pigmentación de conidias en diferentes cepas de *Trichoderma* por lo que tienen actividades antioxidantes, así mismo, a las antraquinonas se les ha atribuido propiedades bacteriostáticas en contra de bacterias gram positivas mientras que a los terpenos se les ha descrito como moléculas antifúngicas en contra de levaduras y dermatofitos (Reino et al., 2008). Por otra parte, existen compuestos que por su estructura son capaces de interactuar directamente con la membrana celular, tal es el caso de las pironas y los peptaiboles: compuestos como la 6-Pentyl- α -pirona (6PP) causa daño a membrana citoplasmática y membrana de organelos debido al dominio alquil que posee (Poole and Whitaker, 1997), además se ha visto que este compuesto es capaz de secuestrar moléculas importantes para el desarrollo de hongos fitopatógenos como lo es el ácido fumárico así como una inhibición de su biosíntesis en cepas de *F. moniliforme* (El-Hasan et al., 2007); sin embargo la 6PP se considera un metabolito con un efecto fungistático debido a que es un metabolito volátil y su efecto se considera dosis-dependiente, es decir, que el efecto permanecerá mientras esté presente el compuesto (El-Hasan et al., 2007; Parker et al., 1997). Los peptaiboles son péptidos pequeños (5-20 aminoácidos) que tienen como característica el dominio N-terminal acilado y un

alcohol asociado al dominio C-terminal; estos compuestos poseen actividades antifúngicas y antibacterianas (Reino et al., 2008). Los peptaiboles alteran la permeabilidad de la membrana formando poros parecidos a canales de iones dependientes de voltaje por donde se libera el material citoplasmático de una célula causando su muerte (Fuente-Núñez et al., 2013). Aunque la función biológica en la célula de *Trichoderma* de las pironas y los peptaiboles no está bien definida, se sabe que actúan como mecanismos de defensa contra otros organismos actuando en sinergia con la liberación de enzimas hidrolíticas (Fuente-Núñez et al., 2013).

Las azafilonas son metabolitos con una gran diversidad estructural que comparten un sitio catalítico oxigenado. Estos metabolitos tiene actividades antifúngicas y antivirales, a través de la inhibición del correcto funcionamiento de ribonucleoproteínas (Reino et al., 2008). Los esteroides conocidos en cepas de *Trichoderma* son el ergosterol, lanosterol, ergokoninas y el pirocalciferol, todos ellos inhiben el crecimiento de levaduras y algunas especies de *Aspergillus* y *Fusarium* (Reino et al., 2008).

Tabla 1. Lista de los principales metabolitos secundarios secretados por distintas especies de *Trichoderma*

Metabolito	Especies que lo secretan	Referencia
Azafilona	<i>T. harzianum</i>	(Vinale et al., 2006a)
Derivados del ergosterol	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i>	(Reino et al., 2008)
Tricotecenos	<i>T. brevicompactum</i>	(Shentu et al., 2013; Tijerino et al., 2011)
Pironas	<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. atroviride</i> , <i>T. koningii</i>	(Claydon et al., 1987; Evidente et

		al., 2003; Garnica-Vergara et al., 2016; Parker et al., 1997)
Diquetopiperazina	<i>T. virens, T. hamatum, T. viride</i>	(Howell et al., 1993)
Compuestos nitrogenados heterociclicos	<i>T. arundinaceum; T. harzianum</i>	(Malmierca et al., 2013; Sawa et al., 1994; Francesco Vinale et al., 2009)
Butenolidos	<i>T. longibrachiatum</i>	(Andrade et al., 1992)
Compuestos hidrocarbonados	<i>T. atroviride</i>	(Contreras-Cornejo et al., 2015a)
Isopirenoides	<i>T. atroviride, T. virens</i>	(Contreras-Cornejo et al., 2015b)
Compuestos indolicos	<i>T. atroviride, T. virens</i>	(Contreras-Cornejo et al., 2009)
Peptidos antifungicos	<i>T. longibrachiatum</i>	(Shi et al., 2016)
Setinas	<i>T. harzianumc</i>	(Reino et al., 2008)
Terpenos	<i>T. harzianum T. koningii</i>	(Cutler et al., 1991; Francesco Vinale et al., 2009)
Peptaiboles	<i>T. viride, T. virens</i>	(Engelberth et al., 2001; Prasun K. Mukherjee et al., 2012)
Sideroforos	<i>Trichoderma spp.</i>	(Anke et al., 1991)
Antraquinonas	<i>T. harzianum, T. viride</i>	(Lin et al., 2012)

2.5.2 Competencia por nutrientes y espacio.

Trichoderma es un género de hongos caracterizado por tener un crecimiento micelial acelerado impidiendo el establecimiento y colonización de diferentes organismos, y por ende la captación de nutrientes (Infante et al., 2009; Kumar, 2013). La presencia de este hongo en diferentes sitios es evidencia de su gran plasticidad ecológica de este género por lo que es con este tipo de antagonismo (Infante et al., 2009). Generalmente coloniza de manera agresiva sus sustratos secretando al medio diferentes compuestos para favorecer su desarrollo e impedir el de otros microorganismos (Rajesh et al., 2016). Así mismo la abundante esporulación y rápido crecimiento le permite a *Trichoderma* establecerse de manera eficiente en diferentes sustratos y consumir nitrógeno, carbohidratos y otros microelementos, haciéndolos no biodisponibles para otros organismos (Infante et al., 2009).

Los sideróforos son otro de los metabolitos caracterizados en muchas especies de bacterias, plantas y hongos (Aguado-Santacruz et al., 2012; Ahmed and Holmström, 2014; Vellasamy et al., 2015); estos son moléculas de bajo peso molecular que son secretadas al ambiente y que actúan de manera específica como agentes quelantes de Fe^{3+} y así reducirlo a Fe^{2+} (Aguado-Santacruz et al., 2012; Anke et al., 1991). En el caso de los sideróforos de *Trichoderma*, estos son secretados en el ambiente en altas concentraciones para quelar de manera más rápida el metal y de esta manera privar a otros organismos de este micronutriente esencial (Vinale et al., 2013), por ejemplo, *Xanthomonas oryzae* necesita del Fe^{3+} para poder infectar a su huésped (Vellasamy et al., 2015), por lo que la privación de este elemento en la rizosfera de las plantas reduce drásticamente la prevalencia de la enfermedad. Así mismo se sabe que la privación de hierro en el ambiente tiene efectos en diferentes procesos enzimáticos, en el metabolismo de oxígeno, transferencia de electrones, biosíntesis de ácidos nucleicos y el crecimiento polarizado de diferentes hongos (Ahmed and Holmström, 2014; Vinale et al., 2013).

2.5.3 Fungistasis y tolerancia a compuestos tóxicos.

El término fungistasis fue acuñado en 1953 para describir el fenómeno por el que las conidias de los hongos fallan al germinar en el suelo (Emmatty and Green Jr, 1967). Este es un fenómeno propiciado por la presencia de moléculas estresantes para el hongo producto del metabolismo de hongos, bacterias y plantas, o por efecto de la aplicación de fertilizantes y otros productos químicos en el suelo como parte de las prácticas agrícolas (de Boer et al., 2003; Emmatty and Green Jr, 1967). Además de ello, se sabe que la presencia de iones metálicos es un componente importante para que ocurra la fungistasis, ya que influyen en el crecimiento, esporulación y actividades enzimáticas.

Otra definición indica que la fungistasis es el mecanismo por el cual hongos son capaces de desarrollarse en medios agresivos y extremos, producto de la presencia de metabolitos secretados por otros organismos (hongos, bacterias, plantas) (Benítez et al., 2004). En el caso de *Trichoderma*, estos crecen y se establecen de manera eficiente en suelo agrícola porque toleran de manera natural a muchos compuestos tóxicos como herbicidas, fungicidas y pesticidas (Benítez et al., 2004). Se cree que la resistencia a compuestos tan agresivos como DDT y fenoles están asociados a la presencia de sistemas de transporte ABC (Benítez et al., 2004), lo que permite la translocación de los compuestos a la parte interna de la membrana para después secretarla al medio en vesículas (Roier et al., 2016).

2.5.4 Micoparasitismo

El comportamiento micoparásito de *Trichoderma* es una característica que combina diferentes procesos celulares como la competencia por nutrientes, la secreción de metabolitos antifúngicos, el cambio morfológico de las hifas al enrollarse alrededor del huésped y la formación y desarrollo de estructuras tipo apresorios (Zeilinger and Omann, 2007). El micoparasitismo comprende la penetración de la pared celular del hongo huésped para el aprovechamiento del contenido celular: agua, solutos inorgánicos, carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos y nucleósidos (Ben Amira et al., 2018; Benítez et al., 2004; Harman et al., 2012; Zeilinger and Omann, 2007). Antes del contacto directo, *Trichoderma* censa la presencia del huésped a través del reconocimiento de moléculas del

huésped que actúan como ligando de receptores acoplados a proteínas G. Este sufre un cambio conformacional que permite la activación de las vías de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía del Adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Benítez et al., 2004; Zeilinger and Omann, 2007). Estas vías de señalización hacen que se de en primera instancia un cambio morfológico al formar estructuras de enrollamiento y la formación del apresorio que es donde se liberaran la mayor parte de las enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas, endoglucanasas) y peptaiboles. Tras enrollarse y formar el apresorio, este se adhiere a los carbohidratos de lectinas del huésped facilitando a la hifa de *Trichoderma* ingresar al lumen de la hifa parasitada (Harman et al., 2012; Zeilinger and Omann, 2007). Actualmente este comportamiento es utilizado por las formulaciones comerciales para el control de diferentes fitopatógenos: *R. solani*, *B. cinerea*, *S. rolfisii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., y *Fusarium* spp (Zeilinger and Omann, 2007).

2.5.5 Inducción de sistemas de defensa en las plantas

La inducción de sistemas de defensa en las plantas es consecuencia de interacciones directas e indirectas entre las moléculas elicitoras de *Trichoderma*, lo que promueve la activación de vías de señalización que conllevan a cambios fisiológicos y químicos en las células vegetales a mediano o largo plazo (Choudhary et al., 2007; Nawrocka and Małolepsza, 2013; Pieterse et al., 2014), induciendo la tolerancia o resistencia al ataque de patógenos y parásitos. De esta manera puede reducir la dispersión de los fitopatógenos y la incidencia de la enfermedad (Nawrocka and Małolepsza, 2013).

A través de la secreción de moléculas elicitoras, estas pueden efectuar respuestas de resistencia sistémica inducida (ISR) y resistencia sistémica adquirida (SAR). La diferencia entre una y otra es que la ISR es un estado de resistencia latente en las células de toda la planta causada por la inducción local por los metabolitos benéficos mientras que la SAR es causada por la inducción por microorganismos avirulentos o virulentos (Pieterse et al., 2014). Los elicitores son reconocidos a través de receptores ionotrópicos que resulta en una despolarización en la membrana y que incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno

(ROS), disminuye el pH en la célula vegetal, producto de la entrada de iones de calcio. Estos actúan como segundos mensajeros en vías de señalización involucrados en la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios como lo son el ácido jasmónico, etileno (ISR) y ácido salicílico, así como proteínas relacionadas a patogénesis (SAR) (Choudhary et al., 2007; Pieterse et al., 2014; Shentu et al., 2013).

Tabla 2. Elictores identificados en cepas de *Trichoderma*. Se indican algunos elicitors así como la cepa de la que se identificó su función.

Molécula elicitora	Cepa de <i>Trichoderma</i>	Cita
Proteínas ricas en dominios de cisteínas	<i>T. virens, T. atroviride</i>	(Seidl et al., 2006)
Hidrofobinas	<i>T. asperellum</i>	(Viterbo and Chet, 2006)
Xilanasas	<i>T. viride</i>	(Rotblat et al., 2002)
Proteasas	<i>T. asperellum</i>	(Viterbo et al., 2004)
Indol-3-Carboxialdehido	<i>T. virens, T. atroviride</i>	(Lehmann et al., 2010)
Pared celular de hongos	<i>T. harzianum</i>	(Sriram et al., 2009)
Glicosfingolipidos	<i>T. viride</i>	(UCHIYAMA et al., 2009)
Harzianolido	<i>T. harzianum</i>	(Cai et al., 2013)

2.6 Biología, ecología y sistemática del género *Trichoderma*

Pearson fue el primero en describir a este hongo saprofito como género basado en material biológico colectado en Alemania. En este primer análisis se describieron 4 especies (Samuels, 2006). A partir de ese estudio, múltiples avances se han realizado para poder discernir entre especies de *Trichoderma* distintas (Druzhinina et al., 2012, 2004; Kullnig-Gradinger et al., 2002; Samuels, 2006). La identificación con base en claves taxonómicas es complicada debido a que los caracteres morfológicos de este género son poco variables, lo que a menudo conllevan a un traslape de especies (Samuels, 2006). Desde inicios del siglo XXI se ha comenzado con la implementación de herramientas moleculares para aumentar el catálogo de especies de *Trichoderma*, en 2001 se llevó a cabo uno de los primeros experimentos en discernir diferentes especies de *Trichoderma* que tradicionalmente se habían clasificado como "*T. harzianum*" (Kullnig et al., 2001): comparando tres marcadores moleculares (ADNr, SSUmtADNr, *ech42*) entre 8 aislados distintos agrupados tradicionalmente como *T. harzianum*, se logró la separación en tres especies distintas (*T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. asperellum*), así mismo en otro trabajo se discernieron especies clasificadas como "*T. harzianum*" en cuatro especies distintas (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*) (Hermosa et al., 2000). Actualmente, y de acuerdo a la International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH <http://www.isth.info/>), se tienen presentes 256 especies de *Trichoderma* divididas en 5 secciones: La sección *Pachybasium* con 5 clados (*Harzianum*, *Virens*, *Semiorbis*, *Strictipilis*, *Stromaticum* y *Pachybasioides*), la sección *Longibrachiatum* con un clado (*Longibrachiatum*), la sección *Trichoderma* con dos clados (*Hamatum*, *Viride*), la sección *Hypocreamun* con cinco clados (*Ceramica*, *Chrolospora*, *Psychrophyla*, *Megalocitrina* y *Citrina*), la sección *Lutea* con un clado (*Lutea*) y linajes solitarios (8 especies).

Trichoderma es un hongo filamentoso de importancia biotecnológica por su alta capacidad secretora de enzimas (Druzhinina et al., 2006; Samuels, 1996). Es

considerado como un hongo micotrófico, saprofito avirulento cosmopolita, aunque es principalmente encontrado en suelo, madera en descomposición, como micopárasito en otros hongos, materiales de construcción y en animales (Druzhinina et al., 2012; Samuels, 2006, 1996). Las especies de *Trichoderma* presentan un crecimiento rápido, con conidióforos ramificados (Samuels, 1996). Se han reportado cepas de *Trichoderma* con una coloración en sus ascosporas verde-amarillentas, así como cepas con ascosporas hialinas (Samuels, 1996). Aunque como se mencionó anteriormente, *Trichoderma* se considera un género cosmopolita, sin embargo se han identificado algunas especies con una preferencia a establecerse en sitios fríos, como *T. polysporum* y *T. minutisporum* (Samuels, 2006).

2.7 Problemas del control biológico con *Trichoderma*

Sin embargo, la principal problemática que representa esta estrategia de control biológico, es la que involucra la incorporación de las sustancias en sitios ajenos a donde proviene la cepa de *Trichoderma*, lo que hace que estas formulaciones tengan una aplicación regional y por lo tanto, sin tener un efecto real en la producción total de un cultivo (Srivastava et al., 2016). Además, se han reportado casos en los que el agente de control biológico no es compatible con el ecosistema en el que se quiere aplicar el sistema y termina por no establecerse la cepa de *Trichoderma*, por lo que como una de las premisas del control biológico es el utilizar organismos nativos de un sitio (Altieri, 1999; García-Nuñez et al., 2012; Rabeendran et al., 2006).

Las afectaciones en la microbiota por parte de *Trichoderma* ya han sido reportadas previamente, por ejemplo en suelos donde se han aplicado múltiples estrategias de control biológico con diferentes cepas de *Trichoderma* sin un manejo integral de plagas, han afectado severamente la micobiota de suelos de bosques de coníferas en comparación con suelos vírgenes (Yakimenko and Grodnitskaya, 2000). Así mismo también las cepas de *Trichoderma* son capaces de afectar el desarrollo y proliferación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Green et al., 1999). Experimentos *in vitro* han demostrado

que *Trichoderma* son capaces de inhibir la colonización radicular del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* (McAllister et al., 1994), sin embargo también se han presentado estudios contradictorios respecto al establecimiento de micorrizas (Burla et al., 1996; Green et al., 1999).

Por otro lado, se han reportado casos de contaminación en hongos de importancia económica debido a la mal aplicación de inóculos para el control de hongos fitopatógenos, como cultivos de *Agaricus bisporus*, *Agaricus* sp. *Pleurotus* sp. y *Lentinula* sp. (Colavolpe et al., 2014; Kosanović et al., 2013; Kredics et al., 2010) por lo que el uso de *Trichoderma* debe ser estandarizado correctamente para evitar efectos económicos a productores.

2.8 Filtrados de *Trichoderma*

Para contrarrestar la problemática anterior, se ha comenzado a comercializar los ingredientes activos de los biofungicidas, que se considera que son las moléculas o metabolitos secundarios, los cuales, tras la aplicación en sistemas *in vitro* han demostrado tener la misma efectividad en el control de fitopatógenos que biofungicidas con base en células, y fungicidas químicos comerciales (Jayaraj et al., 2008; Soliman-Derbalah et al., 2012).

Un ejemplo de esto es el que se realiza por Jayaraman y colaboradores en 2011, en el que aplican filtrados de *Ascophyllum nodosum* para prevenir la infección de hongos fitopatógenos en plantas de *A. thaliana* (Jayaraman et al., 2011). En este caso, se demostró que la capacidad antagónica de los filtrados se conserva aún sin la presencia de células, además de que es capaz de inhibir el desarrollo de la enfermedad a concentraciones muy bajas y en niveles muy similares a los fungicidas comerciales.

Debido a esto, se ha comenzado a implementar el control biológico a través de la aplicación de los metabolitos secundarios secretados por *Trichoderma* o biofungicidas (García et al., 2014; Mukesh et al., 2015). Estas formulaciones se pueden aplicar para el control biológico de plagas a través de la aplicación directa de esporas directamente sobre las plantas (Knudsen et al., 1991), o con filtrados o

purificados que se implementan tratando a las semillas, como una cubierta, tratamiento radicular, tratamiento foliar y tratamiento en el suelo directamente (Mukesh et al., 2015), por ejemplo, se observó que la aplicación de filtrados de *T. koningiopsis* y *T. harzianum* inhibe hasta en un 50% la presencia de *Alternaria tenuis* en chille (Begum et al., 2010).

La aplicación de estas formulaciones tienen la misma ventajas que la aplicación directa del organismo, como la inducción de elicitores, promoción del crecimiento vegetal y la misma efectividad que los fungicidas comerciales (Mukesh et al., 2015), además de ser libre de células.

Inclusive estos metabolitos funcionan en concentraciones muy bajas, por ejemplo, metabolitos de *Ascophyllum nodosum* pueden inhibir a *Alternaria cucumerinum*, *Didymella applanata*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* con la misma efectividad que Chlorothalonil (Jayaraman et al., 2011); en otro estudio, Mutawila y colaboradores estudiaron el efecto del metabolito 6-pentil-pirona sobre diferentes hongos fitopatógenos de uva, inclusive erradicando totalmente a algunos en estudios *in vitro* (Mutawila et al., 2016a). Se evaluaron los filtrados de otro hongo que comparte ciertas características con *Trichoderma*, *Phoma sp.*, sobre *Arabidopsis thaliana*, y en el que observaron que el filtrado crudo inhibe el desarrollo de bacterias fitopatógenos y por lo tanto la presencia de enfermedad (Sultana et al., 2009).

Además de inhibir el desarrollo o retardar el crecimiento del micelio de fitopatógenos, se ha observado que moléculas filtradas o extractos de cepas de *Trichoderma* pueden inhibir la germinación de esporas o inclusive matarlas, tal y como lo observó Nguyen Thi y colaboradores en 2012, utilizando filtrados de un cultivo líquido de una cepa de *Trichoderma* nativa capaz de inhibir la germinación de esporas de *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum orbiculare* y *Fusarium oxysporum*.

3. JUSTIFICACIÓN

La protección de cultivos agrícolas de enfermedades causadas por hongos, así como la conservación de los alimentos post-cosecha en la región del Bajío, se lleva a cabo utilizando productos químicos que son potencialmente perjudiciales contra la salud humana y el medio ambiente. Debido a ello, es necesario contar con alternativas de control que sean más seguras y amigables con el medio ambiente. El control biológico utilizando algunos tipos de hongos, representa una alternativa potencial a este tipo de problemáticas. Los hongos del género *Trichoderma* poseen la capacidad de antagonizar el desarrollo de diferentes tipos de fitopatógenos, por lo que contar con una colección de cepas de *Trichoderma* endémicas del estado de Querétaro puede impulsar el desarrollo de biofungicidas que representen nuevas estrategias de control biológico pre y post-cosecha.

4. HIPÓTESIS

Las cepas nativas de *Trichoderma spp.* del estado de Querétaro y sus filtrados inhiben y previenen el desarrollo *in vitro* de los hongos fitopatógenos *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto biofungicida de especies de *Trichoderma spp.* nativas del estado de Querétaro sobre hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

5.2 Específicos

Identificar a nivel de especie las cepas de *Trichoderma spp.* nativas del estado de Querétaro

Seleccionar cepas de *Trichoderma spp.* con mayor potencial antagónico *in vitro* contra *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*.

Determinar la actividad biológica de los filtrados *in vitro* en el desarrollo de hongos fitopatógenos.

Analizar el perfil metabólico de los filtrados de las cepas con mayor actividad antagónica.

6. METODOLOGÍA

6.1 Toma de muestras de suelo.

Se localizaron cultivos de plantas de importancia agrícola. Las parcelas localizadas se dividieron en tres secciones: dos secciones de orilla y una sección media de la parcela, que es donde se tomó una muestra de manera aleatoria de aproximadamente 100g de suelo asociado a la rizosfera (Körmöczsi et al., 2013). Para ello, se escavó a una profundidad de entre 5-10 cm en una parte aledaña a la planta; las muestras se colocaron en bolsas de plástico selladas herméticamente y bien rotuladas las cuales se transportaron 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. A partir de las muestras de suelo colectadas, se aislaron cepas de *Trichoderma spp.*

6.2 Aislamiento de cepas de *Trichoderma spp.*

En condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, se tomaron 10 g de suelo de las muestras y se disolvieron en 100ml de agua destilada estéril. Después se realizó una dilución seriada con base 10. De la dilución 10^{-3} y 10^{-4} se tomó 1ml de solución y se inoculó por extendido en placa en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) suplementado con Tritón X-100 al 0.5% y cloranfenicol 34 µg/ml. Las placas de medio de cultivo se incubaron a 28°C en iluminación constante por 7 días. Posterior a los 14 días, y con base en las características morfológicas típicas del género *Trichoderma*, con un asa metálica estéril, se transfirió micelio de cepas de *Trichoderma* en cajas Petri con medio PDA. A través

de cultivos monospóricos, se aislaron las cepas de *Trichoderma spp* y se obtuvieron cultivos axénicos.

6.3 Generación de una colección de cepas de *Trichoderma*.

Los cultivos axénicos de las cepas de *Trichoderma spp.* aisladas, se cultivaron en cajas petri de 60x15mm con medio de cultivo PDA; para esto, un disco de micelio de 5mm de diámetro se inoculó en el medio de cultivo. Estos cultivos se incubaron a 28°C con iluminación constante por 10 días, esto para obtener una gran cantidad de esporas de las cepas. Una vez transcurridos los 10 días, las esporas se colectaron mediante arrastre con agua destilada, y fueron congeladas en una solución de glicerol al 25% a -20°C.

6.4 Extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares

En cajas Petri con medio de cultivo PDA, se colocó una membrana semipermeable de papel celofán, posteriormente, se procedió a inocular un disco de micelio de cada aislado de *Trichoderma*, y en condiciones de oscuridad, se incubaron los cultivos a 28°C por 2 o 3 días o hasta la formación de un disco de micelio mayor o igual a 6 cm de diámetro. Después se procedió a colectar el micelio mediante una espátula, se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó en un mortero con pistilo hasta la formación de un polvo fino para extraer el ADN genómico. Posteriormente se agregó una solución de buffer de urea, se mezcló en vortex por 2 minutos y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó por 1 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo de plástico estéril al que se le aplicó una extracción con un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Después el tubo se centrifugó por 2 minutos para que posteriormente se recupere el sobrenadante, al que se le agregó un volumen de isopropanol. Después de agitar suavemente el tubo, éste se centrifugó por 5 minutos hasta formar una pastilla de ácidos nucleicos. La pastilla de ADN se lavó con etanol frío al 70% y se secó por 15 minutos. La pastilla se resuspendió en 100 µl de buffer TE y se almacenó a -20°C.

Así mismo, un protocolo adicional se empleó para extraer ADN genómico a gran escala con algunas modificaciones: -En este protocolo una pequeña muestra de biomasa (300 mg) se trató por 45 segundos en 250 µl de buffer de extracción (3% SDS, 0.5 mM EDTA monobásico, 1 mM de NaCl, 0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0); posteriormente se le agregó a la mezcla 250 µl de fenol-cloroformo (1/1) y se incubó a 65°C por 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 11,000 g a 4°C por 5 minutos. 300 µl de sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó un volumen de isopropanol absoluto frío. La mezcla se agitó y se incubó a -20°C por 30 minutos para precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla se centrifugó a 11,000 g por 6 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en 100 µl de buffer TE y se trató con RNAsa por 30 minutos a 37°C. Posteriormente la extracción se almacenó a -20°C (Vazquez-Angulo et al., 2012).

Las muestras de ADN se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%, suplementado con bromuro de etidio, además se determinó la concentración de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro (Nanodrop™ 2000/2000c, ThermoFisher Scientific). Las muestras de ADN posteriormente se diluyeron a una concentración de 100ng/µl, y se utilizaron para las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron conforme las indicaciones que indica el proveedor de la enzima DreamTaq DNA polimerase Thermo Scientific®. Se amplificaron dos marcadores moleculares: el gen ribosomal 5.8S y un fragmento del gen *tef-1α*; para ello se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (Druzhinina et al., 2004; Jaklitsch and Voglmayr, 2015), EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC- 3') (Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Nagy et al., 2007). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µl a las siguientes condiciones: un paso inicial de 3 min a 95 °C y subsecuentes 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58°C para el gen ribosomal 5.8S y 59°C para el gen *tef-1α*, 1.5 min a 72°C y un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio y los amplicones obtenidos se

purificaron por columnas QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), según las indicaciones del proveedor. Después de la purificación se procedió a la secuenciación de las reacciones de PCR en el del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

6.5 Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Chromas 2.6.2 con el fin de eliminar los extremos de las secuencias y después exportarlas a formato Fasta. Las secuencias se compararon y se alinearon con secuencias de referencia de diferentes especies de *Trichoderma* obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 3). Una vez con las secuencias se procedió a concatenar las secuencias y a realizar la matriz con el software MEGA 7.0.26, así como agruparlas en clados con base en la última actualización de la International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH). La Matriz fue procesada para determinar la filogenia de las especies utilizando los software RaxML (Stamatakis et al., 2005) para el método de máxima verosimilitud, Mr. Bayes 3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) para el método de aproximación bayesiana y TNT 1.1 y PAUP 4.0a (Goloboff et al., 2008). Los datos generados se analizaron con el software Dendroscope 3.5.9 (Huson and Scornavacca, 2012).

Tabla 3. Lista de especies de *Trichoderma* con su correspondiente número de acceso utilizadas como referencia para los análisis filogenéticos.

Especie	Cepa o Colección	No. De acceso GenBank	
		ITS	<i>tef-1α</i>
<i>Trichoderma austrokoningii</i>	CTR 85-57	DQ315468	DQ307564
<i>Trichoderma andinense</i>	LESF541	KT278891	KT279037
<i>Trichoderma cerebriforme</i>	G.J.S. 85-245	NR_134447	KP109824
<i>Trichoderma reesie</i>	TUB F-733	AY857215	GQ354352
<i>Trichoderma novaezelandiae</i>	CBS 639.92	NR_111193	AF401012
<i>Trichoderma orientale</i>	S187	JQ685873	JQ685868
<i>Trichoderma patella</i>	G.J.S. 91-141	AF487663	KJ665630
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	DAOM 167678	E U280097	E U280037
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	DAOM 172792	NR_077178	KJ713208
<i>Trichoderma effusum</i>	DAOM 230007	DQ083008	AY937419
<i>Trichoderma ghanense</i>	GJS 08-208	JN133556	JN133573
<i>Trichoderma konilangbra</i>	GJS 96-147	DQ083021	AY937425
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	DAOM 166989	E U330961	E U338335
<i>Trichoderma sinense</i>	DAOM 230005	DQ083012	KJ713191
<i>Trichoderma capillare</i>	CTCCSJ-A-SD3940/GJS 06-66	KT314333	JN175585
<i>Trichoderma stromaticum</i>	GJS 97-181	AF097910	AY937447
<i>Trichoderma flaviconidium</i>	CBS 130688	DQ023301	DQ020001
<i>Trichoderma neorufa</i>	G.J.S. 87-72	AF487656	AF487671
<i>Trichoderma pezizoides</i>	CBS 115283	NR_138436	AY937438
<i>Trichoderma asperellum</i>	T-203	AF278789	KU301705
<i>Trichoderma hamatum</i>	DIS 321J	E U263998	AF534620
<i>Trichoderma pubescens</i>	DAOM 166162	DQ083016	AF534624
<i>Trichoderma theobromicola</i>	Dis 376f	E U856296	E U856322
<i>Trichoderma longipile</i>	DAOM 1772271a	E U280074	E U280051
<i>Trichoderma atrogelatinosum</i>	CBS 237.63	AF400751	KJ871087
<i>Hypocrea tawa</i>	DAOM 232841	AF400258	E U279972
<i>Trichoderma pleurotum</i>	CPK2117	E U280069	E U279975
<i>Trichoderma inhamatum</i>	CBS 273.78	FJ442680	AF348099
<i>Trichoderma cinnamomeum</i>	GJS 97-237	AY737759	AY737732
<i>Trichoderma lentiforme</i>	DIS 246K	FJ442617	FJ463353
<i>Trichoderma lentiforme</i>	T10	KY764369	KY764469
<i>Trichoderma cerinum</i>	35.24.06.1	KP009288	KP008913
<i>Trichoderma tomentosum</i>	DAOM 178713A	DQ085432	E U279969
<i>Trichoderma atobrunneum</i>	GJS 05-106	FJ442678	FJ463392
<i>Trichoderma guizhouense</i>	GJS 07-18	FJ442641	FJ463390
<i>Trichoderma harzianum</i>	DIS 218F	FJ442246	FJ463326
<i>Trichoderma harzianum</i>	GJS 05-116	AF443928	FJ463320
<i>Trichoderma velutinum</i>	DAOM 230014	DQ083010	AY937446
<i>Trichoderma pleuroticola</i>	CPK 2885	E U918141	E U918161
<i>Trichoderma catoptron</i>	GJS 02-76	AY737766	AY737726
<i>Trichoderma aggressivum</i>	CBS 689.94	FJ442606	FJ467645
<i>Trichoderma stramineum</i>	G.J.S. 02-84	AY737765	AY391999
<i>Trichoderma thailandicum</i>	GJS 97-61	AY737772	AY737748
<i>Trichoderma atroviride</i>	G.J.S. 95-113	AF456912	AF456883
<i>Trichoderma atroviride</i>	IMI206040/IMI359825	AF278795	AF456885
<i>Trichoderma koningii</i>	CBS979.70	AF359262	AY665703
<i>Trichoderma viride</i>	CPK1998	DQ677656	DQ672616
<i>Hypocrea stilbohypoxyli</i>	CPK1977	FJ860845	FJ860702
<i>Trichoderma dingleyae</i>	GJS 99-203	AY380899	AY376040
<i>Trichoderma intricatum</i>	GJS 97-88	NR_134343	AY376060
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DAOM 229982	E U280141	E U280028
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	DAOM 229982	E U280118	E U280028
<i>Trichoderma petersenii</i>	CBS 119051	NR_138442	KJ871197
<i>Trichoderma taiwanense</i>	GJS 95-93	DQ313141	DQ284973

6.6 Ensayos de antibiosis

Una vez identificadas las especies de las cepas aisladas, cada cepa se sometió a ensayos de antibiosis por metabolitos no volátiles difusibles en placa contra los estados asexuales de los fitopatógenos *C. gloesporoides*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii*. Para ello, en condiciones de esterilidad y 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. Sobre el papel celofán se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de las especie de *Trichoderma spp.* a evaluar. Los cultivos se incubaron por 30 horas a 28°C en iluminación constante. 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 del hongo fitopatógeno a evaluar. Los cultivos se incubaron a 28°C en iluminación constante. El ensayo control consistió en la inoculación del fitopatógeno en una placa de medio de cultivo que no haya tenido contacto alguno con una cepa de *Trichoderma*. El ensayo concluyó una vez que el micelio de los hongos fitopatógenos en el ensayo control estuviese lo más próximo a los bordes de la caja petri.

Para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento, se tomaran fotografías de cada colonia y se analizaran con el programa ImageJ 1.51j8 (<http://imagej.nih.gov/ij/>). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \left(\frac{1 - (D_2)}{D_1} \right)$$

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 metabolitos de *Trichoderma*.

6.7 Obtención de filtrados de las cepas de *Trichoderma* con mayor actividad antagónica

Una suspensión de 10^6 esporas/ml de las cepas de *Trichoderma* con un mayor efecto antagónico contra los hongos fitopatógenos, se inoculó en 250 ml de medio de cultivo PDB. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 28°C a 150 rpm durante 120 horas. Los filtrados se obtuvieron esterilizando los sobrenadantes de los cultivos previamente separados por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Para esto, se utilizaron filtros Millipore 0.45 μ m, con el objetivo de obtener filtrado estéril para realizar las pruebas de antagonismo con los hongos fitopatógenos indicados.

Siguiendo el protocolo anterior, se separó el micelio de las cepas más antagónicas a las 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación en medio PDB; el micelio colectado se colocó en un horno a 80°C para obtener el peso seco y el medio PDB se centrifugó como se indicó anteriormente. Posteriormente el medio PDB se filtró y se suplementó a medio de cultivo PDA en una concentración al 10% y se evaluó el crecimiento de *R. solani* para evaluar la presencia de metabolitos antifúngicos a distintos tiempos de desarrollo de *Trichoderma*.

6.8 Capacidad antagónica de los filtrados sobre los hongos fitopatógenos.

Las moléculas filtradas de las cepas más antagónicas se evaluaron *in vitro* para comprobar que los metabolitos secretados se seguían produciendo en medio líquido; para ello se inocularon los fitopatógenos en placas de agar PDA suplementados con el filtrado a una concentración del 10% y también colocando el filtrado directamente sobre el disco de micelio el fitopatógeno. Las placas se incubaron por 3 días a 28°C.

Para concentrar los metabolitos producidos por las cepas se procedieron a liofilizar los filtrados, sometiéndolos a un proceso de congelamiento rápido con nitrógeno líquido. Posterior a eso, se colocaron las muestras en un liofilizador (LABCONCO FreeZone 2.5 Liter -50°C[®]) que genera vacío para iniciar el proceso de sublimación. Los productos liofilizados se pulverizaron en un molino marca KRUPS modelo GX4100 y se almacenaron en tubos de 50ml nuevos y se mantuvieron a temperatura ambiente en un lugar seco hasta su posterior uso y

protegidos de la luz. Se determinó la masa total de los liofilizados pesando el tubo antes y después del almacenamiento de los liofilizados. El liofilizado se disolvió en agua grado HPLC estéril para generar una solución stock de 1mg/ml y de las que se realizaron diluciones para evaluar la actividad inhibitoria sobre el micelio de los fitopatógenos a diferentes concentraciones. Con los metabolitos liofilizados y concentrados se realizaron los ensayos de antagonismo como se mencionó anteriormente. Como control negativo se utilizó PDB sin inóculo de *Trichoderma*.

6.9 Ensayos de Inhibición de la germinación de esporas asexuales de los fitopatógenos.

Para observar si los filtrados son capaces de inhibir la germinación y desarrollo de los fitopatógenos, se inoculó 5 μ l de una suspensión de 10^2 esporas de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* en medio PDA sobre un portaobjetos. Posterior a que se secase la suspensión de esporas se colocó un volumen de los filtrados liofilizados sobre la gota de las esporas. Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a 28°C por 24 horas para observar si se presenta o no germinación de esporas. Los controles que se utilizaron fueron: esporas tratadas con agua destilada estéril y esporas tratadas con benomilo 50% PH (Funlate[®], Sifatec) a una concentración de 1 mg/ml, siguiendo la misma aproximación experimental para los filtrados de las cepas antagonicas.

6.10 Análisis de los metabolitos producidos por las cepas de *Trichoderma*

Se realizó una cromatografía de gases de los filtrados obtenidos de las cepas más antagonicas. Para esto se obtuvo 1 ml de filtrado fresco el cual se concentró mediante flujo de nitrógeno. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido previo a la cromatografía hasta su análisis. Para realizar la cromatografía las muestras se colocaron en viales y se derivatizaron por 24 horas con N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con trimetilclorosilano para realizar una reacción de sililación. La muestra posterior a la sililación se le añadió un volumen de metanol puro como solvente para después evaporar por rotación a 40°C a 120 rpm. Los residuos se resuspendieron en metanol para realizar la cromatografía, la

cual se realizó en el equipo Agilent 7890A/5975C GC-MS. Los cromatogramas obtenidos se analizaron en una base de datos para obtener las identidades de los compuestos obtenidos.

6.11 Análisis estadístico

Los experimentos de antibiosis por metabolitos no volátiles se realizaron por triplicado, se realizó un análisis de varianza para definir diferencias en el crecimiento de los fitopatógenos sobre los tratamientos, y un análisis post-hoc Tukey-HSD para comparación entre medias. Los datos no normales bajo un prueba Shapiro-Wilk y que mostraron una distribución heterocedástica se analizaron por una prueba Kruskal-Wallis y un análisis post-hoc con una prueba de Dunnet. Se utilizó una alpha de 0.95, por lo que se rechazó la hipótesis nula al tener un valor de $P \geq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de cepas de *Trichoderma*

Se realizaron 39 colectas de suelo asociado a plantas en diferentes municipios a lo largo del estado de Querétaro en diferentes ecosistemas de la región y diferentes tipos de suelo. La mayoría de las colectas de suelo se realizaron en la parte central del estado, que es la zona más productiva (SAGARPA and SFA, 2011) (Figura 1).

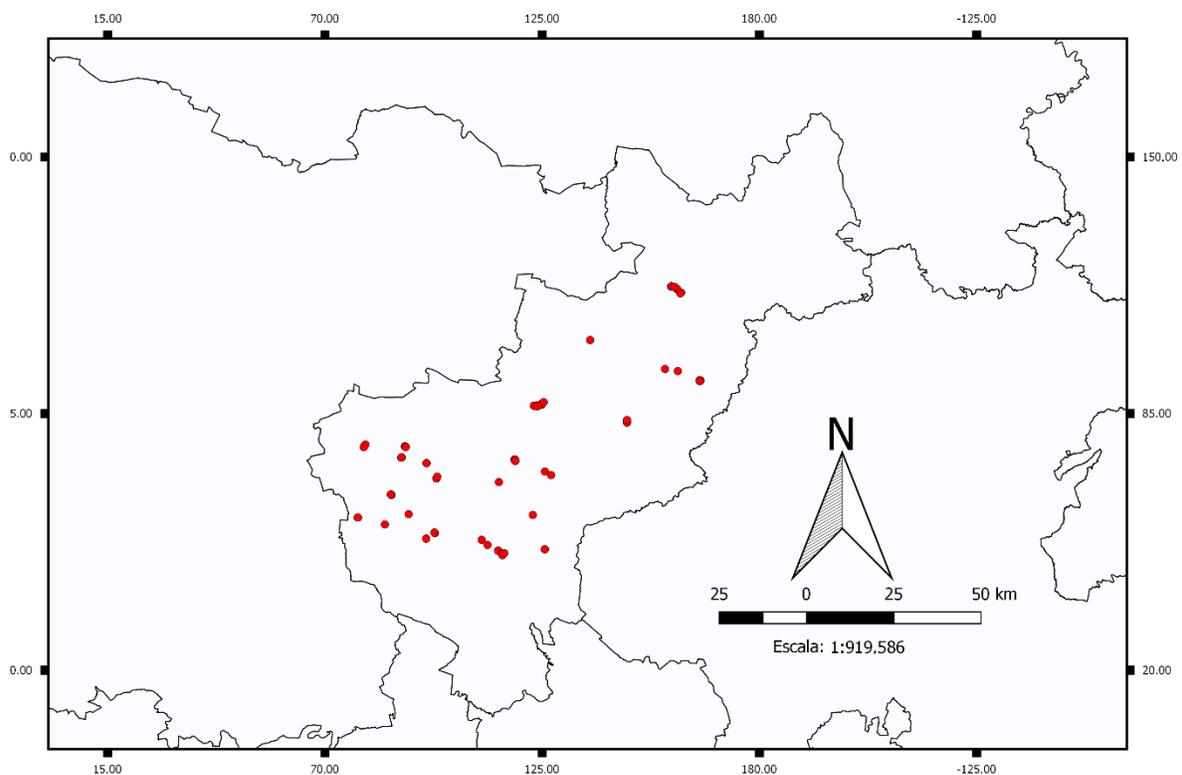


Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo. La colecta de suelo representa en total 39 colectas realizadas en diferentes municipios del estado.

Las muestras se procesaron en el laboratorio para obtener cultivos axénicos de *Trichoderma*. En total se obtuvieron 133 cepas de *Trichoderma* distribuidas alrededor de 14 municipios del estado de Querétaro; la mayor cantidad de cepas se aislaron de los municipios de Pinal de Amoles (23 cepas), Toliman (22 cepas) y Querétaro (19 cepas), adicionalmente se aislaron 18 cepas del municipio de San

Joaquín, 14 cepas de El Marqués, 9 cepas de Colón, 8 cepas de San Juan del Río, 6 cepas de Corregidora, 4 cepas de Huimilpan, 3 cepas de Tequisquiapan, 2 cepas de Cadereyta de Montes, Pedro Escobedo y Ezequiel Montes y 1 cepa de Peñamiller. Las cepas se estimularon para la esporulación a través de la exposición a luz continua por 2 horas. Las esporas se almacenaron en glicerol al 25% a -80°C a fin de obtener el cepario de *Trichoderma* en condiciones hasta su posterior uso.

7.2 Identificación de las cepas

Las cepas se crecieron en medio PDA y se procedió a realizar la extracción de ADN. Sin embargo, al ser una gran cantidad de cepas, se implementó el protocolo establecido por Vázquez-Angulo y colaboradores., (2012) con algunas modificaciones. Cuando las extracciones de ADN fueron de baja calidad, se utilizó el protocolo de extracción indicado en la metodología. Se comprobó que la extracción de ADN bajo los dos métodos es ideal para realizar reacciones de PCR de punto final, como indica la Figura 2 y como lo indica el protocolo (Vazquez-Angulo et al., 2012). Aun así se presentaron muestras de ADN que bajo el primer protocolo no fueron aptas para realizar biología molecular, debido a que no se tenía la concentración de ADN adecuada y/o la calidad necesaria (>1.8 relación 260/280), por lo que se procedió a utilizar el método tradicional.

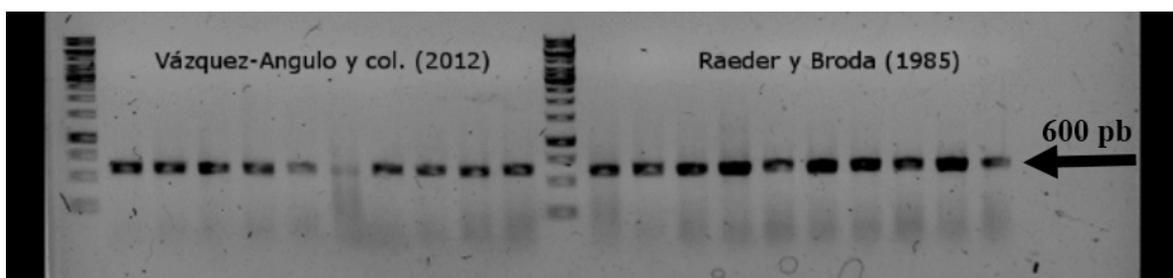


Figura 2. Productos de PCR utilizando dos protocolos de extracción de ADN. Reacciones de PCR utilizando ADN obtenido mediante dos estrategias: la primer sección representa reacciones

que utilizaron ADN obtenido por el protocolo de Vázquez-Angulo y colaboradores (2012) mientras que en la segunda sección se utilizaron muestras de ADN obtenidas con el protocolo de Raeder y Broda (1985). Las reacciones de PCR muestran un fragmento de aproximadamente 600 pb que corresponde a la región ITS-5.8ADNr-ITS (ITS1 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'). La escalera de peso molecular es de 1 Kb,

Una vez realizadas las extracciones de ADN de todas las cepas se procedio a realizar las reacciones de PCR amplificando los marcadores moleculares antes mencionados, para eso se estandarizaron los protocolos para obtener la temperatura de alineamiento de oligonucleotidos ideal para la amplificación de los marcadores moleculares. Los cebadores ITS1 e ITS4 amplificaron un fragmento de 600 pb a una temperatura de alineamiento de 58°C correspondiente al fragmento ITS1-5.8rADN-ITS2 (Figura 3A-B. Una vez estandarizado el protocolo se amplificaron los fragmentos en todas las cepas aisladas en este trabajo (Figura 3C).

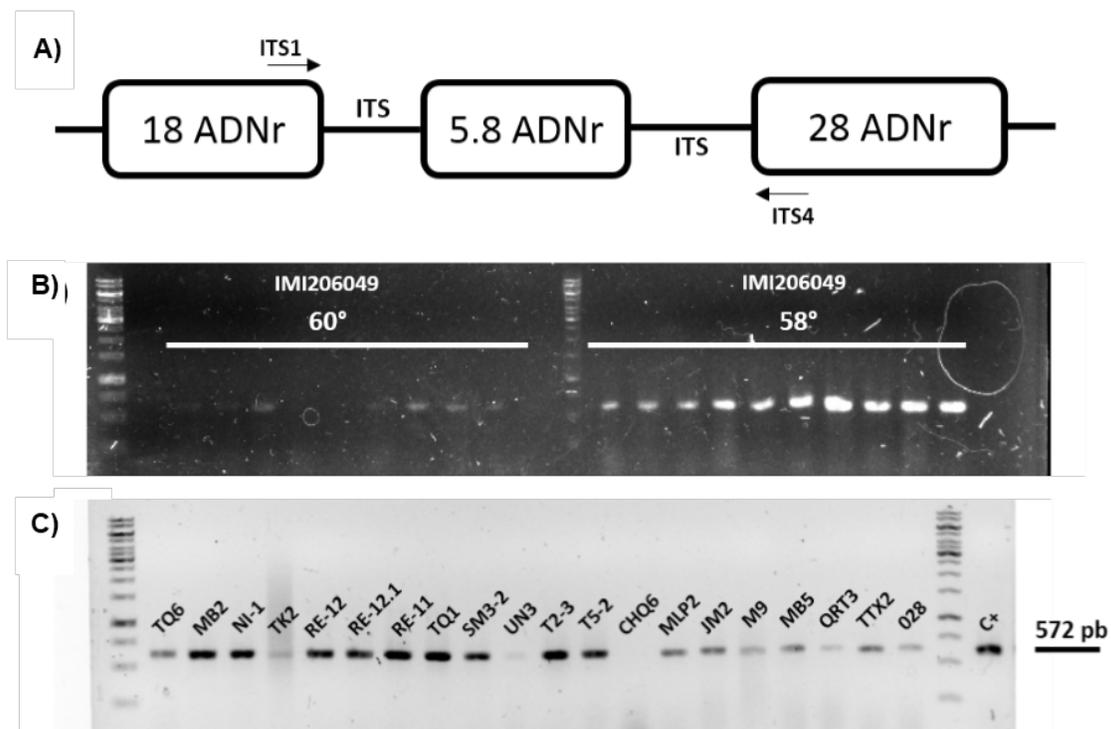


Figura 3. Amplificación del marcador ITS. A) Mapa genómico de la región ITS amplificada con su respectivo par de oligonucleótidos., B) Estandarización del protocolo de PCR punto final para la amplificación de la región ITS. La muestra de ADN se obtuvo de la cepa de *T. atroviride* IMI206040. La primera sección del gel corresponde a una temperatura de alineamiento de 60°

mientras que la segunda sección de 58°C., **C)** Amplificación del fragmento de la región ITS de las cepas aisladas durante el proyecto. Se observa la presencia de únicamente una banda de aproximadamente 600pb propia de la región. En el último carril se muestra la amplificación de la cepa de *T. atroviride* IMI206040 del laboratorio que sirvió como control positivo.

También se estandarizó el protocolo para la amplificación del intrón largo del gen del factor de elongación de la traducción 1 α (*tef-1 α*), que separa al exón 4 del exón 5 (Figura 4A). Se determinó que para los cebadores EF1-728f y EF1-986r la temperatura de alineamiento ideal es a 59°C (Figura 4B). Después de la estandarización del protocolo se amplificó el fragmento de aproximadamente 300pb de todas las cepas aisladas (Figura 4C).

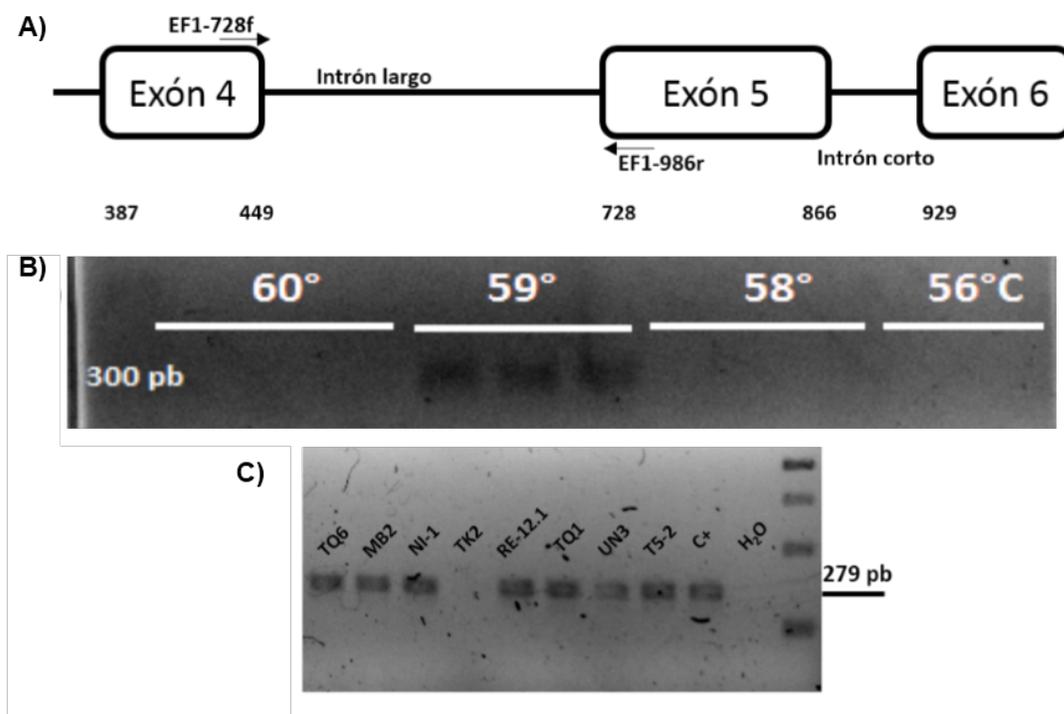


Figura 4. Amplificación del marcador *tef-1 α* . **A)** Mapa genómico del intrón largo, indicando el par de oligonucleótidos usados para amplificar el marcador *tef-1 α* . **B)** PCR punto final con gradiente de temperatura para amplificar *tef1 α* . La muestra de ADN corresponde *T. atroviride* IMI206040. **C)** Amplificación del fragmento de la región *tef1 α* de las cepas aisladas durante el proyecto. Se observa la presencia de una banda de aproximadamente 279 pb. El penúltimo carril indica la cepa IMI206040 que sirvió como control positivo, el último carril indica un control negativo H₂O.

Los amplicones de los diferentes aislados fueron secuenciados y se analizaron mediante el software Chromas 2.6.4v (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) para editar las secuencias; a partir de las secuencias editadas se realizaron los análisis filogenéticos correspondientes con los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y el Método Bayesiano (Figura 5 y Figura 6). Las 133 cepas de *Trichoderma* se agruparon dentro de 4 clados utilizando por separado ambos marcadores moleculares, los cuales corresponden al clado Hamatum, el clado Viride, el clado Longibrachiatum y el clado Harzianun (Figura 5 y Figura 6, Figura 7, Figura 9, Figura 11 y Figura 13). A pesar de la agrupación en diferentes clados, el árbol no muestra con claridad la separación entre especies, aunque la mayoría de las cepas se agruparon en el clado Viride.

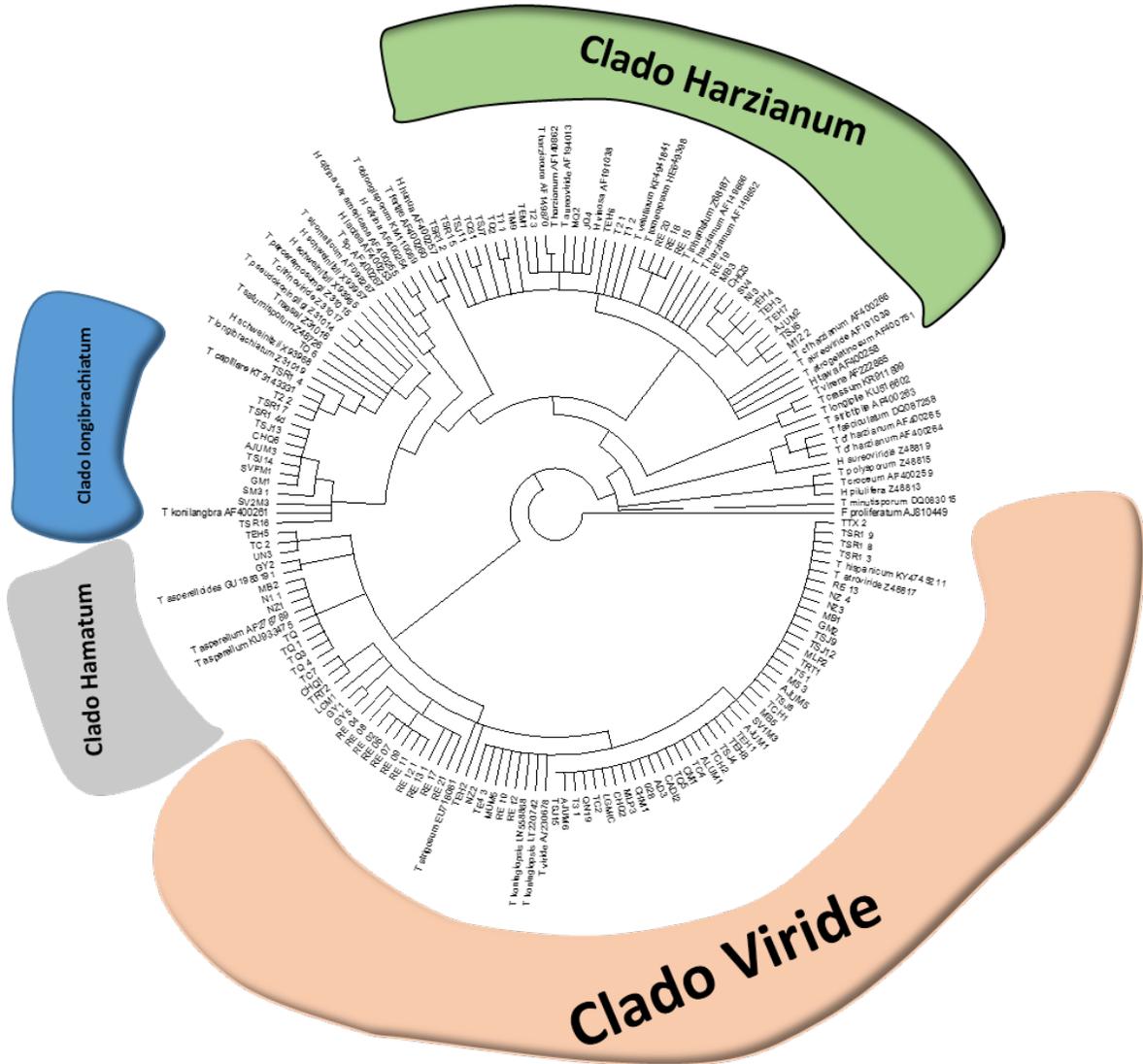


Figura 5. Árbol filogenético realizado con el marcador molecular ITS. Se realizó una búsqueda mediante la adición de secuencias de manera aleatoria en el software PAUP 4.0a. Se realizaron 1×10^6 replicas. La búsqueda fue de manera heurística a través del método de máxima parsimonia. Las cepas se agrupan en 4 clados del género *Trichoderma*, los cuales están indicados en la parte externa del cladograma.

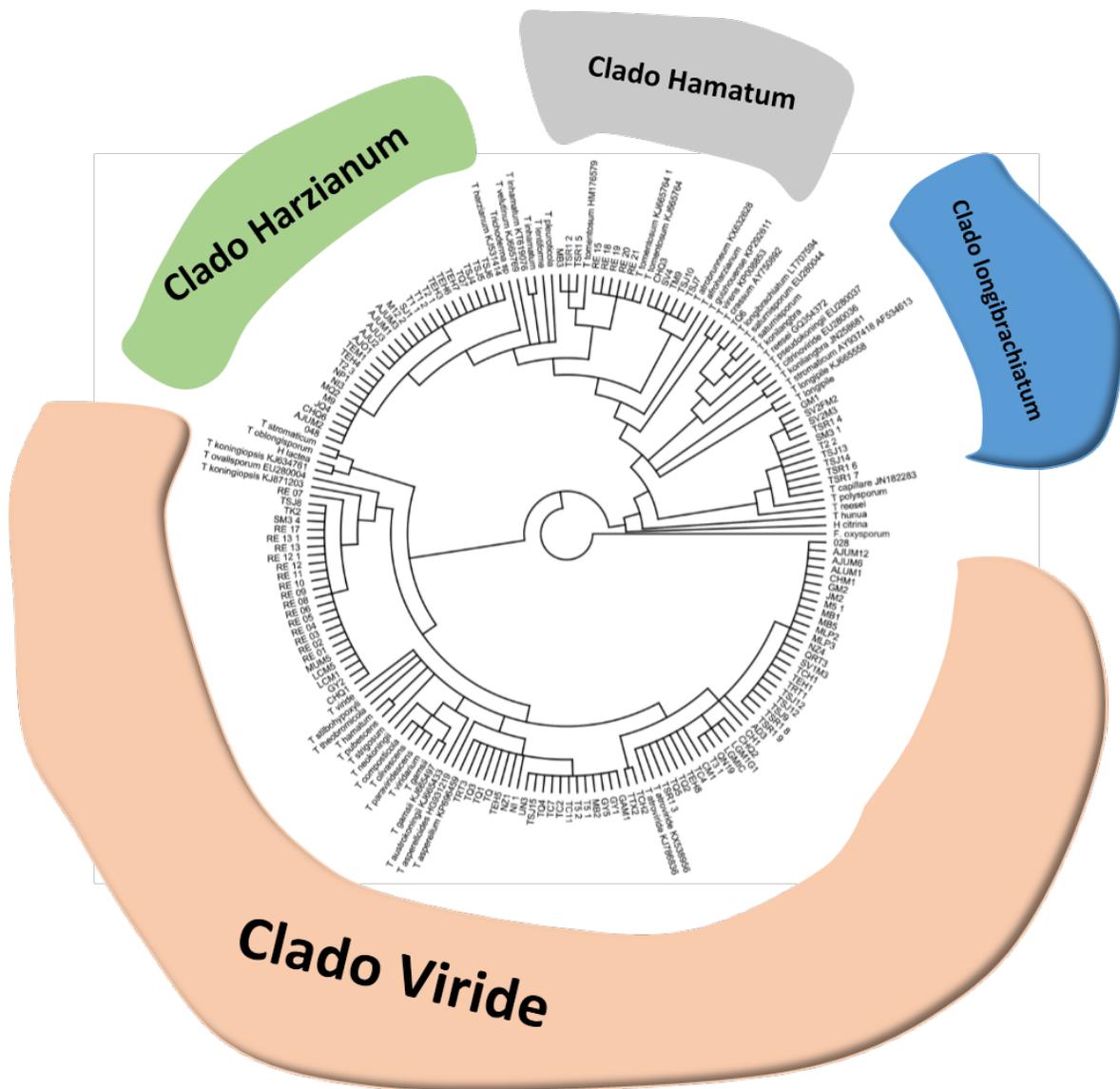


Figura 6. Árbol filogenético realizado con el marcador molecular *tef1a*. Se realizó una búsqueda mediante la adición de secuencias de manera aleatoria en el software PAUP 4.0a. Se realizaron 1×10^6 replicas. La búsqueda fue de manera heurística a través del método de máxima parsimonia. Las cepas se agrupan en 4 clados del género *Trichoderma*, los cuales son señalados, sin embargo, al ser un marcador molecular más preciso que el ITS, los clados son más definidos.

Se realizaron 4 análisis filogenéticos independientes utilizando las secuencias concatenadas correspondientes a los clados Hamatum (Figura 7, Figura 8), Viride (Figura 9, Figura 10), Longibrachiatum (Figura 11, Figura 12) y Harzianum (Figura 13, Figura 14), esto para incrementar la probabilidad de un emparejamiento correcto con las secuencias referencias, tal y como lo indica la literatura (Druzhinina et al., 2012; Gadagkar et al., 2005).

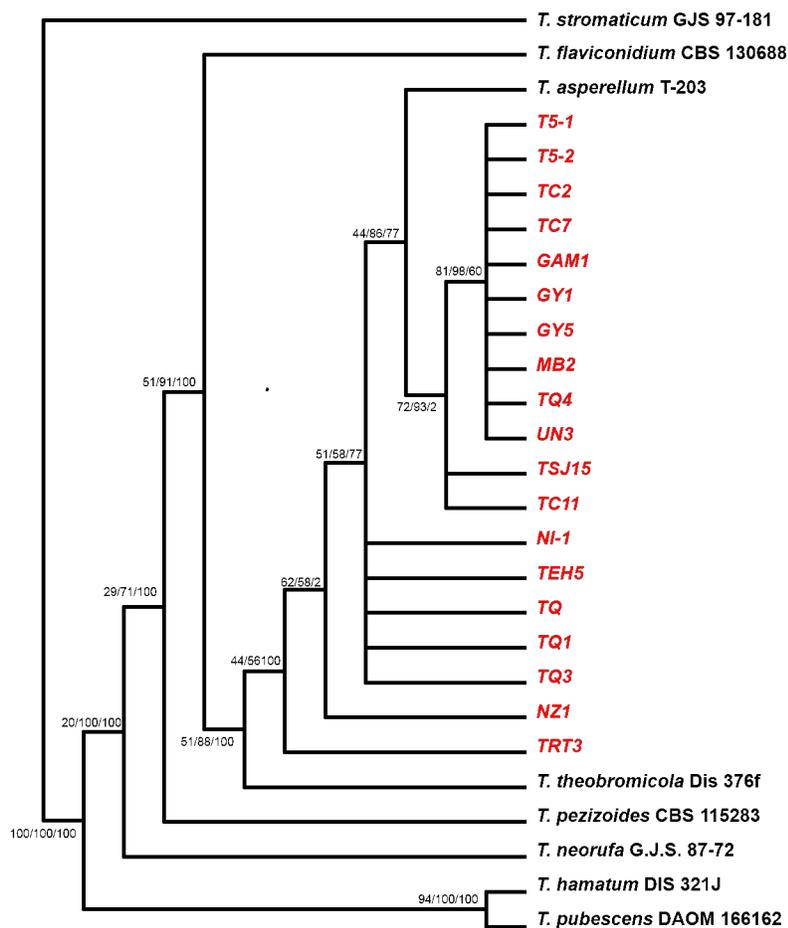


Figura 7. Cladograma del clado Hamatum. Las cepas aisladas en este proyecto se muestran en rojo. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla 3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud, aproximación bayesiana y máxima parsimonia, respectivamente, de los dos marcadores concatenados.

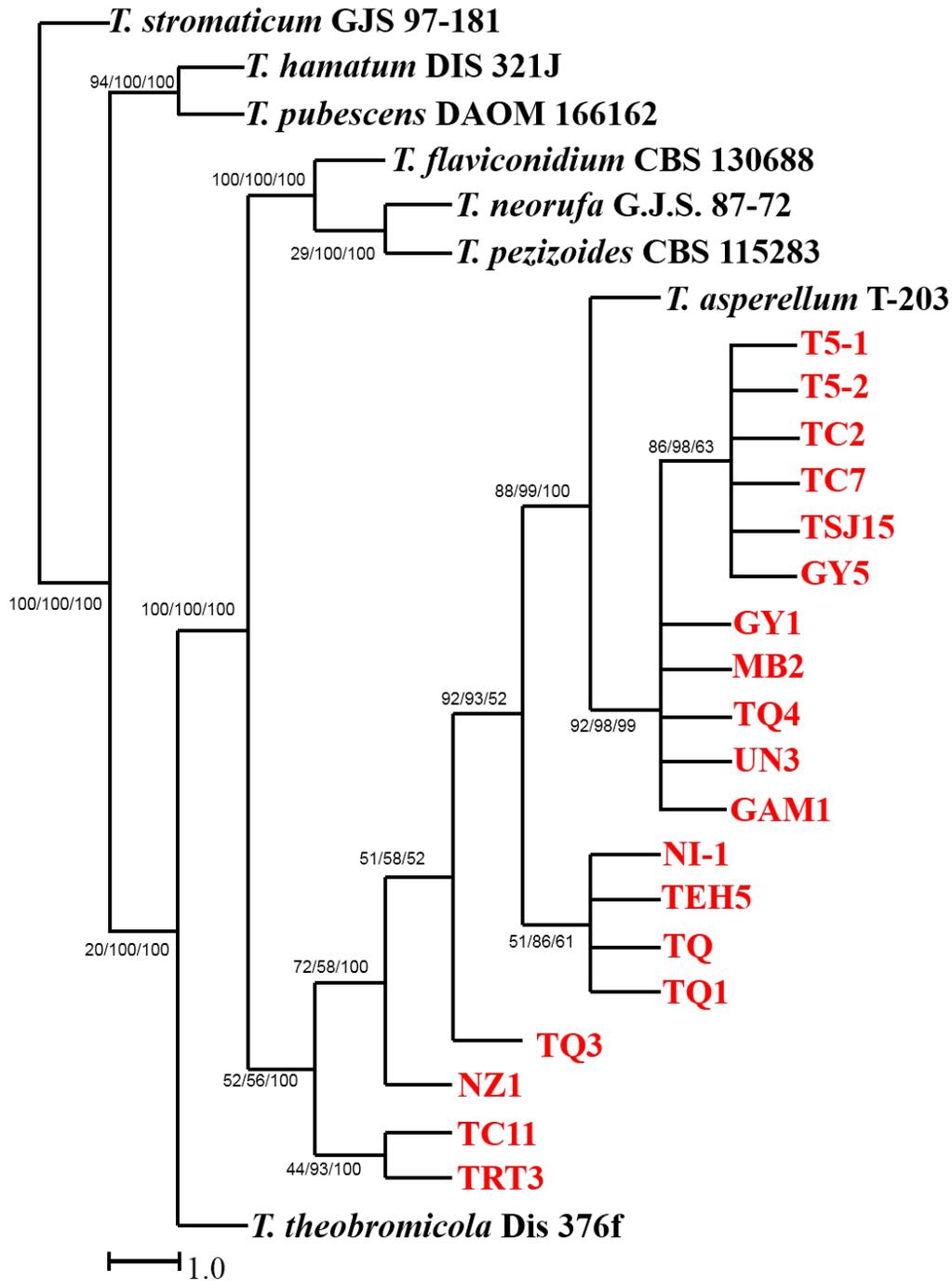


Figura 8. Filograma del clado Hamatum. Las cepas aisladas en este proyecto están indicadas en rojo. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud, aproximación bayesiana y máxima parsimonia respectivamente. La escala de divergencia se muestra al final del Filograma.

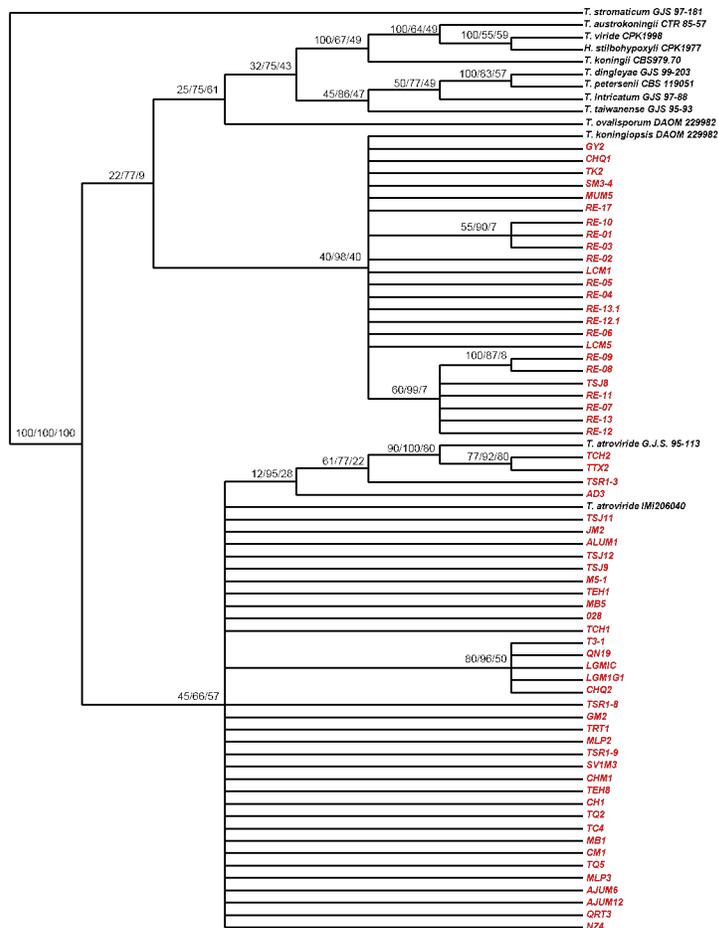


Figura 9. Cladograma del clado Viride. Las cepas aisladas en este proyecto están indicadas en rojo. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla 3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud, aproximación bayesiana y máxima parsimonia, respectivamente, de las secuencias concatenadas de los dos marcadores.

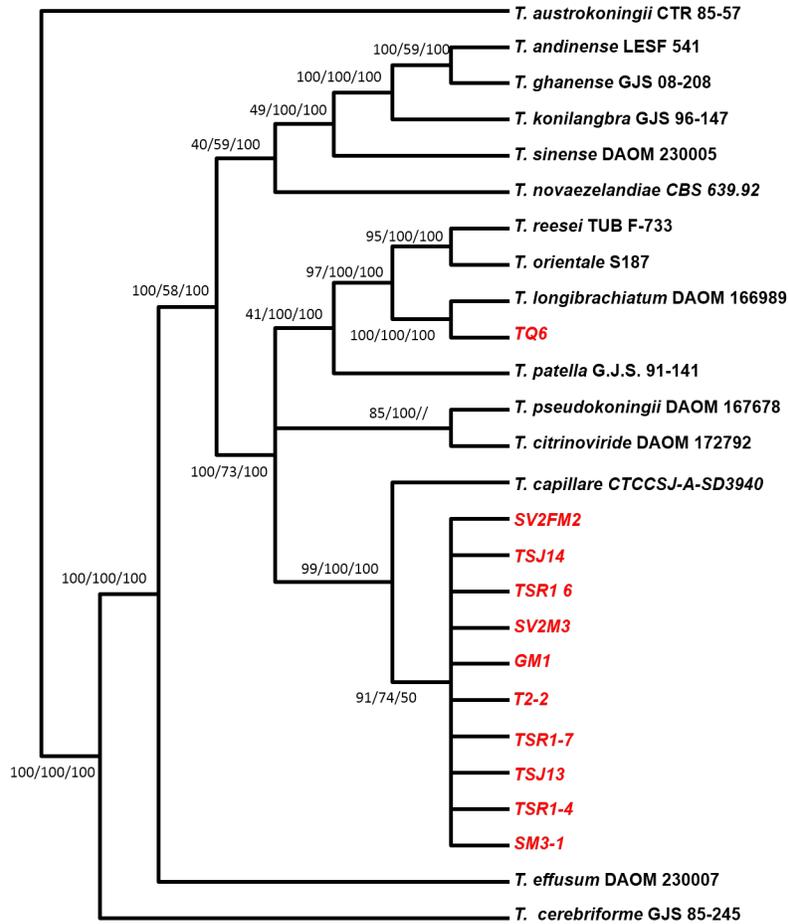


Figura 11. Cladograma del clado *Longibrachiatum*. Las cepas aisladas en este proyecto están representadas en rojo. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud, aproximación bayesiana y máxima parsimonia, respectivamente, usando las secuencias concatenadas de los dos marcadores.

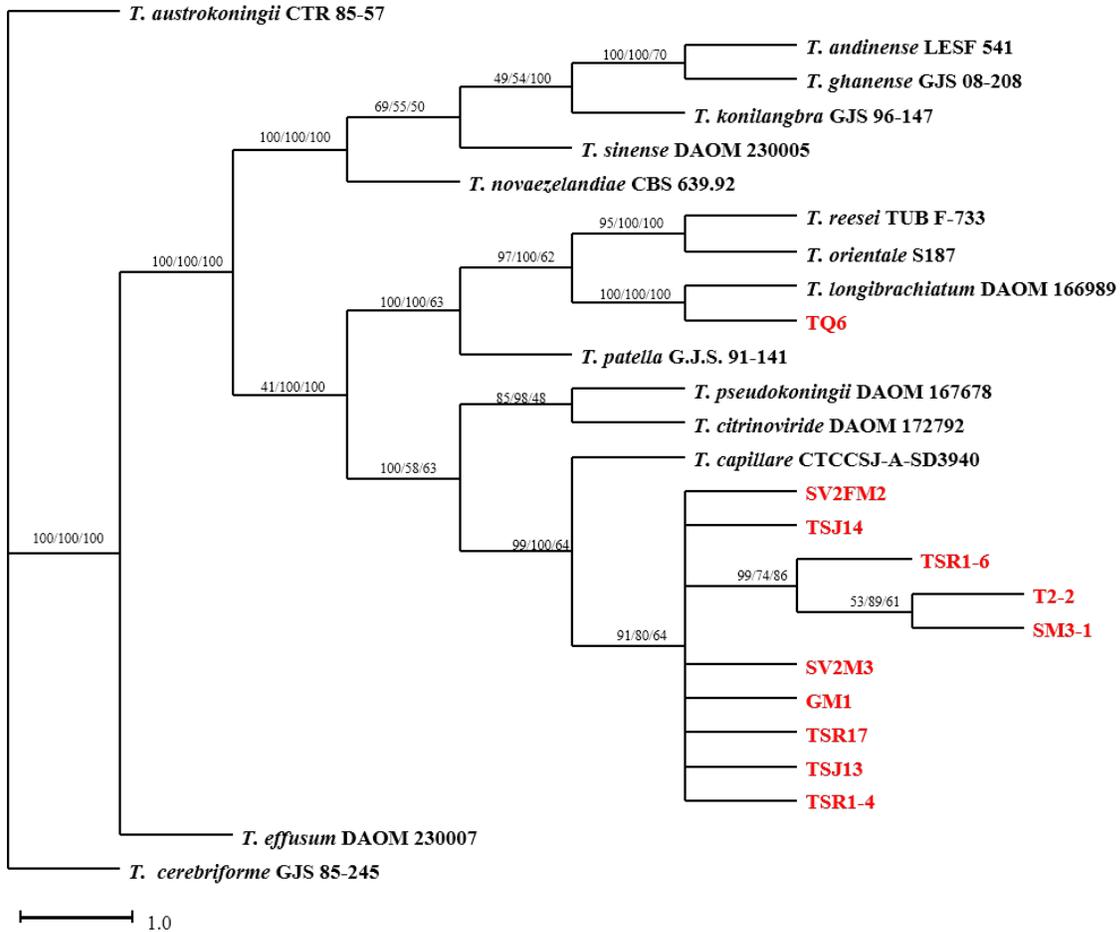


Figura 12. Filograma del clado *Longibrachiatum*. Las cepas aisladas en este proyecto están indicadas en rojo. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud, aproximación bayesiana y máxima parsimonia respectivamente. La escala de divergencia se muestra al final del Filograma

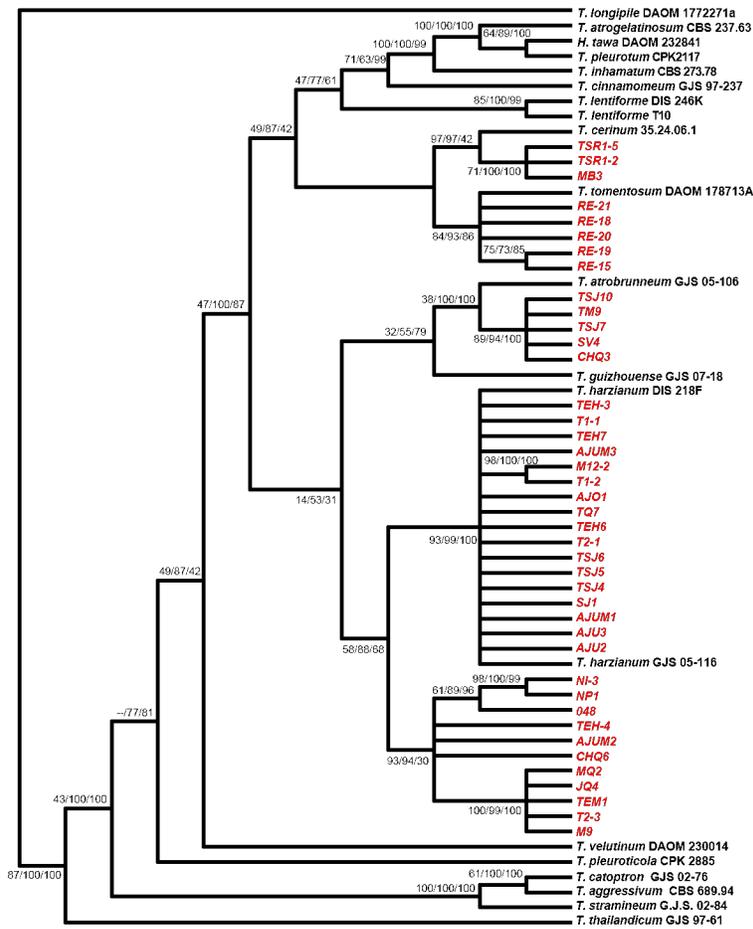


Figura 13. Cladograma del clado Harzianum. Las cepas en rojo se refieren a las cepas aisladas en este proyecto. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud, aproximación bayesiana y máxima parsimonia respectivamente.

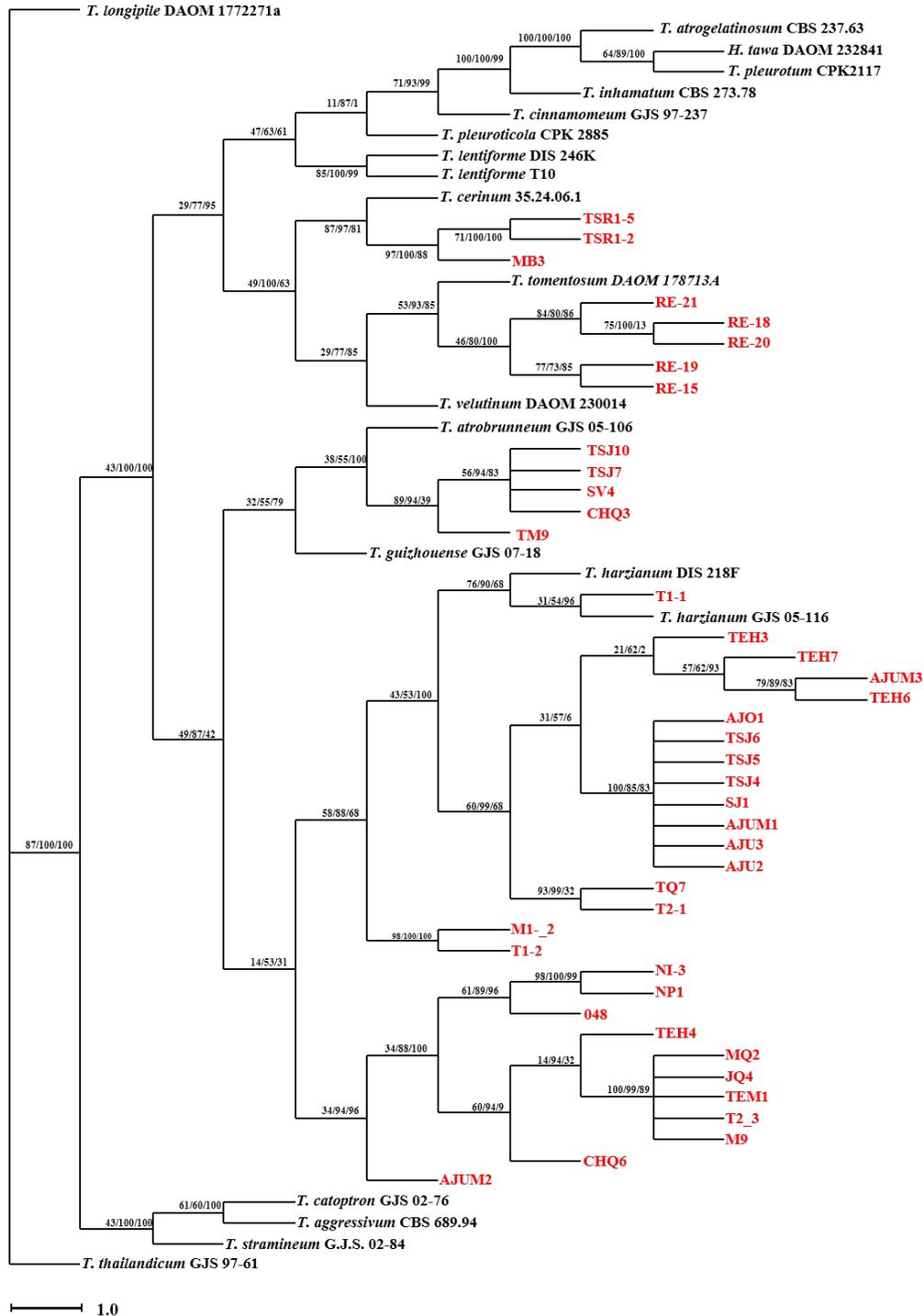


Figura 14. Filograma del clado *Harzianum*. Las cepas en rojo se refieren a las cepas aisladas en este proyecto. En seguida de las cepas referencia se muestra el nombre de la cepa o colección como se muestra en la base de datos GenBank (Tabla3). Los valores de soporte de Bootstrap se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos por los métodos de máxima verosimilitud,

aproximación bayesiana y máxima parsimonia respectivamente. La escala de divergencia se muestra al final del Filograma

En el clado Hamatum se agrupan 19 cepas (Figura 7), el clado Viride se agruparon 63 cepas (Figura 8), el clado Longibrachiatum (Figura 9) se agruparon 11 cepas y el clado Harzianum (Figura 10) en el que se agruparon 41 cepas. A pesar de este método, aún hay cepas que no se agrupan con ninguna otra cepa de referencia. En el clado Hamatum las cepas TRT3, NZ1, TQ3, TQ1, TQ, TEH5 y NI-1, que aunque parecen ser cepas afines a *T. asperellum*, es necesario más análisis para confirmar su identidad. Mismo caso para el clado Harzianum las cepas 048, AJUM2, TEM1, TEH4, T2-3, NP1, N1-3, MQ2, M9, JQ4 y CHQ6, que aunque en los cladogramas se agrupan próximos a *Trichoderma harzianum*, son necesarios más análisis para confirmar su identidad. Así mismo los filogramas (Figura 8, Figura 10, Figura 12, Figura 14) muestran la alta diversidad de cepas en el estado de Querétaro, con excepción de *T. atroviride*, en la que se muestran 17 cepas con exactamente la misma secuencia. De igual manera en el filograma del clado Viride, (Figura 12) no hay cepas que se agrupen con la cepa de referencia IMI206040, por lo que se descarta la presencia de contaminación con la cepa de referencia utilizada en el laboratorio.

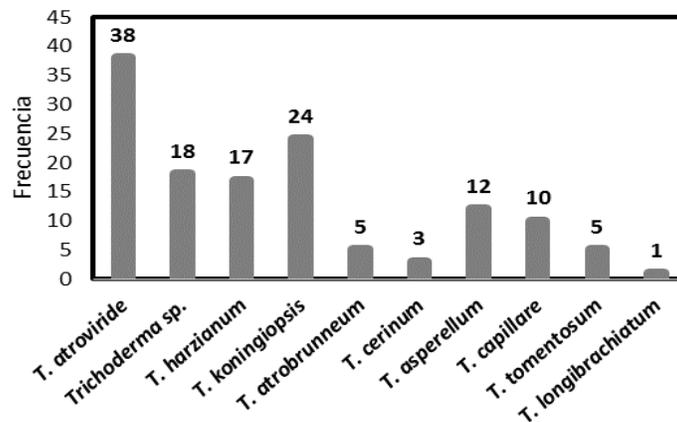


Figura 15. Total de especies identificadas en las cepas aisladas. Resumen del total de especies tentativas aisladas, y la frecuencia de las cepas respectivas de cada especie.

Tabla 4. Especies de *Trichoderma* descritas en México. Resumen de las especies identificadas y descritas en México. En el recuadro rojo se señalan las especies que también fueron localizadas en el presente trabajo.

Especie	Estado
<i>T. aggressivum</i>	Puebla
<i>T. longibrachiatum</i>	Colima
<i>T. solani</i>	ND
<i>T. composticola</i>	ND
<i>T. viridialbum</i>	ND
<i>T. erinaceum</i>	Quintana Roo
<i>T. harzianum</i>	Quintana Roo, Veracruz, Tabasco, Tamaulipas, Chihuahua
<i>T. atroviride</i>	Quintana Roo, Veracruz, Tamaulipas
<i>T. koningiopsis</i>	Tamaulipas, Veracruz, Tamaulipas
<i>T. virens</i>	Veracruz Tabasco, Tamaulipas
<i>T. reesei</i>	Tabasco
<i>T. citrinoviride</i>	ND
<i>T. pleuroticola</i>	Tabasco
<i>T. spirale</i>	Tabasco
<i>T. brevicompactum</i>	Tabasco
<i>T. asperellum</i>	Tabasco, Chihuahua
<i>T. crassum</i>	Oaxaca
<i>T. hamatum</i>	Guerrero
<i>Trichoderma spp.</i>	Varios

7.3 Ensayos de antibiosis *in vitro*

Utilizando las 133 cepas de *Trichoderma* aisladas en este trabajo, se realizaron ensayos de antibiosis contra cuatro fitopatógenos: *S. rolfsii* (Figura 16), *F. oxysporum* (Figura 17), *R. solani* (Figura 18) y *C. gloeosporioides* (Figura 19). Tomamos como punto de cohorte una inhibición superior al 75% para poder seleccionar a las cepas con mayor capacidad antagónica. Con este punto de cohorte encontramos 19 cepas de *Trichoderma* con alta capacidad antagónica contra *F. oxysporum*; 28 con alta capacidad antagónica contra *S. rolfsii*, 36 capaces de inhibir a *R. solani* y 29 capaces de inhibir a *C. gloeosporioides*.

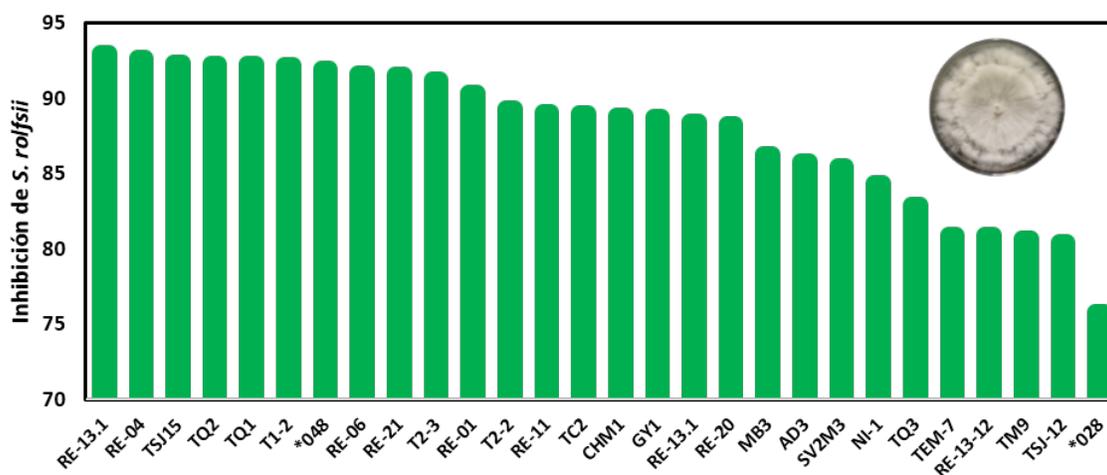


Figura 16. Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra *S. rolfsii*. Las cepas más antagónicas contra *S. rolfsii* se muestran en el eje X ($\geq 75\%$ de inhibición); el eje Y indica el porcentaje de inhibición del fitopatógeno. La placa se incubó por 4 días. Los cultivos se incubaron a 28°C en iluminación constante. El ensayo control consistió en un disco de micelio de *S. rolfsii* que creció en medio PDA sin la presencia de metabolitos de *Trichoderma*. Se realizó una réplica de este ensayo.

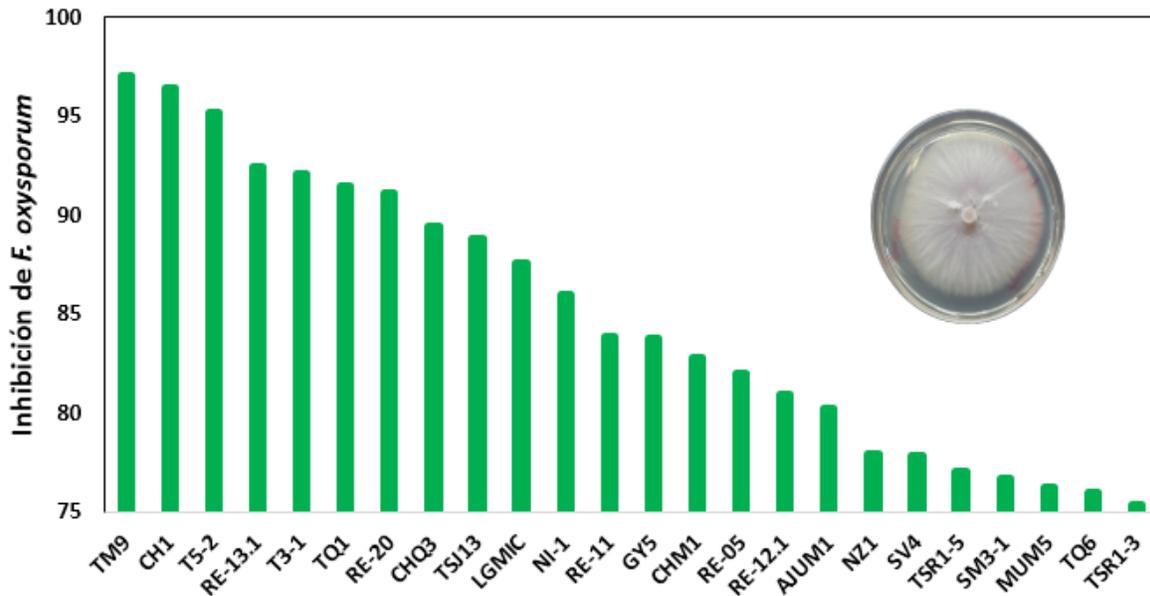


Figura 17. Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra *F. oxysporum*. Las cepas más antagonicas contra *F. oxysporum* se muestran en el eje X ($\geq 75\%$ de inhibición); el eje Y indica el porcentaje de inhibición del fitopatógeno. La placa se incubó por 8 días a 28°C en iluminación constante. El ensayo control consistió en un disco de micelio de *F. oxysporum* que creció en medio PDA sin la presencia de metabolitos de *Trichoderma*, Se realizó una réplica de este ensayo.

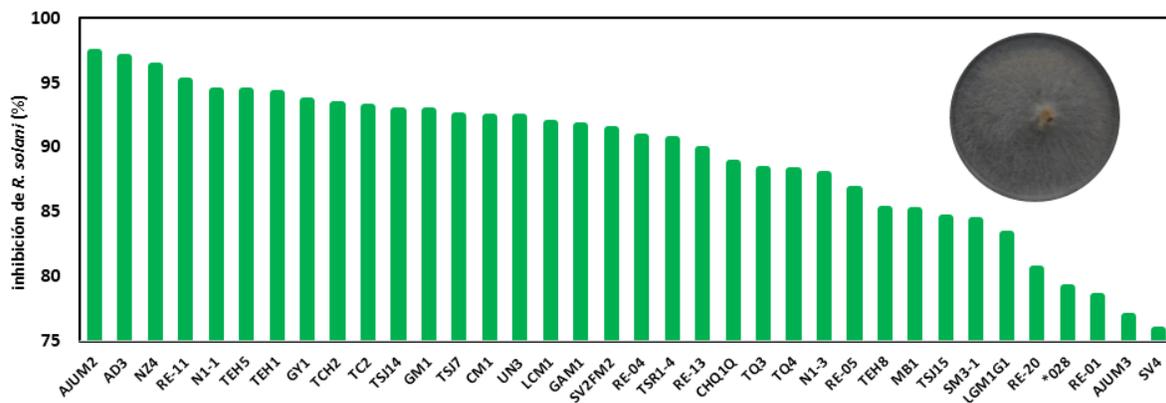


Figura 18. Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra *R. solani*. Las cepas más antagonicas contra *R. solani* se muestran en el eje X ($\geq 75\%$ de inhibición); el eje Y indica el porcentaje de inhibición del fitopatógeno. La placa se incubó por 2 días. Los cultivos se incubaron a 28°C en iluminación constante. El ensayo control consistió en un disco de micelio de *R. solani* que creció en medio PDA sin la presencia de metabolitos de *Trichoderma*, Se realizó una réplica de este ensayo.

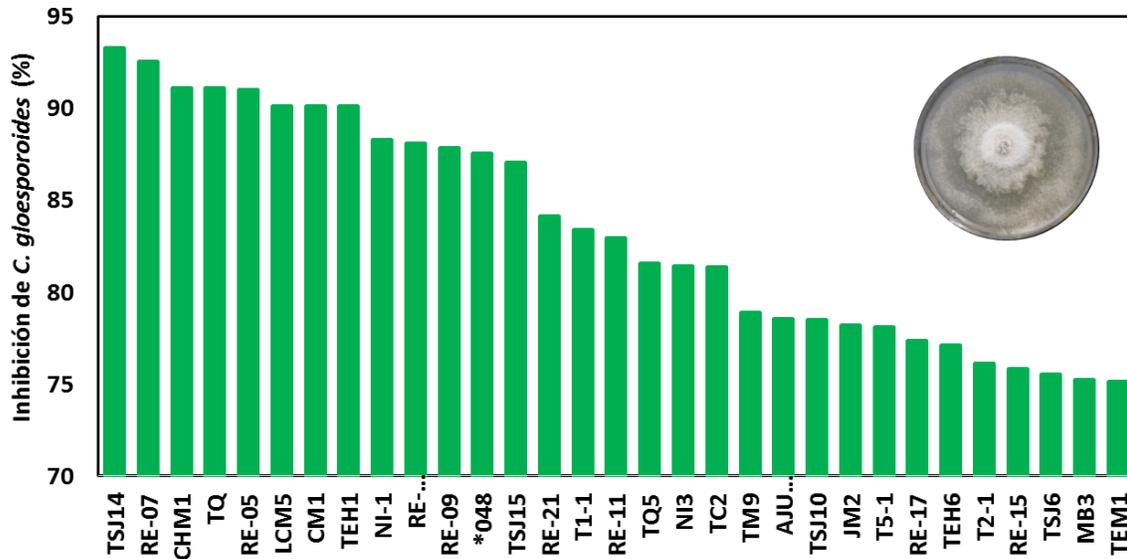


Figura 19: Antibiosis por metabolitos difusibles en placa contra *C. gloeosporioides*. Las cepas más antagonicas contra *C. gloeosporioides* se muestran en el eje X ($\geq 75\%$ de inhibición); el eje Y indica el porcentaje de inhibición del fitopatógeno. La placa se incubó por 14 días. Los cultivos se incubaron a 28°C en iluminación constante. El ensayo control consistió en un disco de micelio de *C. gloeosporioides* que creció en medio PDA sin la presencia de metabolitos de *Trichoderma*, Se realizó una réplica de este ensayo.

Comparando todas las cepas con alta capacidad antagonica, se realizó un diagrama de Venn para determinar los conjuntos de cepas capaces de producir antimicóticos de amplio espectro (Figura 16). Encontramos 2 cepas capaces de inhibir en más de un 75% a los cuatro fitopatógenos, la cepa *NI-1* y la cepa *RE-11*, correspondientes a *T. asperellum* y *T. koningiopsis* respectivamente (Figura 17). Estas dos cepas fueron seleccionadas para continuar el trabajo.

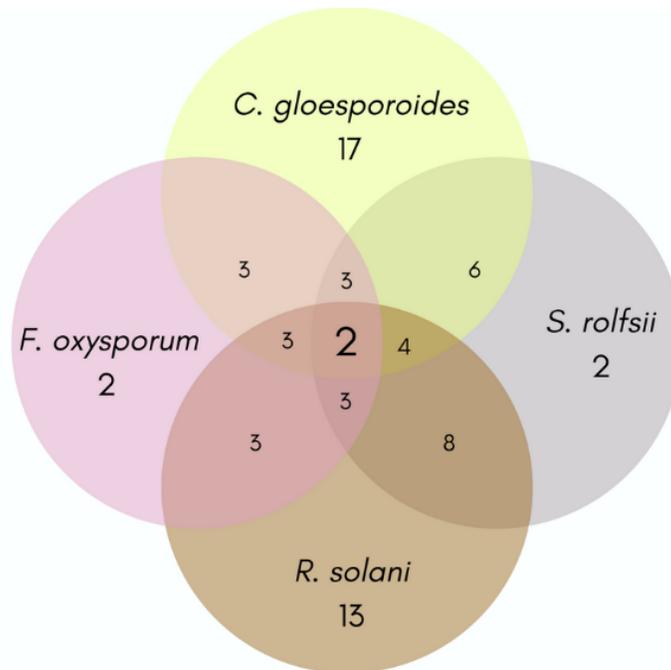


Figura 20: Conjuntos de las cepas con mayor potencial antagónico. Diagrama de Venn indicando los conjuntos de cepas productores de antimicóticos de amplio espectro. El conjunto central indica la cantidad de cepas capaces de inhibir más del 75% a los 4 fitopatógenos.

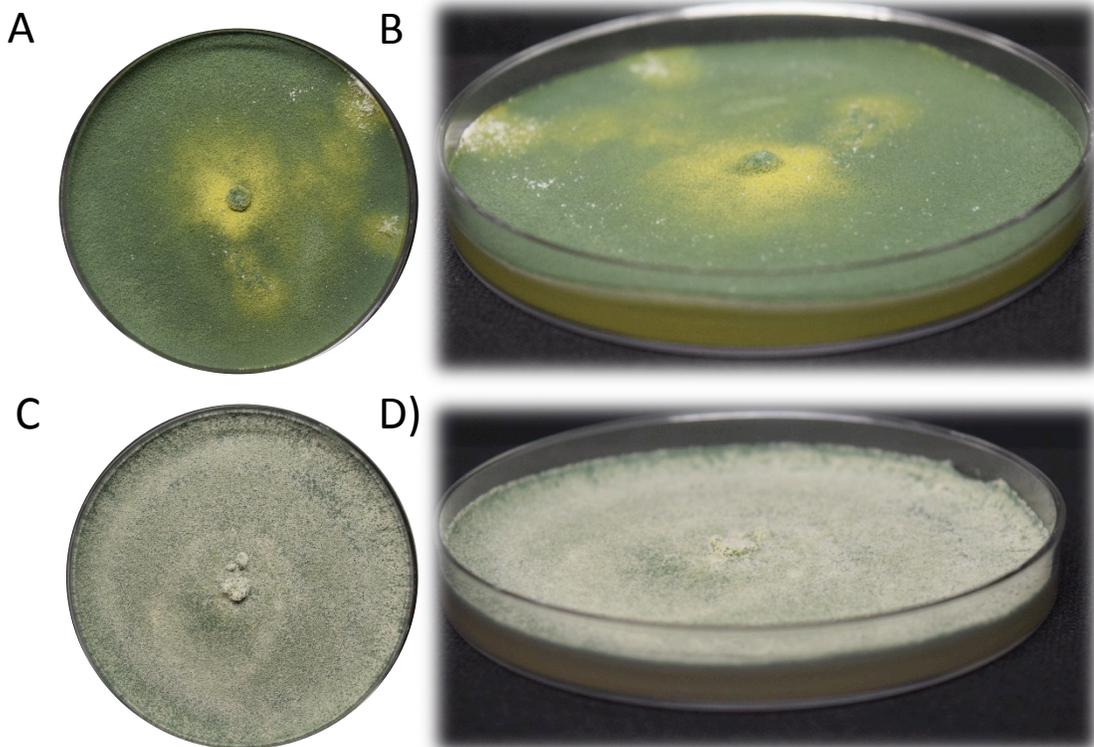


Figura 21. Morfología colonial de las cepas con mayor actividad antifúngica. **A-B**, La cepa RE-11 correspondiente a *T. koningiopsis*. **C-D**, se refieren a las cepas NI-1 correspondiente a *T. asperellum*. **A**, vista aérea del micelio de RE-11. **B**, vista frontal y coloración del medio de cultivo PDA. **C**, vista aérea del micelio de NI-1. **D**, vista frontal y coloración del medio de cultivo PDA.

7.4 Caracterización de las cepas NI-1 y RE-11

Las cepas NI-1 y RE-11 se evaluaron de nueva cuenta para determinar el efecto antimicótico contra los 4 fitopatógenos estudiados en este proyecto. Los aislados se sometieron a un nuevo análisis de metabolitos difusibles en placa por triplicado y se comprobó que estas dos cepas pueden inhibir sustancialmente a los 4 fitopatógenos. En el ensayo se comprobó que tienen un mayor efecto antagónico contra los hongos basidiomicetos, ya que puede inhibirlos en más de un 90%. Además las cepas inhiben por igual a los hongos fitopatógenos a excepción de *F. oxysporum*, en el que la cepa NI-1 es el más efectivo para inhibir su desarrollo (Figura 22).

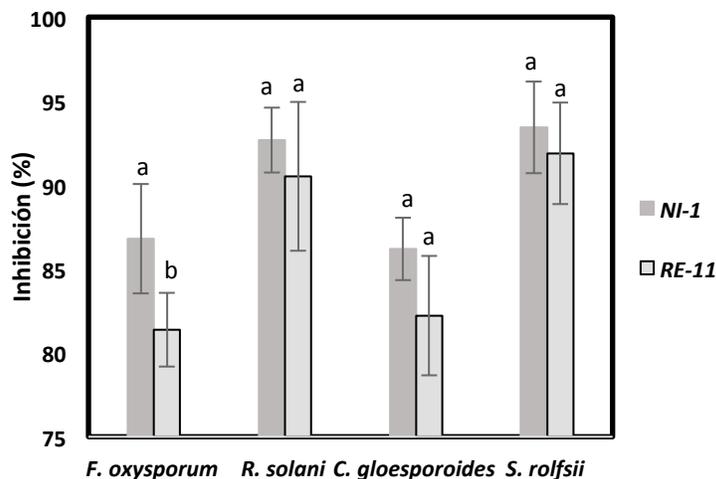


Figura 22. Capacidad antagónica de las cepas NI-1 y la cepa RE-11 contra cuatro hongos fitopatógenos. En ensayo de metabolitos difusibles en placa se realizó por triplicado. Barras de error indican la desviación estándar. Se realizó una ANOVA de una vía y TUKEY-Kramer para denotar diferencias entre los tratamientos a cada fitopatógeno. $P < 0.001$.

Además, se observó que las cepas NI-1 y RE-11 son capaces de crecer con diferentes fuentes de carbono, ya que las cepas pudieron crecer y esporular en medio suplementados con celulosa, glucosa, quitina y sacarosa; a pesar de esto el

crecimiento fue mayor en medio PDA, mientras que con celulosa el hongo tardó más en desarrollarse y en formar esporas (Figura 23). El crecimiento de los hongos en medios suplementados con quitina, glucosa y sacarosa fue similar en las dos cepas. Comparando las dos cepas, RE-11 se desarrolló y formó esporas más rápido que la cepa NI-1 (Figura 23 A y B).

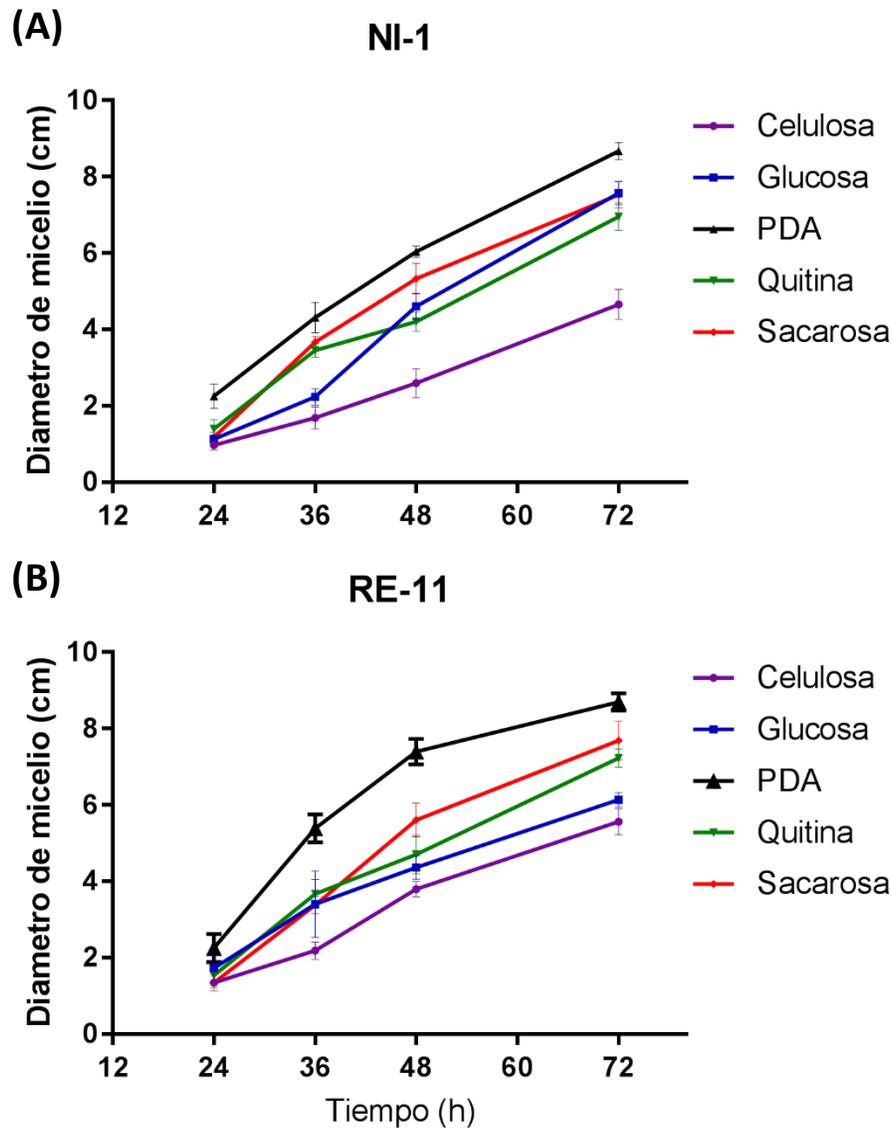


Figura 23. Cinéticas de crecimiento en distintas fuentes de carbono. Se analizó el crecimiento de la cepa NI-1 (A) y la cepa RE-11 (B), en medios de cultivo mínimo de Vogel suplementado con diferentes fuentes de carbono indicadas en la figura. Los experimentos se realizaron por triplicado. Barras de error indican desviación estándar.

Para evaluar la capacidad de biosíntesis de moléculas fungicidas en función de las condiciones nutricionales, se replicaron los análisis de metabolitos difusibles en placa en PDA y en distintos medios mínimos suplementados con distintas fuentes de carbono (Quitina, Sacarosa, Celulosa, Fructosa, Glucosa). Las cepas de *Trichoderma* tienden a secretar más moléculas fungicidas en medio PDA, ya que se observó que fueron los ensayos en los que se observó una mayor inhibición de los fitopatógenos (Fig. 24, 25, 26 y 27). Por lo anterior, el medio PDA se consideró ideal para la producción de moléculas fungicidas y fue seleccionado para realizar los posteriores ensayos. Es importante recalcar que se reportó inhibición en el desarrollo de los fitopatógenos en todos los medios evaluados, por lo que las cepas RE-11 y NI-1 son capaces de sintetizar y secretar al medio moléculas con actividad fungicida con base en el catabolismo de quitina, sacarosa, celulosa y glucosa, sin embargo debido a que son medios mínimos esta capacidad biosintética es limitada. En el caso de los medios suplementados con quitina, es posible que la inhibición sea producto de la liberación de enzimas hidrolíticas, como lo es el caso de la cepa NI-1 al inhibir a *R. solani* (Figura 24), *F. oxysporum* (Figura 25), y *C. gloeosporioides* (Figura 27). Así mismo se encontró que el fitopatógeno más sensible a los metabolitos de *Trichoderma* fue *S. rolfsii* (Figura 26), ya que su crecimiento fue nulo en los ensayos realizados con glucosa o sacarosa en comparación con el ensayo control; los datos de antibiosis con *S. rolfsii* en medio mínimo suplementado con quitina no son concluyentes debido a la incapacidad del hongo en crecer aprovechando esta fuente de carbono.

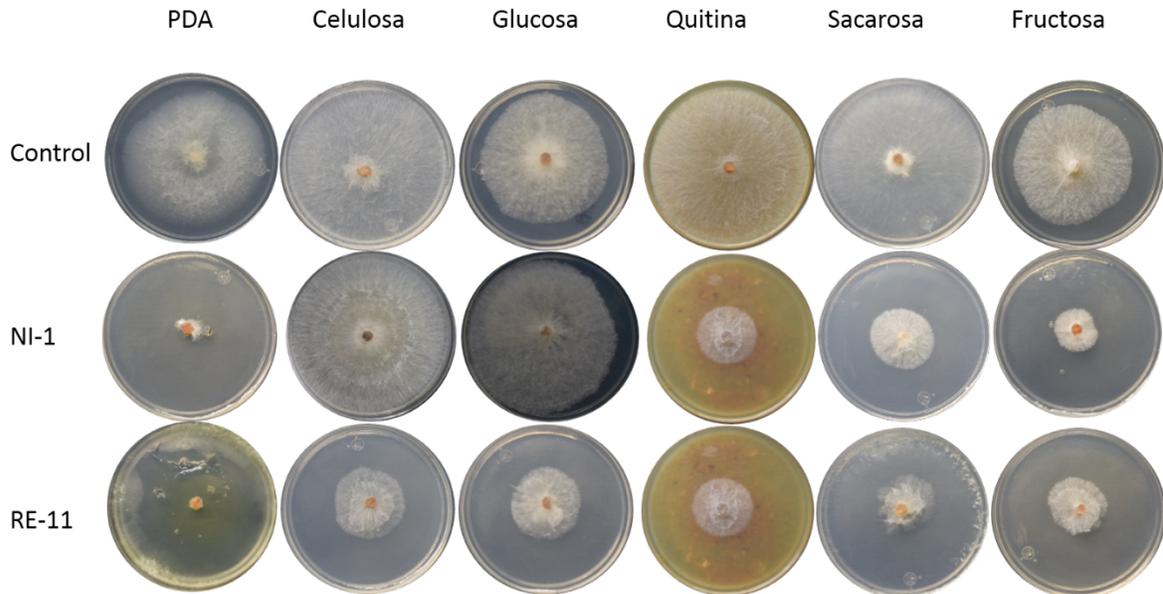


Figura 24. Efecto de fuentes de carbono en la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra *R. solani*. Un disco de 5 mm del fitopatógeno se inoculó en el centro de las placas. A excepción de las placas de PDA, las otras están compuestas de placas de medio mínimo Vogel's suplementados con celulosa, glucosa, quitina, sacarosa y fructosa como fuente de carbono. Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron al 1%. Los preinóculos provenían de cultivos frescos crecidos en medio PDA para favorecer su crecimiento. Las placas se incubaron a 28°C por 2 días a iluminación constante. El ensayo control consistió de placas a las que no se les aplicó tratamiento con la cepa de *Trichoderma*.

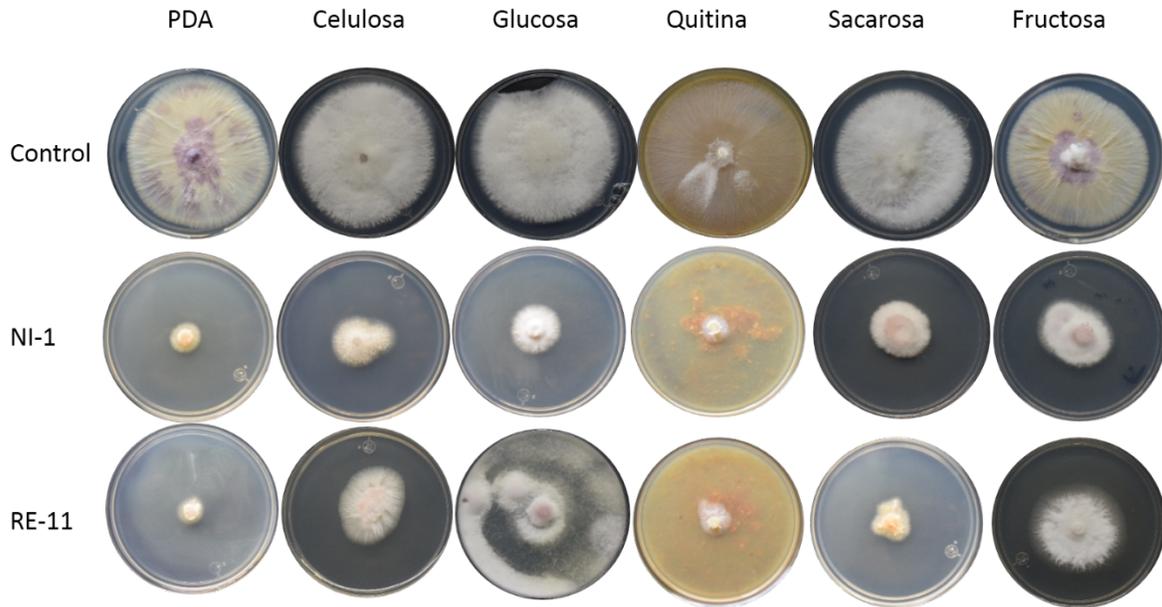


Figura 25. Efecto de las fuentes de carbono en la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra *F. oxysporum*. Un disco de 5 mm del fitopatógeno se inoculó en el centro de las placas. A excepción de las placas de PDA, las otras están compuestas de placas de medio mínimo Vogel's suplementados con celulosa, glucosa, quitina, sacarosa y fructosa como fuente de carbono. Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron al 1%. Los preinóculos provenían de cultivos frescos crecidos en medio PDA para favorecer su crecimiento. Las placas se incubaron a 28°C por 7 días a iluminación constante. Se observa que el medio PDA es el más efectivo al controlar el desarrollo de este fitopatógeno. El ensayo control consistió de placas a las que no se les aplicó tratamiento con la cepa de *Trichoderma*.

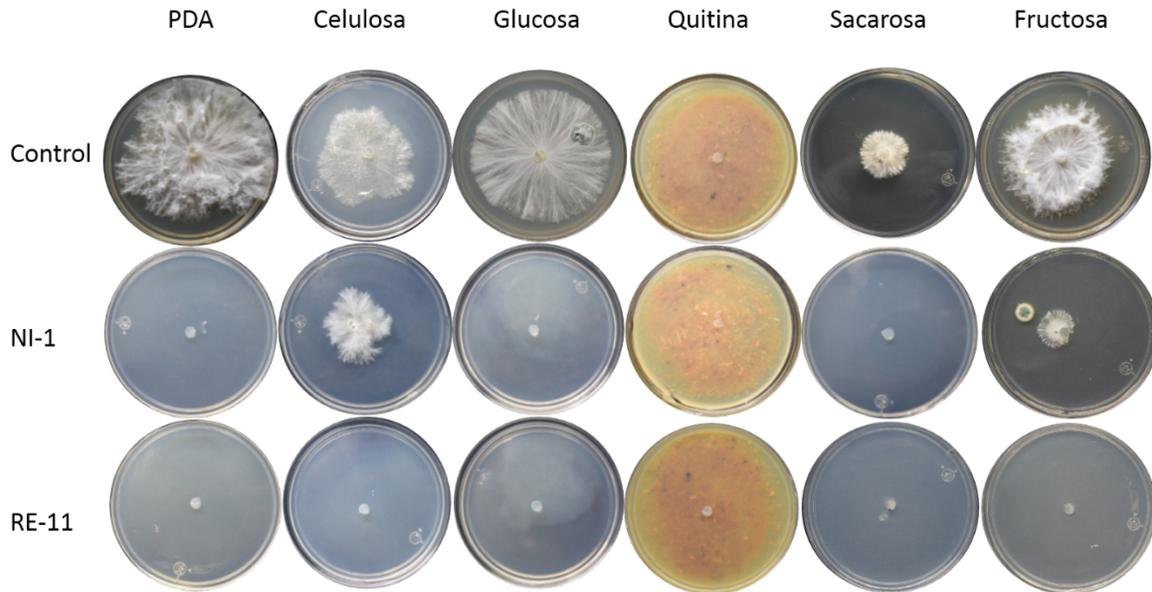


Figura 26. Efecto de las fuentes de carbono en la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra *S. rolfsii*. Un disco de 5 mm del fitopatógeno se inoculó en el centro de las placas. A excepción de las placas de PDA, las otras están compuestas de placas de medio mínimo Vogel's suplementados con celulosa, glucosa, quitina, sacarosa y fructosa como fuente de carbono. Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron al 1%. Los preinóculos provenían de cultivos frescos crecidos en medio PDA para favorecer su crecimiento. Las placas se incubaron a 28°C por 4 días a iluminación constante. El ensayo control consistió de placas a las que no se les aplicó tratamiento con la cepa de *Trichoderma*.

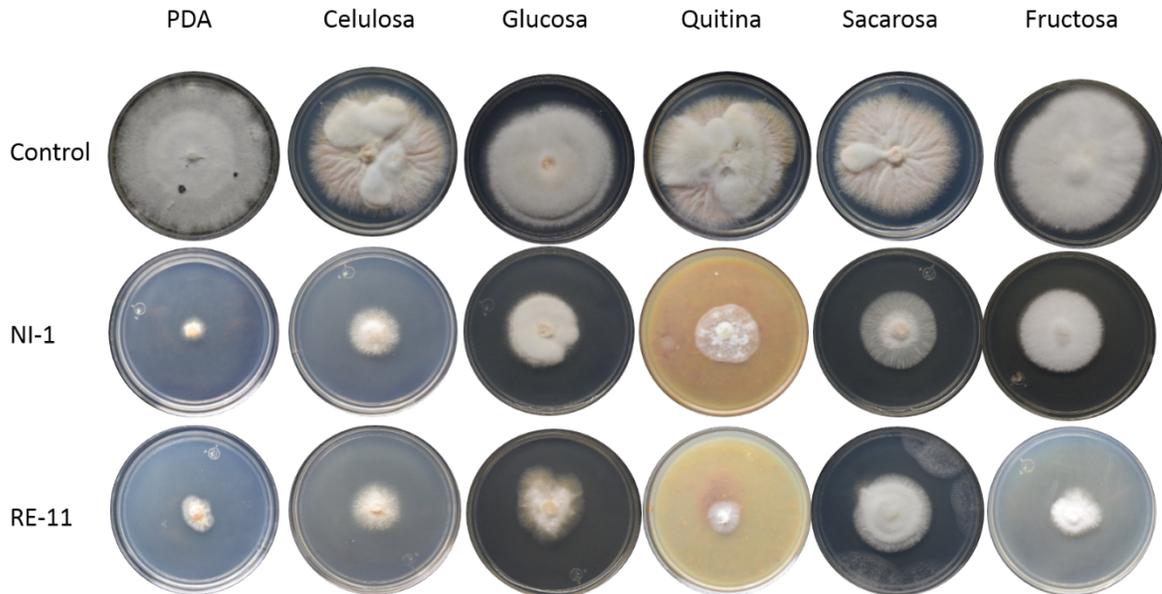


Figura 27. Efecto de las fuentes de carbono en la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra *C. gloeosporioides*. Un disco de 5 mm del fitopatógeno se inoculó en el centro de las placas. A excepción de las placas de PDA, las otras están compuestas de placas de medio mínimo Vogel's suplementados con celulosa, glucosa, quitina, sacarosa y fructosa como fuente de carbono. Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron al 1%. Los preinóculos provenían de cultivos frescos crecidos en medio PDA para favorecer su crecimiento. Las placas se incubaron a 28°C por 14 días a iluminación constante. El ensayo control consistió de placas a las que no se les aplicó tratamiento con la cepa de *Trichoderma*.

7.5 Estandarización del efecto inhibitorio de los filtrados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Una vez que se determinó que el medio de cultivo PDA es el óptimo para la producción de moléculas antibióticas por parte de las dos cepas de *Trichoderma*, se establecieron las condiciones ideales para la obtención de filtrados y su efecto en el crecimiento de *R. solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *S. rolfsii*. Para esto se establecieron cinéticas de crecimiento en medio líquido PDB de las cepas NI-1 y la cepa RE-11, para observar en qué punto del desarrollo de la cepa de *Trichoderma* se secretan más moléculas inhibitorias, puesto que se sabe que la secreción de estas moléculas fungicidas no es constitutiva, sino dependiente de

diferentes variables, entre ellas las fases del cultivo, el sustrato, la cepa de *Trichoderma*, la viabilidad del patógeno, o los componentes del medio (Harman et al., 2012; Marques et al., 2018; Vinale et al., 2012). Se estandarizó utilizando como referencia una cepa de *R. solani*. En el caso de la cepa RE-11, la mayor inhibición se presentó con filtrados obtenidos a las 24h y a las 96h (Figura 28), sin embargo la inhibición que mostraron estos filtrados no se compara con la obtenida trabajando en medio sólido, en el que la inhibición de *R. solani* con los metabolitos de la cepa RE-11 fue del 90%. Además, es el punto en el que la cepa parece tener una mayor actividad antagonista contra *R. solani*, ya que los filtrados a ese tiempo disminuyen el crecimiento de *R. solani* respecto el ensayo control. Aunque el filtrado a las 96 horas muestra un efecto en el desarrollo del fitopatógeno, este es mínimo ya que el diámetro del micelio solo disminuye medio centímetro. Estadísticamente los filtrados obtenidos a las 24 horas y las 96 horas de crecimiento de la cepa RE-11 son similares.

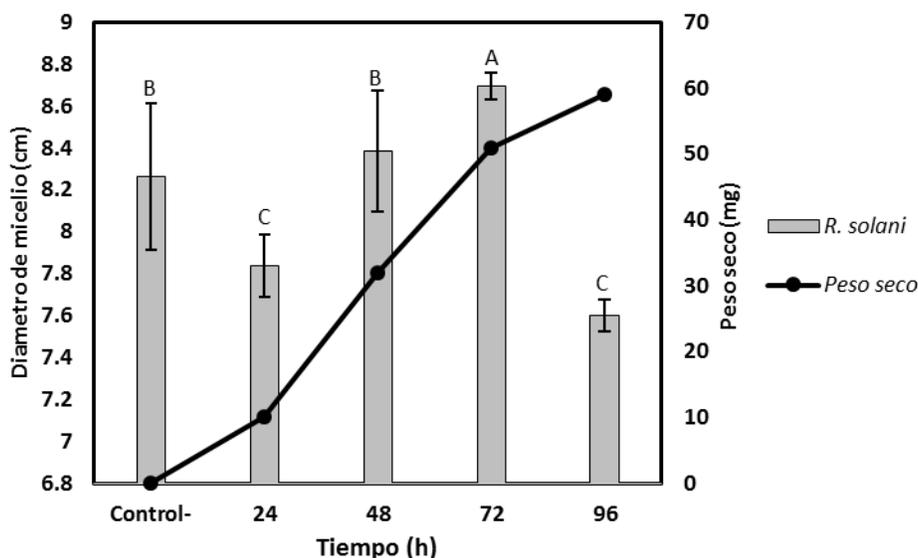


Figura 28. Actividad antifúngica de la cepa RE-11 en medio líquido contra *R. solani* en relación al tiempo. En el eje X se muestra el tiempo en el que se filtró la cepa. El eje Y1 indica el porcentaje de inhibición de *R. solani*. El eje Y2 indica el peso seco del micelio de la cepa RE-11 al crecer en medio PDB. El cultivo de *Trichoderma* se incubó a 28°C con agitación constante a 120 rpm. El peso seco de la cepa RE-11 se obtuvo tras deshidratar al hongo por 36h a 80°C. Los ensayos se realizaron por triplicado. Barras de error en los datos del diámetro del micelio de *R. solani* muestran la desviación estándar. Tukey-Kramer $P < 0.05$

Como en el ensayo anterior, la inhibición con los filtrados no fue tan marcada como la que se presentó con el método del celofán (Figura 24). La cepa NI-1 posee una mayor actividad antagónica contra *R. solani*, ya que disminuye su crecimiento, en relación al ensayo control, solo que en este caso la inhibición solo se presentó con los filtrados obtenidos a las 96 horas post-inoculación (Figura 29), es decir cuando la cepa de *Trichoderma* entra a la fase estacionaria. Es de resaltar que a las 96 horas el filtrado inhibe drásticamente el desarrollo de *R. solani*, por lo que durante la fase estacionaria es cuando la cepa NI-1 secreta sus moléculas con actividad antifúngica.

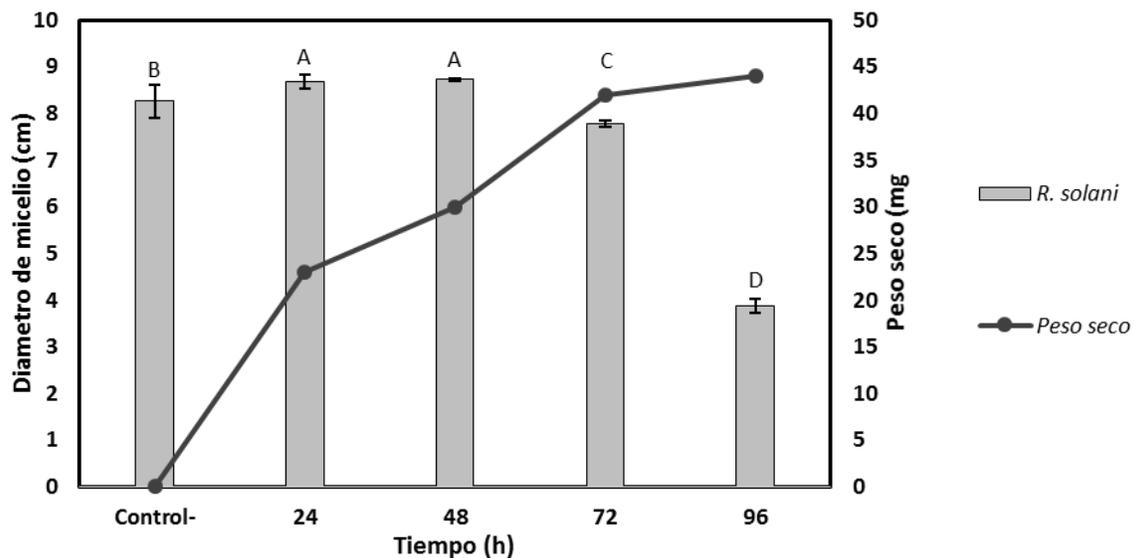


Figura 29: Actividad antifúngica de la cepa NI-1 en medio líquido contra *R. solani* en relación al tiempo. En el eje X se muestra el tiempo en el que se filtró la cepa. El eje Y1 indica el porcentaje de inhibición de *R. solani*. El eje Y2 indica el peso seco del micelio de la cepa NI-1 al crecer en medio PDB. El cultivo de *Trichoderma* se incubó a 28°C con agitación constante a 120 rpm. El peso seco de la cepa NI-1 se obtuvo tras deshidratar al hongo por 36h a 80°C. Los ensayos se realizaron por triplicado. Barras de error en los datos del diámetro del micelio de *R. solani* muestran la desviación estándar. Tukey-Kramer $P < 0.05$.

7.6 Efecto de los filtrados en el crecimiento de hongos fitopatógenos

Para evaluar el efecto de los filtrados de las cepas de *Trichoderma* obtenidas en su fase estacionaria (96h), se suplementó el filtrado crudo sobre medio PDA en el que después se inoculó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de los fitopatógenos (*F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *R. solani* y *S. rolfsii*). Los ensayos se detuvieron a las 48 horas post aplicación del filtrado debido a que no se obtuvieron mezclas completamente estériles. Además como control positivo se utilizó el fungicida comercial Benomilo. En estos ensayos se observó que los filtrados tenían un efecto fungistático sobre el crecimiento de *R. solani* y *S. rolfsii*, en particular el filtrado de la cepa NI-1 es capaz de inhibir a *R. solani* aún más que el Benomilo a la concentración que indicaba el proveedor; por otra parte el filtrado de las dos cepas inhiben el desarrollo de *S. rolfsii* a niveles comparables con el fungicida comercial. Sin embargo, de manera general la alteración en el crecimiento de los fitopatógenos fue débil y no se compara con el alcanzado con el control positivo; en el caso de los hongos ascomicetos la inhibición fue nula en comparación con el control positivo (Figura 30). En resumen el único efecto en el desarrollo de los fitopatógenos se observó con el filtrado de la cepa NI-1 sobre *R. solani*, mientras que con los otros tratamientos no se observó un efecto sobre el diámetro del micelio de los fitopatógenos.

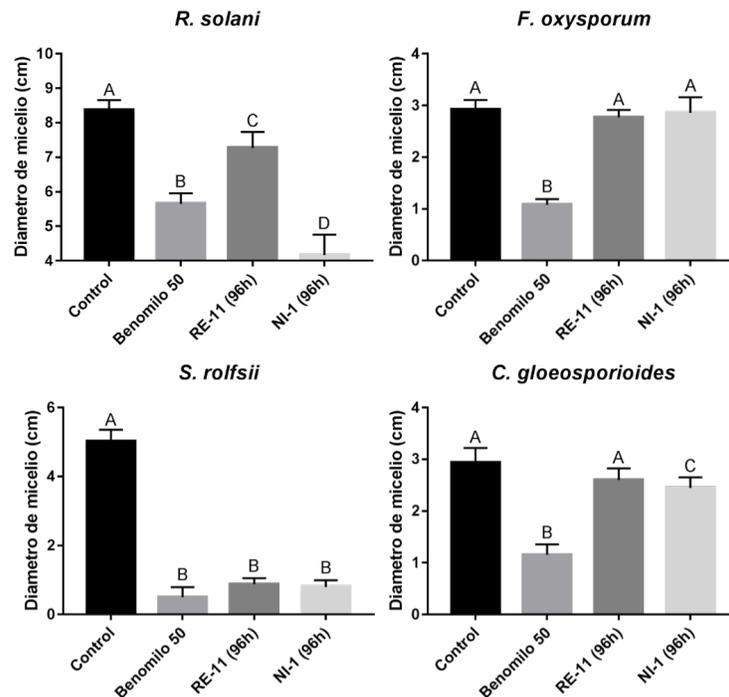


Figura 30. Efecto de los filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 suplementados en el medio de cultivo. Los filtrados se obtuvieron de cultivos con 96 horas de incubación a 28°C; los ensayos terminaron a las 48h post inoculación del fitopatógeno debido a la presencia de contaminación por *Trichoderma*. El filtrado se suplemento al medio de cultivo para una concentración final de 10%. Diámetro del micelio fue medido con el programa ImageJ restando 5 mm del disco de micelio inicial. 5 réplicas por ensayo. Barras de error indican desviación estándar. Prueba de Tukey-Kramer $P < 0.05$

Simultáneamente se realizó un ensayo similar en el que solo se aplicaron 100µl sobre el disco de micelio del fitopatógeno de manera que el filtrado cubra por completo los 5 mm del disco de micelio inicial. Con esta estrategia se potenció el efecto de los filtrados sobre el crecimiento de todos los fitopatógenos, aunque se conservó su propiedad fungistática (Figura 31). De igual manera los ensayos se detuvieron a las 48 horas post aplicación del filtrado debido a la contaminación por las cepas de *Trichoderma*. Los fitopatógenos fueron inhibidos en proporciones similares sin importar la procedencia del filtrado (Figura 31), los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Al estar en contacto directo

las células de los fitopatógenos con los metabolitos de *Trichoderma*, estos últimos tuvieron una mayor actividad antifúngica como es el caso del filtrado de la cepa RE-11 en contacto contra células de *R. solani*, en donde los filtrados de las dos cepas inhibieron en un 55% el crecimiento del fitopatógeno con respecto al ensayo control (Figura 31). La inhibición en contra de *C. gloeosporioides* fue ligeramente superior, cuando los filtrados se colocaron en contacto directo con las células de *C. gloeosporioides* su desarrollo se inhibió un 33% con respecto al ensayo control (Figura 31), a diferencia con la estrategia anterior en la que no se diferenciaba en el crecimiento del fitopatógeno (Figura 30). Con *F. oxysporum*, el desarrollo se inhibió el 50% aproximadamente con respecto al ensayo control (Figura 31), mientras que con el experimento anterior el desarrollo del fitopatógeno había sido el mismo que en el ensayo control (Figura 30). En el caso de *S. rolfisii* la inhibición fue similar sin importar la manera en que fueron aplicados los filtrados. De manera general, el crecimiento de los fitopatógenos fue menor que con el ensayo anterior, por lo que podría considerarse una mejor estrategia para el control de *R. solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *S. rolfisii*. Salvo en el caso del efecto sobre el desarrollo de *S. rolfisii*, el fungicida comercial siempre inhibió de manera significativa más que los filtrados de las cepa RE-11 y NI-1 (Figura 30 y 31).

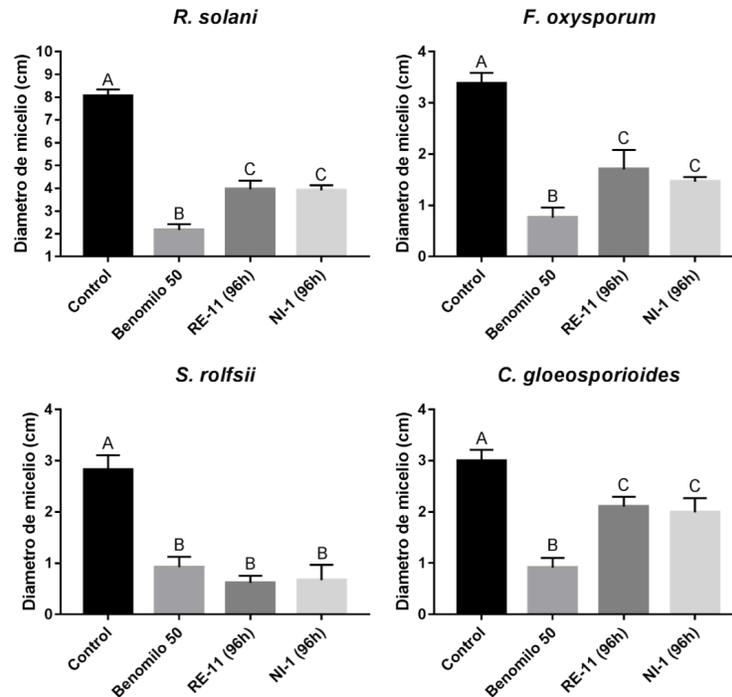


Figura 31. Efecto de los filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 al estar en contacto directo con el micelio de los fitopatógenos. Los filtrados se obtuvieron de cultivos con 96 horas de incubación a 28°C; los ensayos terminaron a las 48h post inoculación del fitopatógeno debido a la presencia de contaminación por *Trichoderma*. Se colocó sobre el micelio del fitopatógeno 100 µl de los filtrados. El diámetro del micelio fue medido con el programa ImageJ restando 5 mm del disco de micelio inicial. 5 réplicas por ensayo. Barras de error indican desviación estándar. Prueba de Tukey-Kramer $P < 0.05$

7.7 Efecto de los metabolitos liofilizados de las cepas NI-1 y RE-11 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos.

En la figura 32 se muestra el efecto de diferentes concentraciones del filtrado liofilizado, en el crecimiento de los fitopatógenos bajo estudio. En el caso del liofilizado de la cepa RE-11 se notó el efecto de los metabolitos de la cepa desde los 0.1 mg/ml con respecto al ensayo control, sin embargo el efecto inhibitorio fue más evidente a partir de los 0.5 mg/ml. El tratamiento más efectivo fue cuando el

micelio estuvo en contacto con el filtrado de la cepa RE-11 a una concentración de 1 mg/ml. El efecto de los metabolitos de *Trichoderma* tiene un efecto dosis-dependiente sobre el crecimiento de los 4 hongos fitopatógenos. Inclusive en el caso de *R. solani*, a 1 mg/ml el efecto fue mayor que con el tratamiento con el fungicida. En el caso del fitopatógeno *F. oxysporum*, fue el que mostró una mayor sensibilidad al filtrado, ya que a una concentración de 0.2 mg/ml el micelio del fitopatógeno se redujo un 46% con respecto al ensayo control. A pesar de esto, el tratamiento con el benomilo inhibió de manera total el desarrollo del micelio, a diferencia de los filtrados que únicamente retardaron su crecimiento (Figura 32). Así mismo se observó que *F. oxysporum* en contacto con el filtrado de *Trichoderma* a partir de los 0.2 mg/ml no desarrolló micelio aéreo. Respecto al ensayo con *C. gloeosporioides*, este fitopatógeno mostró sensibilidad al filtrado a partir de los 0.3 mg/ml. De manera general los filtrados mostraron la mayor capacidad antagónica a una concentración de 1 mg/ml, sin embargo a partir de los 0.7 mg/ml, se redujo su crecimiento en más de un 50% en todos los fitopatógenos en comparación con el ensayo control (Figura 32), así mismo en el caso de *R. solani* y *C. gloeosporioides* el filtrado fue casi tan efectivo que el fungicida comercial.

Liofilizado de RE-11

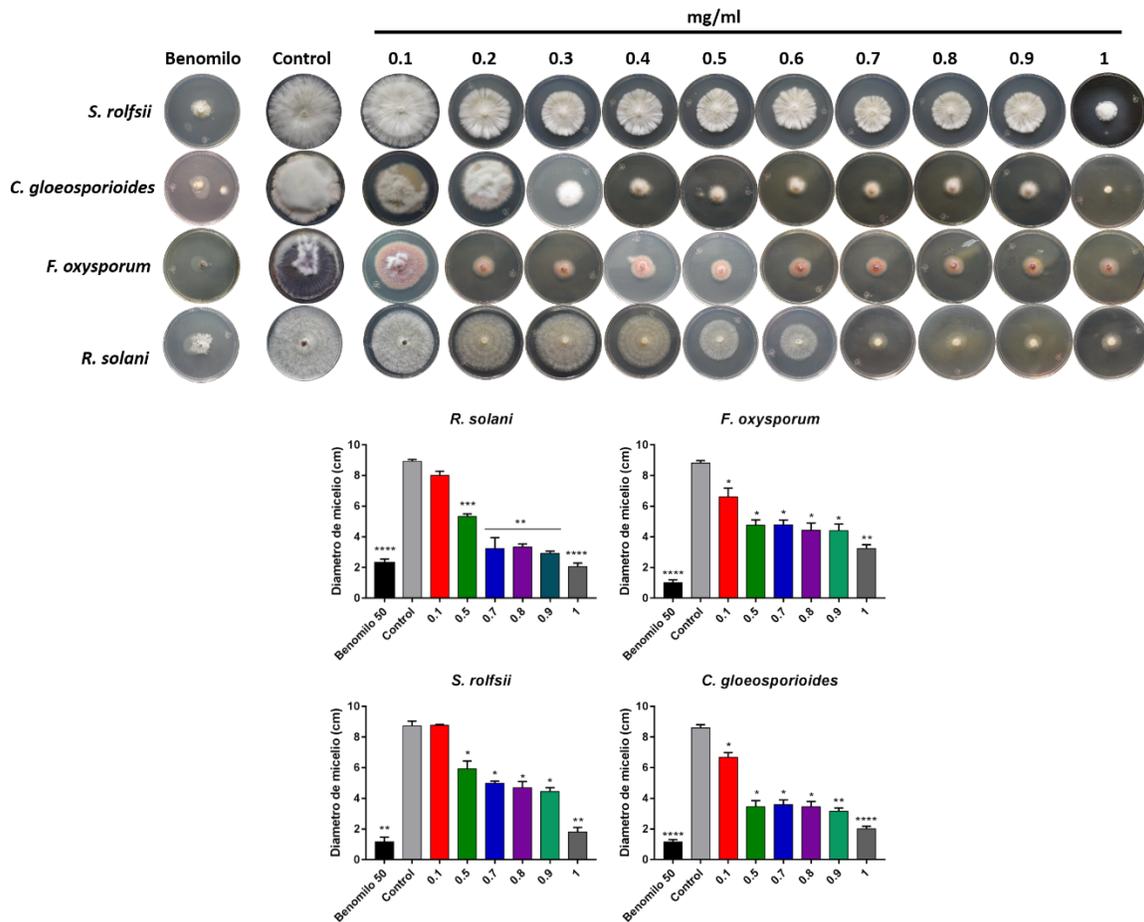


Figura 32. Efecto de los filtrados liofilizados de la cepa RE-11 en el desarrollo de hongos fitopatógenos. Se evaluó el efecto inhibitorio de los metabolitos de *Trichoderma* a diferentes concentraciones. El benomilo corresponde al control positivo el cual fue utilizado de acuerdo a las condiciones del proveedor (1 mg/ml). Se midió el diámetro del micelio con el software ImageJ. 3 réplicas por tratamiento. Prueba de Kruskal-Wallis $P < 0.05$. Prueba post-hoc de Dunnet. * denotan medias significativamente diferentes respecto al tratamiento control.

En el caso de los metabolitos liofilizados de la cepa NI-1 (Figura 33), se observó el efecto antagónico contra los 4 fitopatógenos a partir de la concentración 0.5 mg/ml. Así mismo se observa un efecto concentración-dependiente ya que a la máxima concentración, el crecimiento de los fitopatógenos bajo este tratamiento fue similar al que presentó el tratamiento con benomilo, es decir que el filtrado de

la cepa NI-1 y el benomilo tienen el mismo efecto en el desarrollo de los hongos fitopatógenos a la misma concentración (1 mg/ml). La evidencia estadística también nos sugiere que los tratamientos tienen el mismo efecto a partir de la concentración 0.7 mg/ml, por lo que el mayor efecto inhibitorio de los metabolitos de la cepa NI-1 se alcanza a esa concentración, a diferencia del tratamiento con los metabolitos de la cepa RE-11 que a 1 mg/ml fue donde se alcanzó el mayor efecto inhibitorio. En el caso de *R. solani* se observa que a partir del tratamiento con 0.7 mg/ml de filtrado comienza a desarrollar micelio sumergido, por lo que se puede tratar de una estrategia para evitar el contacto con las moléculas antifúngicas. Con este tratamiento *F. oxysporum* denotó ser el más susceptible a la acción inhibitoria, mientras que *S. rolfsii* fue el más tolerante a los metabolitos de la cepa NI-1. Comparando los tratamientos (Figura 32 y 33), el tratamiento con los filtrados de la cepa NI-1 resultó ser más efectivo ya que el efecto antifúngico se observó a partir de 0.7 mg/ml, a diferencia que con la cepa RE-11 que se reportó a 1 mg/ml.

Liofilizado de NI-1

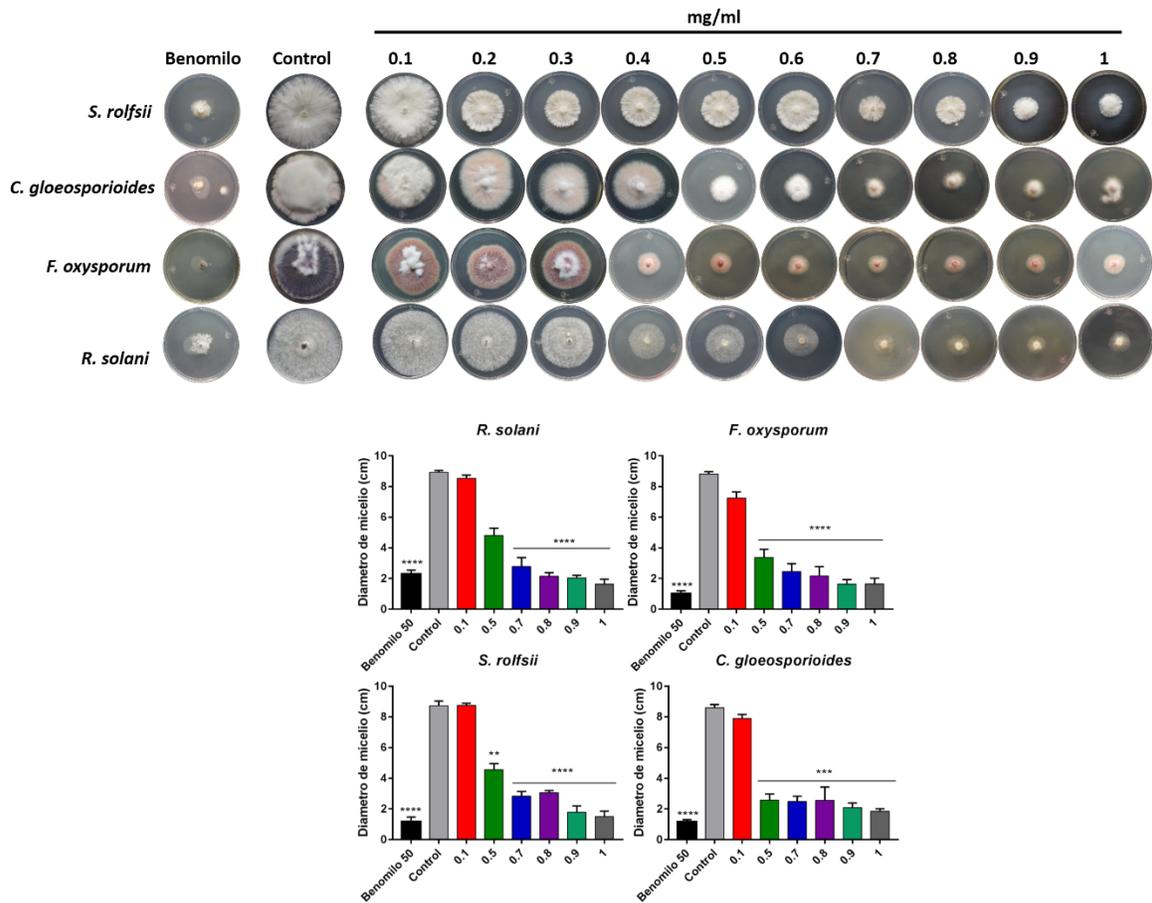


Figura 33. Efecto de los filtrados liofilizados de la cepa RE-11 en el desarrollo de hongos fitopatógenos. Se evaluó el efecto antifúngico de los metabolitos de *Trichoderma* a diferentes concentraciones. El benomilo corresponde al control positivo el cual fue utilizado de acuerdo a las condiciones del proveedor (1 mg/ml). Se midió el diámetro del micelio con el software ImageJ. 3 réplicas por tratamiento. Anova de una vía con una corrección Greenhouse-Geisser $P < 0.05$. Prueba post-hoc de Dunnet. * denotan medias significativamente diferentes respecto al tratamiento control.

7.8 Efecto de los metabolitos de *Trichoderma* sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*.

Al evaluar el efecto de los filtrados liofilizados obtenidos a las 96 horas sobre la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*, se encontró que

los filtrados son capaces de retrasar la germinación de estas, mas no es capaz de inactivarlas. El fungicida comercial si demuestra una capacidad inhibitoria, e incluso es capaz de deformar la estructura de las esporas (Figura 34 y Figura 35). Las esporas de *C. gloeosporioides* permanecen viables tras 24 horas de inoculación aún con la aplicación de filtrados (Figura 34), sin embargo el filtrado de la cepa NI-1 comienza a tener un efecto visible a una concentración de 0.7 mg/ml, mientras que con el filtrado de la cepa RE-11 tiene un efecto a una concentración de 0.6 mg/ml. En ambos casos a una concentración de 0.9 mg/ml se observa el mayor efecto inhibitorio

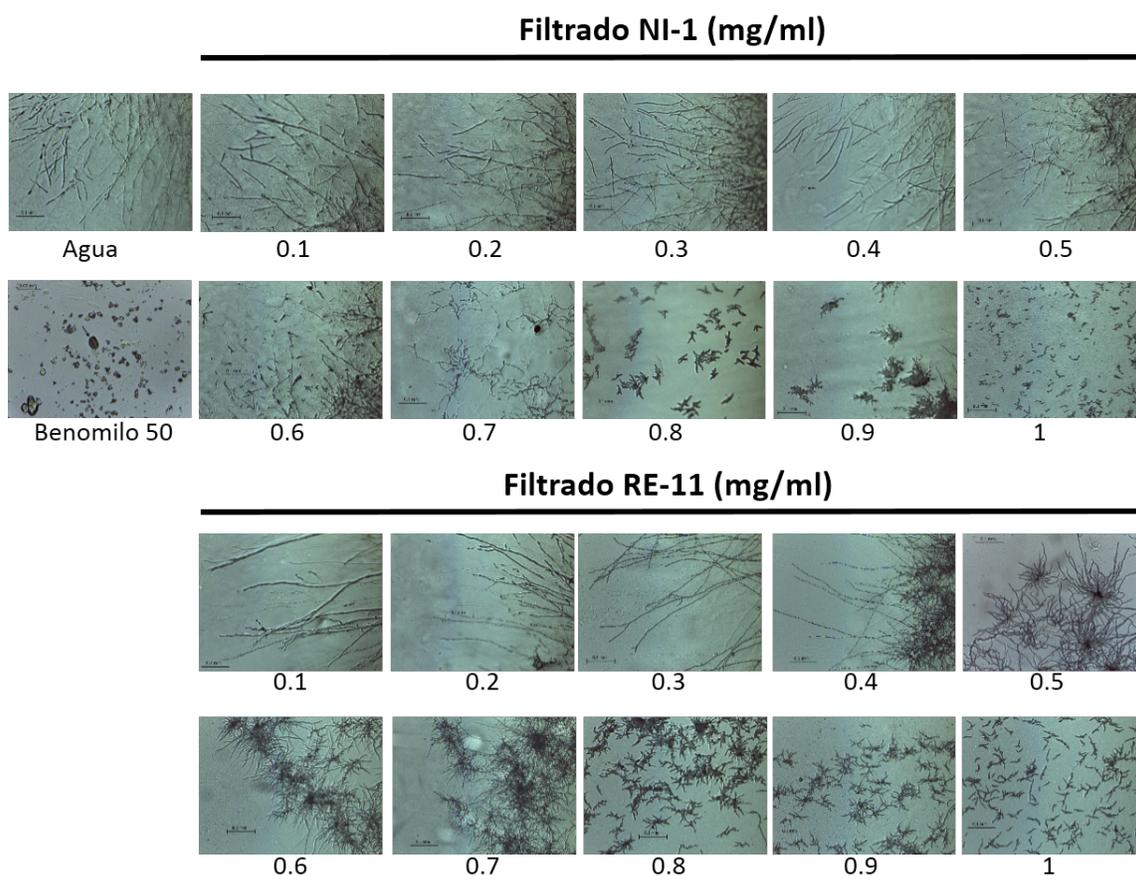


Figura 34. Efecto de los filtrados sobre la germinación de las esporas de *C. gloeosporioides*. 500 esporas se inocularon en medio PDA colocado sobre un portaobjetos y se trataron con 5 μ l de filtrado en las concentraciones indicadas. Los cultivos con los diferentes tratamientos se

observaron en un microscopio Leica DM750 a un objetivo 10X y se capturaron las imágenes a las 24h.

Respecto a la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* se observó un retraso a partir de los 0.8 mg/ml del filtrado de la cepa NI-1, sin embargo la inhibición es dosis dependiente ya que a 1 mg/ml un número mínimo de esporas fueron las que germinaron. Con el filtrado de la cepa RE-11 el efecto inhibitorio comenzó a ser percibido a partir de los 0.5 mg/ml, sin embargo a partir de los 0.8 mg/ml la tasa de germinación de esporas fue la misma. Así mismo el fungicida comercial fue más efectivo para inhibir la germinación de las esporas como se había notado de manera cualitativa. Ya que se observó que solo un número limitado de esporas son capaces de germinar, e incluso algunas muestran alteraciones morfológicas (Figura 34 y 35); sin embargo el filtrado de la cepa NI-1 demostró ser más efectiva para inhibir la germinación de las esporas de *C. gloeosporioides*

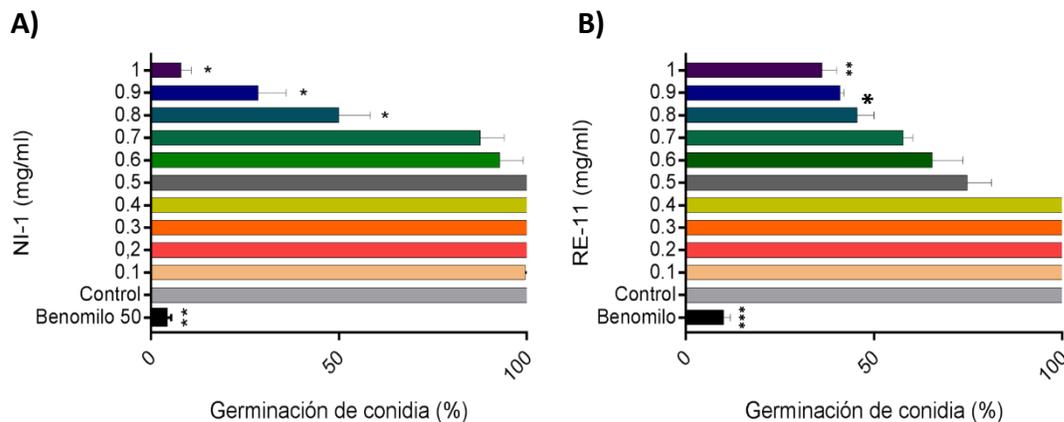


Figura 35. Comparación del efecto de los filtrados en la germinación de las esporas de *C. gloeosporioides*. A) ensayo con el filtrado de la cepa NI-1. B) Ensayo con el filtrado de la cepa RE-11. La tasa de germinación de las esporas fue considerado del 100% cuando se observó la presencia de un micelio denso. 500 esporas fueron inoculadas en todos los ensayos y todas las réplicas. 5 réplicas por ensayo. Prueba de Friedman $P < 0.05$. Prueba de Dunnet para comparación entre tratamientos. * denotan medias significativamente diferentes respecto al tratamiento control.

También se observó un retraso en la germinación de las esporas de *F. oxysporum* tras 24 horas post-inoculación al estar en contacto con los filtrados de las cepas

RE-11 y NI-1. En todos los ensayos las esporas permanecen viables tras 24 horas posteriores a la aplicación del tratamiento. En estos ensayos se comenzó a observar el efecto en el retraso de la germinación a partir de la concentración 0.8 mg/ml en el caso del filtrado de la cepa NI-1 y a 0.7 mg/ml con el filtrado de la cepa RE-11 (Figura 36), en ambos casos reduciendo la tasa de germinación en un 30% (Figura 37). Las esporas de *F. oxysporum* parecen ser más sensibles a los metabolitos de las cepas ya que a una concentración de 1 mg/ml se observaron esporas incapaces de germinar, sin embargo no se observaron con deformaciones o algo que sugiera que no son viables, aunque el tratamiento con el fungicida comercial tampoco indica la presencia de esporas no viables, a diferencia del ensayo con esporas de *C. gloeosporioides*. Los filtrados tienen un efecto inhibitorio dosis dependiente sobre la germinación de las esporas de *F. oxysporum*. Como se observó en el ensayo de germinación con las esporas de *C. gloeosporioides*, también se observó que el benomilo inhibe la germinación de las esporas de *F. oxysporum* (Figura 34 y Figura 36).

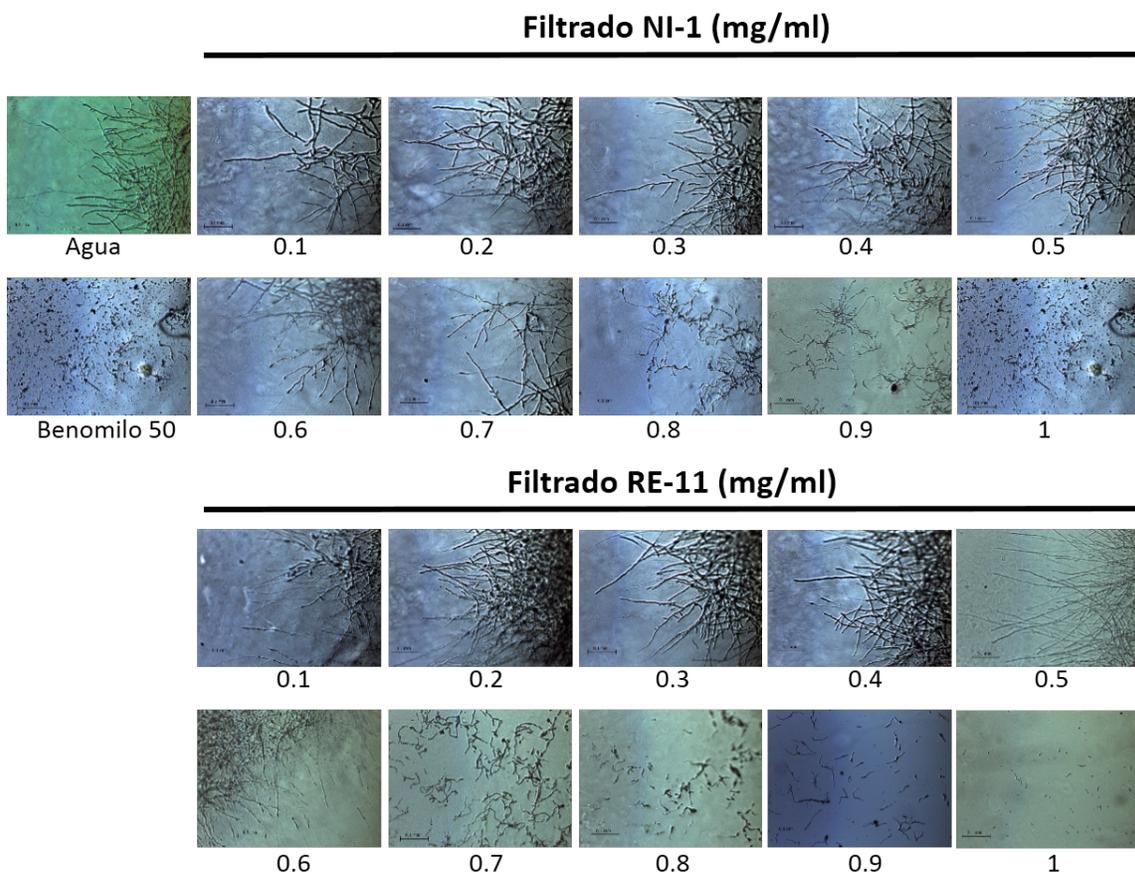


Figura 36. Efecto de los filtrados sobre la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum*. 500 esporas se inocularon en medio PDA colocado sobre un portaobjetos y se trataron con 5 μ l de filtrado en las concentraciones indicadas. Los cultivos con los diferentes tratamientos se observaron en un microscopio Leica DM750 a un objetivo 10X y las imágenes se capturaron a las 24h.

Comparando los resultados obtenidos con las esporas de *C. gloeosporioides*, el filtrado de la cepa RE-11 fue más efectivo que el filtrado de la cepa NI-1 (Figura 36 y 37). De hecho, la inhibición de germinación de esporas a una concentración de 1 mg/ml fue estadísticamente similar a la que se presentó en el control positivo (13% de germinación), mientras que a la misma concentración pero utilizando el filtrado de la cepa NI-1, la tasa de germinación de esporas es de 26%. De igual manera, el efecto inhibitorio se empezó a denotar a partir de una concentración de 0.8 mg/ml, siendo más evidente la inhibición con el filtrado de la cepa RE-11 (Figura 36 y Figura 37).

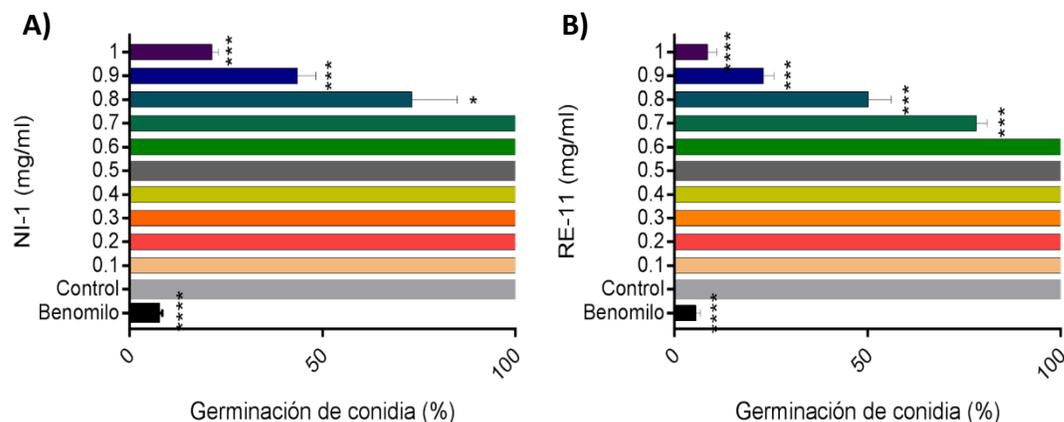


Figura 37. Comparación del efecto de los filtrados en la germinación de las esporas de *F. oxysporum*. A) ensayo con el filtrado de la cepa NI-1. B) Ensayo con el filtrado de la cepa RE-11. La tasa de germinación de las esporas fue considerado del 100% cuando se observó la presencia de un micelio denso. 5 réplicas por ensayo. Anova de una vía con corrección Greenhouse-Geisser $P < 0.05$. Prueba de Dunnet para comparación entre tratamientos. * denotan medias significativamente diferentes respecto al tratamiento control.

7.9 Efecto sinérgico de los metabolitos de las cepas RE-11 y NI-1 sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*.

Tras evaluar el efecto de los filtrados sobre la germinación de las esporas de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* por separado, se evaluó si existía una función sinérgica de parte de los filtrados liofilizados para observar si se potencia el efecto antifúngico. La aplicación de los filtrados liofilizados en conjunto fue mejor que al aplicarlos por separado (Figura 38). Se observó que la actividad antifúngica se sigue presentando, observándose un retraso en la germinación de las esporas, aunque el efecto se hizo visible a partir de los 0.6 mg/ml. De manera general, se observa que a las 24 horas los filtrados tienen una actividad fungistática y que actúan de manera sinérgica al ser capaces de retardar la germinación de las esporas de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* a partir de una concentración de 0.6 mg/ml. Por otra parte, se observó que a partir de los 0.7 mg/ml la tasa de germinación es menor al 20% (Figura 39). El benomilo volvió a ser el tratamiento más efectivo, alterando la morfología de las esporas como en los ensayos anteriores.

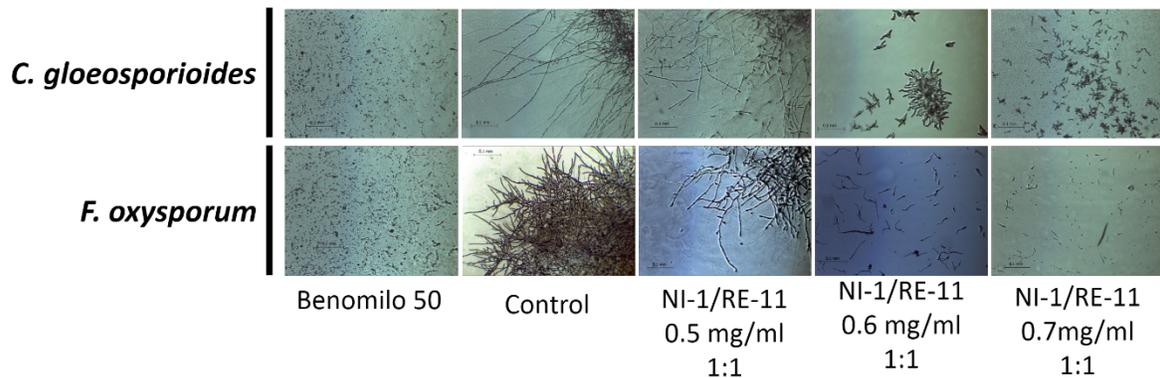


Figura 38. Acción sinérgica de los filtrados de la cepa NI-1 y RE-11 sobre la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*. 500 esporas se inocularon en medio PDA colocado sobre un portaobjetos y se trataron con los filtrados mezclados en relación 1:1 para formar una concentración final de 0.5, 0.6 y 0.7 mg/ml. Las esporas se observaron en un microscopio Leica DM750 a un objetivo 10X y las imágenes se capturaron a las 24h tras la aplicación de los filtrados. El benomilo se usó como control positivo a las concentraciones que indica el proveedor (1 mg/ml).

Al mezclar los filtrados, se incrementó el efecto sobre la inhibición de germinación de las esporas en los dos fitopatógenos; a una concentración de 0.6 mg/ml la inhibición de las esporas fue notablemente mayor a la presentada en el control y con concentraciones menores, así mismo, la mayor inhibición se mostró a partir de una concentración de 0.7 mg/ml y en niveles similares, aunque en ningún caso supero la inhibición obtenida con el tratamiento benomilo.

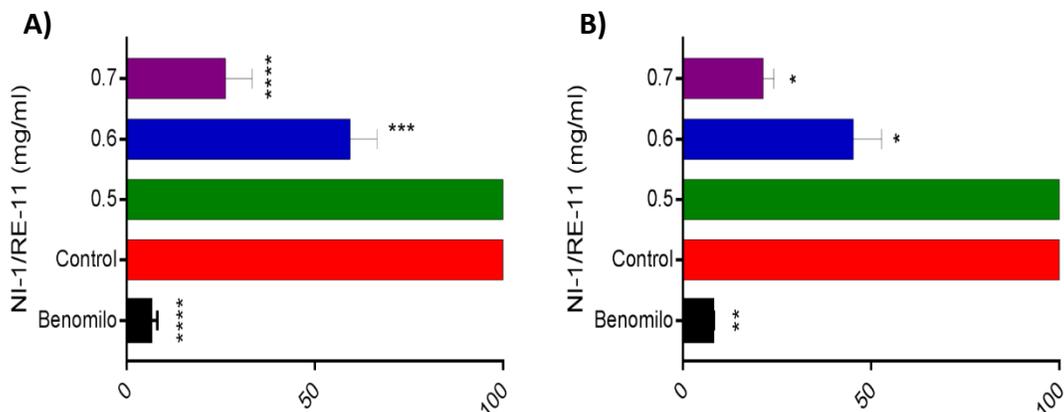


Figura 39. Inhibición de germinación de esporas utilizando una mezcla de filtrados de las cepas NI-1 y RE-11. A) Germinación de esporas de *C. gloeosporioides*. B) Germinación de esporas de *F. oxysporum*. Se tomó con valor de 100% cuando se notaba la presencia de un micelio bien definido. 5 réplicas por ensayo. Prueba de Friedman $P < 0.05$. Prueba de Dunnet para comparación entre tratamientos. * denota medias estadísticamente diferentes al control.

7.10 Perfil metabólico de los filtrados de las cepas NI-1 y RE-11.

Se realizó una Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM) para determinar el perfil metabólico de las cepas NI-1 y RE-11. Para la cepa NI-1 se determinó la presencia de 11 compuestos, los cuales de acuerdo a la literatura son secretados al medio y son metabolitos volátiles (Tabla 4). Así mismo

Compuesto	Probabilidad (%)	Tiempo de retención (m)	Relación m/z	Bioactividad	Referencia
-----------	------------------	-------------------------	--------------	--------------	------------

con los cromatogramas se determinó que en el medio de cultivo PDB, los metabolitos más abundantes son acetamidas (N-Hidroximetil fluoroacetamida y Trifluoroacetamida) (Figura 40) y el 6-Pentyl- α -pirona, este último es el metabolito característico de *Trichoderma*. En esta cepa también se percibe un olor a coco, consistente con la presencia del metabolito volátil 6-Pentyl- α -pirona (Figura 41). Algo interesante de los metabolitos detectados con la cepa NI-1 es que la mayoría están involucrados en actividad antimicrobiana. Aunque no se tenga establecido un punto de cohorte mínimo para establecer la identidad de una molécula, muchos metabolitos de la cepa NI-1 obtuvieron valores de probabilidad con base en similitudes menores a 20%: el 2-Hidroxi- γ –butirolactona (15.5%), el Ácido 3,6-Octadecadinoico (12%) y el Butiraldehído (8.7%) (Figura 41) (Tabla 5). Aunado a las probabilidades, el número de picos de la relación masa-carga (m/z) de las moléculas detectados mediante la espectrometría de masas concuerda con los picos de referencia presentes en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), lo que incrementa las probabilidades de haber identificado los metabolitos correctamente.

Tabla 5. Metabolitos volátiles de la cepa NI-1 obtenidos tras el análisis CG-EM. Los metabolitos se obtuvieron de cultivos incubados 96h a 28°C en medio PDB. 3 réplicas.

N-Hidroximetil fluoroacetamida	74.3	1.54	51	Precursor de fungicidas	(Lehmann et al., 2010;; Wu et al., 2017a)
Trifluoroacetamida	79.4	2.267	27		
Chlorodifluoroacetamida	69.4	10.485	68		
2-Formilhistamina	63	7.102	37	Fungicida. Agente quelante de Níquel	(Borgers, 1980; Jit Sud and Feingold, 1981; Ouedraogo et al., 2013)
6-Pentyl-α-pirona	56.6	10.507	59	Fungicida. Promotora de crecimiento vegetal	(Bonnarme et al., 1997; Lee et al., 2016; Prasun K. Mukherjee et al., 2012)
2,3-Butanediol	38.8	2.538	35	Molécula elicitora y actividad fungicida	(Humphris et al., 2002; Moya, 2017; Siddiquee et al., 2012; Ubaid et al., 2017; Yi et al., 2016)
2-Hidroxi-γ-butirolactona	15.5	3.665	55	Actividad antimicrobiana y anticancerígena.	(Balde et al., 2010; Leylaie and Zafari, 2018; Muir, 2015; Vinale et al., 2006a; Zhang et al., 2018)
Ácido 2,3-Dimetilfumarico	56	4.37	70	Modulador de pH ambiental. Solubilizador de fosfatos.	(Altomare et al., 1999; Herrera-Parra et al., 2017; Vinale et al., 2014)
Ácido 3,6-Octadecadinoico	12	4.533	86	Fungicida	(Banaras et al., 2017; Pohl et al., 2011; Srinivasa and Devi., 2014)
4H-Piranona. 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	72.7	5.172	31	Antimicrobiano. Antiproliferativo.	(Saad, 2016; Velayutham and Karthi, 2015)
Butiraldehido	8.7	7.026	69	Fungistático	(Hung, 2014; Osorio-Hernández et al., 2009; Qiu et al., 2018)

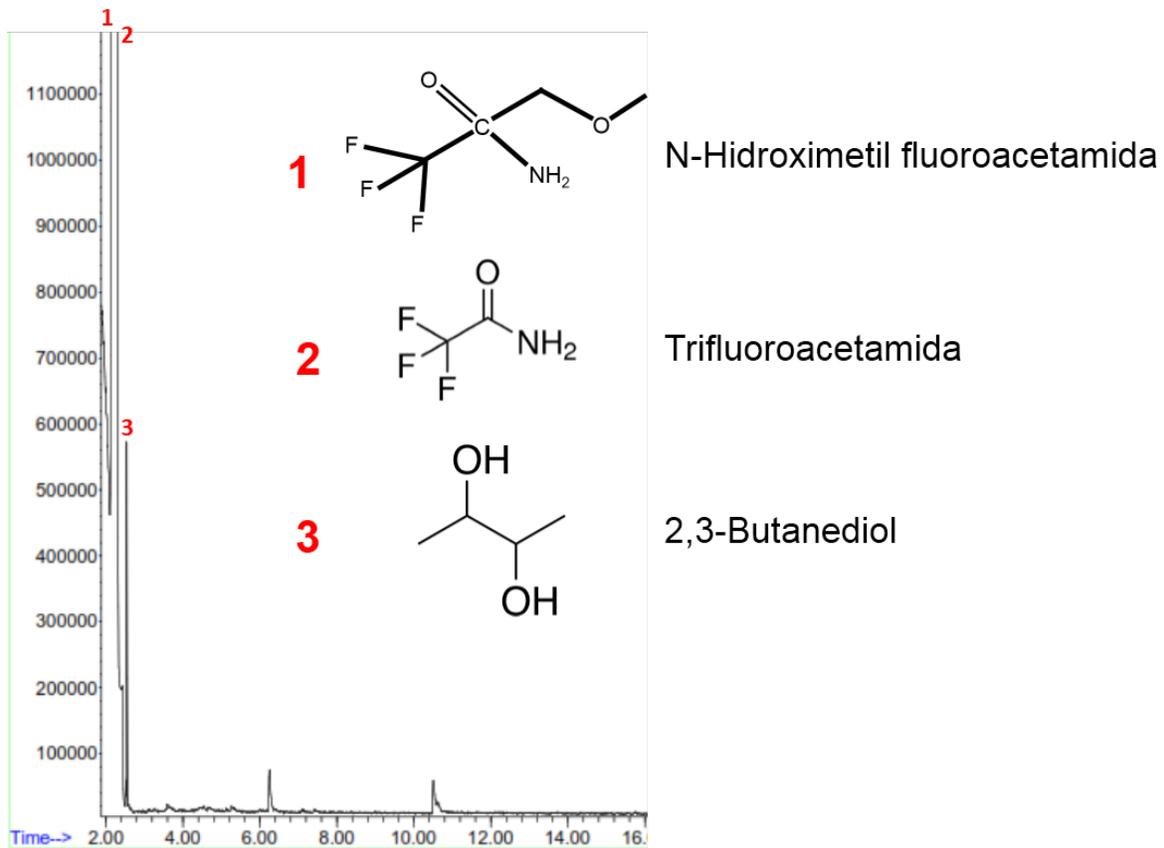


Figura 40. Primera sección del cromatograma de la cepa NI-1. Análisis por CG-EM del filtrado de la cepa NI-1. En el eje X se muestra el tiempo de retención de la molécula detectada y en el eje Y la abundancia de la molécula en la mezcla. La molécula correspondiente a cada pico está indicado por un número rojo. Solo se presentan los primeros tres compuestos, los cuales fueron los más abundantes. Los filtrados se obtuvieron tras incubar la cepa NI-1 en medio PDB a 28°C en iluminación y agitación constante (120 rpm) durante 96 horas.

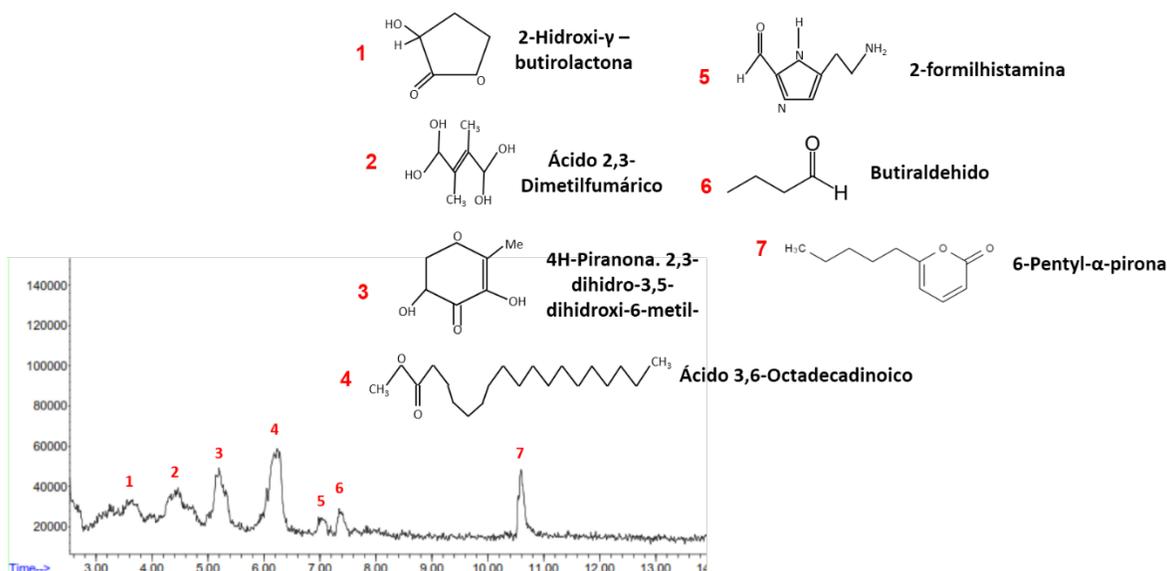


Figura 41. Segunda sección del cromatograma de la cepa NI-1. Análisis por CG-EM del filtrado de la cepa NI-1. En el eje X se muestra el tiempo de retención de la molécula detectada y en el eje Y la abundancia de la molécula en la mezcla. La molécula correspondiente a cada pico está indicado por un número rojo. Los filtrados se obtuvieron tras incubar la cepa NI-1 en medio PDB a 28°C en iluminación y agitación constante (120 rpm) durante 96 horas.

Así mismo, en la cepa RE-11 se determinó la presencia de 13 compuestos volátiles y no volátiles. En este caso los metabolitos más abundantes fueron dos acetamidas (N-Hidroxmetil fluoroacetamida y Trifluoroacetamida) (Tabla 6) (Figura 42), similar a lo que ocurrió con la cepa NI-1. En esta cepa también se detectaron metabolitos antimicrobianos, sin embargo en esta cepa no se detectó la presencia de 6PP, aunque también hay compuestos compartidos entre las dos cepas, como la 2-Formilhistamina, además de que hay moléculas únicas de la cepa RE-11 como lo es el Ciclopentanol (Figura 43). Como con la cepa NI-1, existen moléculas con valores de probabilidad bajos (<20%) como el Succinialdehído, el ácido 3,6 Octadecadinoico, el ciclopentanol, y la Isoxazolidina, sin embargo los picos de la relación masa-carga (m/z) coinciden con los presentados en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Resalta que la cepa excrete ácido acético, lo que explicaría la coloración amarillenta del PDA tras 96 horas de crecimiento del hongo (Figura 21 y 43) (Tabla 6).

Tabla 6. Metabolitos volátiles de la cepa RE-11 obtenidos tras el análisis CG-EM. Los metabolitos se obtuvieron tras 96h de incubación de la cepa en medio PDB. 3 réplicas.

Compuesto	Probabilidad (%)	Tiempo de retención (m)	Relación m/z	Bioactividad	Referencia
N-Hidroxmetil fluoroacetamida	66.2	1.54	51	Precursor de fungicidas	(Lehmann et al., 2010; Wu et al., 2017a)
Trifluoroacetamida	59.5	1.995	27		
Succindialdehido	19	3.481	62	No determinada	
Ácido 3,6 Octadecadinoico	8.09	4.554	86	Fungicida	(Banaras et al., 2017; Pohl et al., 2011; Srinivasa and Devi., 2014)
Ácido 2,3-Dimetilfumarico	38.1	4.5	70	Modulador de pH ambiental. Solubilizador de fosfatos.	(Altomare et al., 1999; Herrera-Parra et al., 2017; Vinale et al., 2014)
Dimetilpentanol	19	5.01	17	Actividad antimicrobiana	(Zubair et al., 2017)
4H-Pirazona. 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	81.8	5.172	31	Antimicrobiano. Antiproliferativo.	(Saad, 2016; Velayutham and Karthi, 2015)
Dianhidromanitol	69.9	6.17	65	Fuente de carbono de reserva. Tolerancia a estrés.	(Ruijter et al., 2003)
Isoxazolidina	13.3	7.069	23	Antimicrobiano. Fungicida	(Dilesh et al., 2012; Jayashankara and Rai, 2008; Priya et al., 2006; Sternberg et al., 2001)
Ácido acético	59	15.776	25	Fungicida. Actividad como fitohormona	(Martínez, 2012; Nieto-Jacobo et al., 2017)
2-Formilhistamina	23.7	3.513	37	Fungicida. Agente quelante de Níquel	(Borgers, 1980; Jit Sud and Feingold, 1981; Ouedraogo et al., 2013)
Butiraldehido	23.1	2.613	47	Fungistático	(Hung, 2014; Osorio-Hernández et al., 2009; Qiu et al., 2018)
2-Hidroxi-γ-butirolactona	21.2	3.611	55	Actividad antimicrobiana y anticancerígena.	(Balde et al., 2010; Leylaie and Zafari, 2018; Muir, 2015; Vinale et al., 2006a; Zhang et al., 2018)

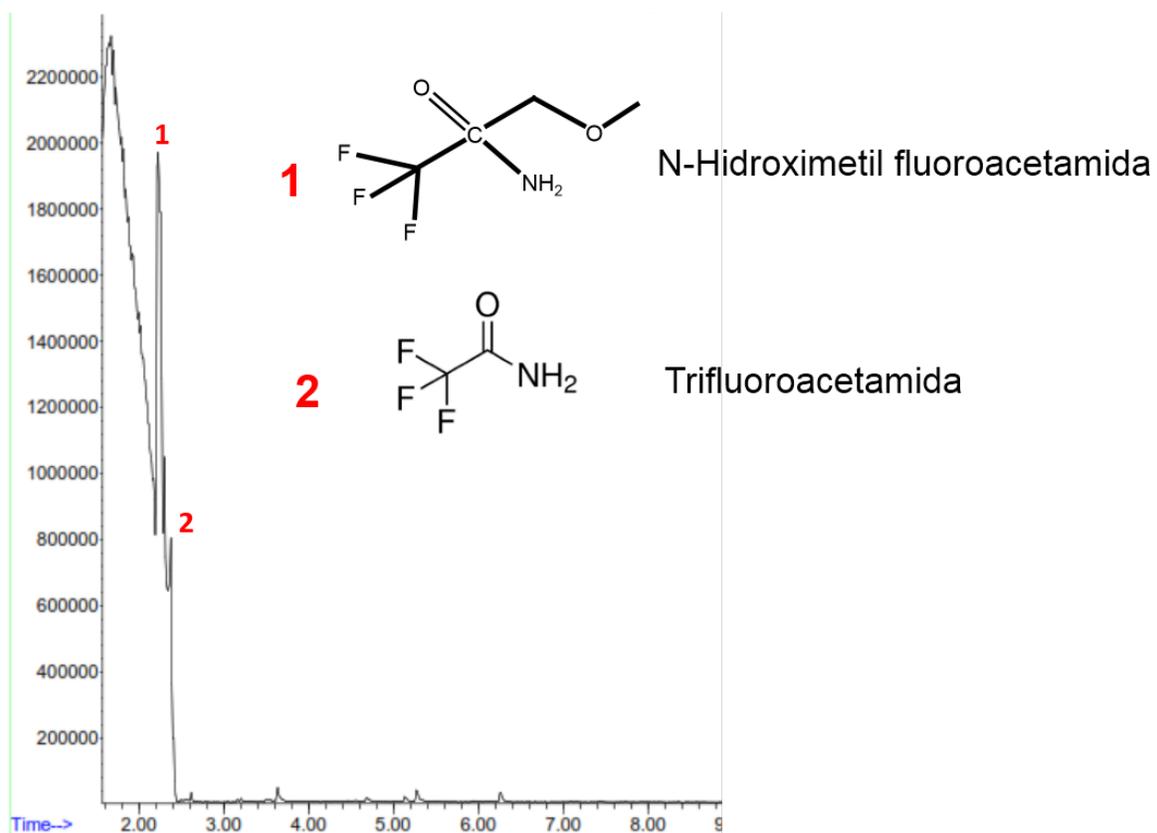


Figura 42. Primera sección del cromatograma de la cepa RE-11. Análisis por CG-EM del filtrado de la cepa RE-11. En el eje X se muestra el tiempo de retención de la molécula detectada y en el eje Y la abundancia de la molécula en la mezcla. La molécula correspondiente a cada pico está indicado por un número rojo. Solo se presentan los primeros dos compuestos, los cuales fueron los más abundantes. Los filtrados se obtuvieron tras incubar la cepa RE-11 en medio PDB a 28°C en iluminación y agitación constante (120 rpm) durante 96 horas

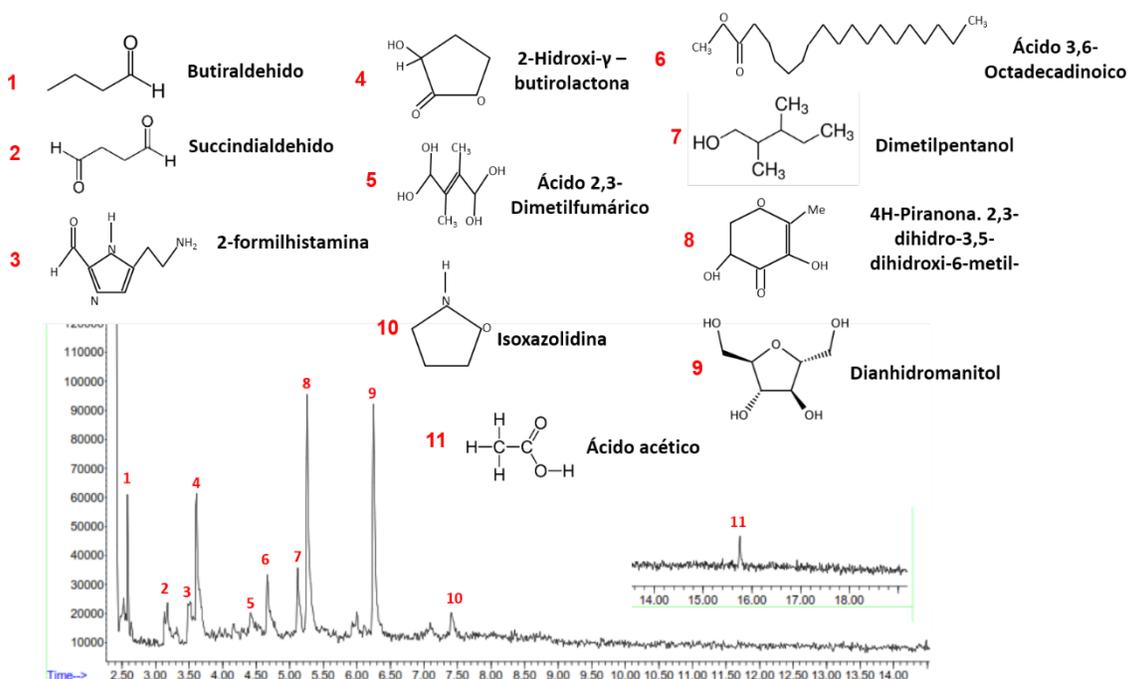


Figura 43. Segunda sección del cromatograma de la cepa RE-11. Análisis por CG-EM del filtrado de la cepa RE-11. En el eje X se muestra el tiempo de retención de la molécula detectada y en el eje Y la abundancia de la molécula en la mezcla. La molécula correspondiente a cada pico está indicado por un número rojo. Los filtrados se obtuvieron tras incubación de la cepa RE-11 en medio PDB a 28°C en iluminación y agitación constante (120 rpm) durante 96 horas.

7.11 Sensibilidad a higromicina B en las cepas NI-1 y RE-11

Actualmente se han desarrollado diversas técnicas moleculares para realizar manipulación genética del género *Trichoderma*. Uno de los marcadores de selección más utilizados es el gen *hph*, que codifica la higromicina B fosfotransferasa de *Escherichia coli*. Este gen ha sido modificado para su utilización como marcador de selección en hongos, confiriendo resistencia a la higromicina B. Dado que las cepas CBS 433.97 y TR356 de *T. asperellum* (Proyecto JGI ID: 403726) y la cepa POS7 de *T. koningiopsis* (Bioproyecto: PRJNA356137) ya fueron secuenciadas (Castrillo et al., 2017; Druzhinina et al., 2018), se evaluó su sensibilidad a higromicina B, el cual puede ser utilizado como marcador de selección para posteriores ensayos de biología molecular, y de esta manera modificar genéticamente a las cepas en cuestión. Las dos cepas mostraron sensibilidad al antibiótico, la cepa RE-11 resultó ser más sensible que la

cepa NI-1; se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) para la cepa NI-1 con 100µl/ml, mientras que la CIM de la cepa RE-11 se fue de 50µl/ml (Figura 40).

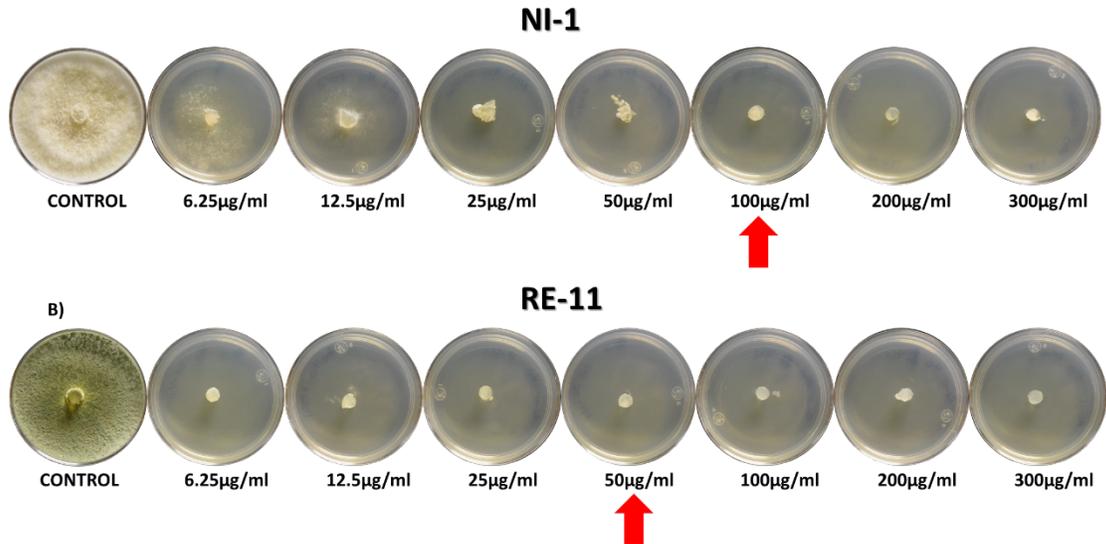


Figura 44. Sensibilidad de las cepas NI-1 y RE-11 a higromicina B. Las cepas de *Trichoderma* A) NI-1 y B) RE-11 se inocularon en medio PDA y se incubaron a 28°C en iluminación constante por 48 horas. Flechas rojas indican la concentración mínima inhibitoria (CMI)

8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación y biodiversidad de los aislados de *Trichoderma*

La mayor cantidad de cepas de *Trichoderma* se aislaron de tierra proveniente de municipios sin mucha producción agrícola como lo es Pinal de los Amoles y Toluimán (SAGARPA y SFA, 2011), lo cual sugiere que en zonas donde la agricultura no es tan tecnificada, la diversidad de aislados es mayor.

Respecto a la utilización de dos protocolos para la extracción de ADN genómico para la identificación de los aislados, se observó que aunque el protocolo propuesto por Vázquez-Angulo y colaboradores (2012) disminuye el tiempo de extracción y la cantidad de reactivos, la calidad y concentraciones de ADN fueron muy bajas, en contraste con el protocolo de Raeder y Broda, esto pudo deberse a la cantidad de biomasa utilizado, ya que en el protocolo de Raeder y Broda se utiliza un aproximado de 12 cm² de micelio, mientras que en el protocolo de Vázquez-Angulo se utilizan únicamente 2 cm² de micelio.

Al realizar los análisis filogenéticos correspondientes se encontró una mayor claridad al momento de separar las cepas en distintas especies, como lo indica Druzhinina y colaboradores (2012) al delimitar al clado Longibrachiatum utilizando arboles concatenados; ya que de usar solo el marcador ITS se hubieran identificado 8 cepas, mientras que utilizando los arboles concatenados se identificaron 10 especies, lo que indica que la utilización de árboles concatenados fue la mejor opción para identificar y delimitar especies en el género *Trichoderma* (Gadagkar et al., 2005; Kullnig-Gradinger et al., 2002).

De manera general se identificaron mediante los análisis previos, al menos 10 especies. La especie más prevalente se trata de *T. viride*, aislada principalmente de la zona centro del estado. Esto probablemente debido a que al ser la zona agrícola más importante del estado, la degradación del suelo es mayor, lo que disminuye la biodiversidad general de microorganismos (Mishra and Whattal-Dhar, 2004; Wachira et al., 2014). La segunda y tercera especie más prevalentes

fueron *T. koningiopsis* y *T. harzianum* (24 y 17 cepas respectivamente) que son cepas ampliamente distribuidas alrededor del estado.

Cabe destacar que es el primer trabajo en determinar la biodiversidad total de las especies de *Trichoderma* presentes en el estado de Querétaro, sin embargo existen pocos trabajos enfocados en determinar la riqueza biológica de ese género en este país. Al depurar los datos encontramos cepas de *Trichoderma* que ya fueron aisladas e identificadas en otros estados de México (Tabla 3), sin embargo también se identificaron cepas que no han sido descritas anteriormente de acuerdo a la literatura, por lo que serían nuevos registros para el país, como lo es *T. capillare*, *T. cerinum*, *T. atrobrunneum* y *T. tomentosum*.

Así mismo, se calculó el índice de biodiversidad de Margaleff de acuerdo a la distribución de los individuos presentes en relación a la cantidad de sitios de colectas. Este tuvo un valor $D_{Mg} = 3.85$, la cual es mayor a la reportada en estudios previos en el país, por ejemplo en el agrosistema de cacao en el estado de Tabasco se tuvo una $D_{Mg} = 1.75$ (Torres-De la Cruz et al., 2015); en la región de los Altos Sur de Jalisco se tuvo una $D_{Mg} = 0.71$ (Sánchez and Rebolledo, 2010); es posible que la diversidad biológica de este género este asociado a la gran cantidad de ecosistemas y climas presentes en el estado (de la Llata-Gómez et al., 2006; Instituto Nacional de Estadística y Geografía-México and GEQ, 2017).

8.2 Antagonismo de los aislados de *Trichoderma* y caracterización de las cepas NI-1 y RE-11

Las especies a las que corresponden los aislados han demostrado ser excelentes agentes de control biológico contra distintos hongos fitopatógenos, así como tener propiedades benéficas para las plantas (Carrero-Carrón et al., 2016; Castrillo, 2016; El Komy et al., 2015; Kong and Hong, 2017; Mbarga et al., 18-22; Sánchez et al., 2015), incluso algunos de ellos ya comercializados (Botero et al., 2015; Trillas et al., 2006), por lo que los aislados en este trabajos son promisorios agentes de control biológico. Además se observa que en ambos casos, la cepa RE-11 pigmenta el medio de cultivo en tonalidades amarillentas (Figura 17),

producto de la liberación de metabolitos secundarios cristalizados (Mohammad et al., 2011; Sun et al., 2016).

Enfocándonos en la cepa NI-1 y la cepa RE-11, observamos que las cepas tienen preferencia por un mejor desarrollo en medio de cultivo PDA, que en medios mínimos suplementados con diferentes fuentes de carbono (Figura 19), concordante con lo mencionado por Nieto-Jacobo y colaboradores (2017) indican que al ser un medio completo, con una mayor cantidad y diversidad de fuentes de carbono y nitrógeno, se optimiza el crecimiento de *Trichoderma* (Nieto-Jacobo et al., 2017). Respecto a la viabilidad de la producción a gran escala de potenciales biofungicidas, es de considerar, ya que respecto al medio mínimo de Vogel's, el medio PDA es más costoso, aunque en sus ventajas está el inducir la mayor cantidad de vías metabólicas de *Trichoderma* para la secreción de metabolitos secundarios.

El que la inhibición por parte de los metabolitos de *Trichoderma* sea más efectiva al inducirlos en medios completos es algo que ya se había comentado en otros ensayos, al evaluar la eficacia de la producción de diferentes metabolitos secundarios de *Trichoderma* al crecer el hongo en medio PDB o medio Czapek, posiblemente debido a que estos medios contienen el pH ideal para la biosíntesis de los fungicidas, así como grandes fuentes de carbono (Evidente et al., 2003; Nieto-Jacobo et al., 2017; Shokri and Emtiazi, 2010). Estas características impactan en la biosíntesis de ácido indol-acético, moléculas tipo auxinas y pironas. Además se sabe que el crecer a *Trichoderma* en medio Murashige y Skoog (MS) también permite una gran biosíntesis de 6PP (Garnica-Vergara et al., 2016).

8.3 Actividad antifúngica de filtrados

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares al trabajo de Rothmann (2006), en el que indica que los metabolitos secundarios con actividad antagónica de una cepa de *T. harzianum* son secretados durante la fase exponencial tardía y en la fase estacionaria. Así mismo, la literatura indica que la mayor actividad biosintética de metabolitos por *Trichoderma* y de otros hongos ocurre durante la

fase estacionaria de cultivo; *Streptomyces hygroscopicus* es capaz de secretar metabolitos durante la fase exponencial que inhiben significativamente el desarrollo de *R. solani* y de *S. rolfii* (Prapagdee et al., 2008). De igual manera, se ha visto que existe una mayor concentración de celulasas, pectinasas, amilasas, quitinasas y glucanasa β -1,3 durante la fase exponencial de crecimiento de *T. viride* (Naglot et al., 2015). Aunque en este trabajo se observó una inhibición por metabolitos durante la fase exponencial en los ensayos de antibiosis, los ensayos de antibiosis en medio sólido fueron más eficientes; sugiriendo que la producción de metabolitos secundarios secretados al medio de cultivo es favorecida en un medio sólido, aunque no podemos descartar que bajo estas condiciones las cepas de *Trichoderma* producen otros metabolitos con mayor actividad antagónica. Diferentes autores refieren a que el soporte es esencial para la secreción de moléculas en distintos hongos; Romero-Gómez y colaboradores (2000) incrementaron la tasa de producción de invertasa por parte de *Aspergillus niger* en un cultivo semisólido, aunque los niveles de producción fueron mayores en un medio sólido. Así mismo afirman que la mayor productividad en la secreción de la enzima se debía a un mejor crecimiento por parte del hongo. Sin embargo para fines biotecnológicos, la separación de moléculas de medio semisólido resulta más rentable (Romero-Gómez et al., 2000).

La cepa NI-1 correspondiente a *T. asperellum* tuvo actividad antagónica en contra de hongos fitopatógenos, como se ha abordado en otros estudios (Carrero-Carrón et al., 2016; El Komy et al., 2015; Mbarga et al., 18-22); sin embargo el antagonismo fue mayor al aplicar el filtrado directamente sobre el micelio. Yang y Xu (2013), obtuvieron resultados similares en el antagonismo aplicando los filtrados suplementados en placa, ya que una cepa de *T. asperellum* no tuvo niveles de inhibición tan significativos. Sin embargo en un ensayo realizado por Hamed y colaboradores (2015), los filtrados de una cepa de *T. asperellum* si inhibieron de manera significativa el desarrollo de *F. oxysporum*, *S. rolfii* y *F. solani*, siendo incluso más inhibitorio que otras cepas de *Trichoderma*. De igual manera una aplicación directa sobre el micelio de *F. oxysporum* y *R. solani* de filtrados de *T. asperellum* fue de las mejores estrategias para el control de estos

hongos. Así mismo, en otros estudios encuentran que la aplicación de filtrados de cepas de *T. asperellum* pueden ser utilizados para el control de patógenos post cosecha, como lo menciona el trabajo de Alka y Prajapati (2017), en el que los filtrados de *T. asperellum* inhiben hasta en un 75% el desarrollo de *Rhizopus oryzae*. Se conoce que los filtrados de *T. asperellum* contienen precursores de moléculas antimicrobianas o moléculas ya bioactivas que pueden dañar la estructura de la pared celular de fitopatógenos (Tondje et al., 2007; Wu et al., 2017a). La aplicación de los filtrados sobre el micelio coincide con la observación de Claydon y colaboradores (1987), en la que menciona que el mejor método para la inhibición de fitopatógenos es a través del contacto directo del micelio y las estructuras reproductivas con las moléculas antibióticas.

Así mismo, trabajos sobre la inhibición de hongos fitopatógenos con *T. koningiopsis* ya se han realizado teniendo resultados prometedores (Castrillo, 2016; Kong and Hong, 2017); sin embargo respecto al análisis de las moléculas secretadas por este hongo, resaltan las koningininas, de las que se les atribuye una gran actividad antimicótica en contra de *F. oxysporum*, *Fussarium flocciferum*, entre otros (Hu et al., 2017; McMullin et al., 2017). Respecto a los experimentos utilizando los filtrados de este hongo sobre fitopatógenos, se sabe que es capaz de inhibir el desarrollo de *B. cinerea* al aplicarlo directamente en fruto o en micelio, y que incluso es capaz de inhibir la germinación de esporas (Li et al., 2016). En contraste con los resultados obtenidos por Zafari y colaboradores (2008) la cepa *T. koningiopsis* producía más metabolitos antifúngicos, esto puede deberse debido a las características de la cepa, ya que entre la misma especie no todas las cepas secretan el mismo metabolito o la misma concentración (Harman et al., 2012; Reino et al., 2008), o también puede deberse a que el tiempo máximo de filtrado en su estudio fueron las 48h, tiempo en el que en nuestros ensayos tampoco se observaba una variación en el crecimiento de los diferentes hongos fitopatógenos (Figura 28). De igual manera, ya se han observado ensayos en el que los filtrados de *T. koningiopsis* son efectivos en contra del desarrollo de hongos fitopatógenos, en especial si estos están en contacto con micelio vegetativo de *Sclerotium rolfsii* y *Verticillium dahliae* (Isaias et al., 2014). De igual manera se sabe que una de las

cepas de *Trichoderma* más efectivas para el control de una gran gama de hongos fitopatógenos, *Trichoderma sp.* H921 (una cepa afin a *T. koningiopsis*), es capaz de secretar un gran arsenal de precursores antimicrobianos y enzimas hidrolíticas que afectan el desarrollo de *Magnaporthe oryzae* (Nguyen et al., 2016), que es el fitopatógeno con mayor importancia agrícola (Dean et al., 2012), por lo que la confrontación en contra de nuevos fitopatógenos es importante para conocer si tiene niveles de antagonismo similares a la cepa H921.

En el caso de la germinación con esporas, los filtrados parecen tener un efecto fungistático como se mencionó previamente, lo que comprueba que los filtrados están compuestos de moléculas orgánicas de fácil degradación, por lo que deben de ser aplicadas continuamente para observar la nula germinación y viabilidad de las esporas. Contrastan los resultados obtenidos con los de otros estudios en el que las esporas si inhiben la viabilidad de las esporas (Nguyen et al., 2016; Thi et al., 2012). Resalta el hecho de que las esporas de *C. gloeosporioides* se inhiban más con el filtrado de la cepa RE-11, mientras que las esporas de la cepa *F. oxysporum* se inhiban más con el filtrado de la cepa NI-1, por lo que un efecto sinérgico entre los filtrados de estas cepas podría incrementar el intervalo de cepa sobre las que el filtrado podría actuar.

8.4 Efecto antifúngico de filtrados liofilizados

Los metabolitos filtrados de las cepas NI-1 y RE-11 mostraron tener una tenue actividad fungicida, probablemente debido a que las moléculas activas se encontraban diluidas en el medio de cultivo PDB, por lo que se procedió a concentrar los metabolitos. Se ha reportado que la liofilización es un método para concentrar y conservar una gran cantidad de proteínas y metabolitos secundarios, como pueden ser pigmentos, terpenos, carbohidratos, entre otros (Carpentier et al., 2007; de Castro and Izquierdo, 1990). Antes de la liofilización, las muestras se sometieron a un proceso de rápida congelación utilizando nitrógeno líquido con dos objetivos: 1) mantener estructuralmente a los metabolitos y prevenir su degradación (de Castro and Izquierdo, 1990; Haukaas et al., 2016; Lubbe et al., 2013) y 2) provocar la formación de cristales de hielo intracelular que mate a las

células presentes en el filtrado, y obtener mezclas estériles (Farrant et al., 1977; Sheets, 2015).

Estudios previos concuerdan en la utilización de compuestos liofilizados para incrementar la eficacia de metabolitos de *Trichoderma* para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos. Eziashi y colaboradores (2010) utilizan toxinas producidas por diferentes especies de *Trichoderma* para el control de *Ceratocystis paradoxa*, sin embargo en este trabajo se utilizaron concentraciones a partir de los 0.2 g/ml, a partir del cual se comenzaba a observar un efecto sobre el crecimiento del fitopatógeno. En contraste, los filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 tienen una mayor actividad antagónica (partir de 0.4 y 0.5 mg/ml), aunque esto probablemente debido a la presencia de más moléculas con actividad fungicida. Así mismo, en el trabajo de Eziashi y colaboradores (2010) colocan el liofilizado directamente sobre el disco de micelio de *C. paradoxa*, tal y como se realizó en este trabajo para asegurar el contacto directo entre la molécula fungicida con las hifas del fitopatógeno.

Así mismo, nuestros resultados son similares a los presentados por Mutawila y col. (Mutawila et al., 2016a) en el que observan una clara inhibición de 4 fitopatógenos de vid a partir de 0.5 mg/ml de 6PP, además de que el 6PP aislado de las cepas de *Trichoderma* que utilizaron tienen un comportamiento dosis dependiente, algo similar a lo que pasó en nuestro trabajo en el que los filtrados de las cepas NI-1 y RE-11 también tienen este comportamiento. En el trabajo de Dutta y colaboradores (2018) trabajaron con *R. solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum capsici* y *S. sclerotiorum* de igual manera observaron una inhibición a partir de 0.5 mg/ml, así como un comportamiento inhibitorio dosis dependiente, por lo que la utilización de filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 a concentraciones superiores a 1 mg/ml pueden inhibir por completo el crecimiento de hongos fitopatógenos.

En el trabajo realizado por Jana y Mandal (2017), observaron una inhibición de *S. rolfsii* utilizando filtrados de *Trichoderma* a partir de 50 mg/ml, mientras que en nuestro trabajo *S. rolfsii* se inhibió a partir de 0.2 mg/ml, observando la mayor inhibición a 1 mg/ml en el caso de la cepa RE-11 y 0.7 mg/ml con la cepa NI-1. En

otros ensayos observan una inhibición de *F. oxysporum* a partir de los 50 mg/ml (PETRIŞOR et al., 2017), mientras que los metabolitos producidos por las cepas RE-11 y NI-1 los inhiben a partir de los 0.2 mg/ml y 0.4 mg/ml, por lo que las cepas RE-11 y NI-1 son interesantes ya que producen una gran cantidad de metabolitos con actividad fungicida capaces de inhibir el desarrollo de fitopatógenos a concentraciones muy bajas.

Así mismo, los filtrados de las cepas RE-11 y NI-1 retardan el crecimiento de las esporas de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* a los 0.6 y 0.7 mg/ml respectivamente, una concentración menor a la reportada en trabajos previos: Sakpetch y colaboradores (2018) utilizaron concentraciones de entre 5 mg/ml de un filtrado de una cepa de *T. asperellum* para inhibir la germinación de esporas de *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliformwase* y *Rigidoporus microporus*; sin embargo comparado con fungicidas comerciales estos no son capaces de inhibir la germinación de esporas o deformarlas (Chiocchio et al., 2000), por lo que la utilización de filtrados debe realizarse de manera concentrada y continua (Dutta et al., 2018).

El uso de los metabolitos concentrados es una estrategia que ayuda a incrementar la efectividad del control biológico, sin embargo la concentración utilizada en estos experimentos *in vitro* no coincide con ensayos *in vivo*, por lo que realizar ensayos de control biológico en suelo con las cepas RE-11 y NI-1 implicaría utilizar concentraciones más altas que las reportadas en este trabajo. De igual manera para incrementar la concentración de metabolitos secretados por las cepas RE-11 y NI-1, estos se deben de estimular con micelio de fitopatógenos, ya que las concentraciones de metabolitos pueden incrementarse hasta el doble que su secreción basal (F. Vinale et al., 2009).

8.5 Metabolitos de *Trichoderma* analizados a través de CG-EM

El metabolismo anabólico tiene como función el sintetizar moléculas funcionales aprovechando la energía liberada durante el metabolismo catabólico. *Trichoderma* aprovecha la energía liberada producto de la vía glicolítica para catabolizar

carbohidratos, y de esta manera producir macromoléculas y un gran arsenal de metabolitos secundarios: peptaiboles, piperazinas, terpenos, pironas, poliquetidos, sideróforos, entre otros (Bansal and Mukherjee, 2016; Nascimento Silva et al., 2014). Se sabe que bajo condiciones normales, la glucosa es la fuente de carbono más utilizada por *Trichoderma* que entra directamente a la glicolisis (P. K. Mukherjee et al., 2012; Nascimento Silva et al., 2014), sin embargo la mayoría de sus metabolitos secundarios provienen de vías metabólicas alternas, principalmente a través de la degradación de carbohidratos (Nascimento Silva et al., 2014), como los presentes en el extracto de papa, que es uno de los componentes de los medios de cultivo PDB y PDA, que fueron los más apropiados para producir una gran cantidad de moléculas fungicidas.

Desde una perspectiva genética, *Trichoderma* se considera una biofábrica para la biosíntesis de moléculas antimicrobianas, por lo que se han realizado grandes avances sobre la biosíntesis de estos compuestos desde una perspectiva genética y genómica (Karimi-Aghcheh et al., 2013; P. K. Mukherjee et al., 2012; Zeilinger et al., 2016). En diferentes hongos se sabe que un regulador maestro para la síntesis de metabolitos secundarios es la histona-metiltransferasa LAE1, el cual trimetila histonas en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) (Karimi-Aghcheh et al., 2013, p. 1), asociado a un estado transcripcional activo de diferentes genes, incluidos los relacionados a la síntesis de metabolitos secundarios y el metabolismo de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Karimi-Aghcheh et al., 2013), entre ellos el factor de transcripción Tcht1, el cual regula la síntesis del 6-pentil- α -pirona (6PP) (P. K. Mukherjee et al., 2012; Zeilinger et al., 2016).

En este trabajo se determinó que los principales metabolitos secretados de las cepas NI-1 y RE-11 fueron las acetamidas, las cuales ya se les ha caracterizado como precursores de la síntesis de fungicidas en *T. asperellum* (Wu et al., 2017b). Además las acetamidas son parte fundamental para la regulación de su desarrollo y crecimiento, ya que están involucradas directamente en la biosíntesis de la auxina Indol-3-ácido acético (IAA). Las acetamidas son precursores directas de las biosíntesis de IAA (Lehmann et al., 2010, p.), por lo que las acetamidas que

secreta *Trichoderma* puede tener esa doble función: como precursor de fungicidas y ser además una fitohormona. Datos sobre la biosíntesis de acetamidas no han sido reportados.

En la cepa NI-1 otro de los principales metabolitos presentes en su filtrado fue el 6PP. Este fue el primer compuesto volátil con actividad antimicrobiana caracterizado en el género *Trichoderma* (Cardoza et al., 2005). El 6PP ejerce actividad fungicida en contra de diferentes hongos, como *R. solani*, *Fusarium spp.*, *B. cinérea*, entre otros (Cardoza et al., 2005; Lee et al., 2016; Vinale et al., 2006b). Este metabolito como su nombre lo indica tiene un dominio pentil el cual le confiere una alta lipofiliidad, por lo que es captado fácilmente por las membranas de las células de los hongos fitopatógenos, pudiendo afectar la membrana celular, la membrana del retículo endoplasmático o la membrana nuclear (Pezet et al., 1999; Poole and Whitaker, 1997). Además se sabe que la pérdida de este dominio pentil reduce drásticamente su toxicidad y la mortalidad de células de otros hongos (Poole and Whitaker, 1997).

El 6PP de la cepa NI-1 ya ha sido caracterizada previamente en algunas cepas de esta especie (*T. asperellum*) (Lee et al., 2016). Se cree que la biosíntesis de este metabolito ocurre a partir de reacciones, de las cuales la más importante en la β -oxidación de ácidos grasos (Serrano-Carreón et al., 1993). Se sabe que en el extracto de papa utilizado para la formulación del medio de cultivo PDA y PDB existe una alta concentración de ácido linoléico (Dobson et al., 2004; Galliard et al., 1975; Ramadan and Oraby, 2016), por lo que la cepa NI-1 captaría esta molécula para sintetizar el 6PP. Otra estrategia sería aprovechando la alta concentración de carbohidratos presentes en el medio, los cuales los incorporaría a la vía de degradación de fosfolípidos para sintetizar ácidos grasos, los cuales utilizaría para la biosíntesis del 6PP (Bremer et al., 1960).

Aunque en diferentes estudios se reporta como un metabolito fungicida, capaz de inhibir el desarrollo vegetativo de diferentes hongos en concentraciones dosis-dependientes (Mutawila et al., 2016b; Pezet et al., 1999), existen estudios que determinan que presenta una actividad fungistática (El-Hasan et al., 2007); similar

a lo que se observó en el desarrollo de este proyecto en el que los metabolitos de la cepa NI-1 tenían un efecto fungistático en el desarrollo de los cuatro hongos fitopatógenos evaluados.

Otros metabolitos presentes en las cepas RE-11 y NI-1 consisten en la 2-formilhistamina, que también es llamado imidazol, del que se ha caracterizado actividades antimicrobianas en diferentes hongos, principalmente levaduras, a través de la inhibición de la síntesis de ergosterol (Borgers, 1980; Jit Sud and Feingold, 1981), y por lo tanto daño en la membrana citoplasmática, y también como agente quelante de níquel (Nongmaithem et al., 2016). Además, se ha caracterizado una inhibición en la formación de estructuras reproductivas en hongos patógenos (Jit Sud and Feingold, 1981, 1981).

El ácido acético también es un metabolito ya caracterizado en una gran cantidad de especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. asperellum* y *T. koningiopsis* (Lee et al., 2016); esta molécula al ser secretada el medio puede alterar el pH ambiental (Martínez, 2012), por lo que *Trichoderma* podría restringir e inhibir el desarrollo de microorganismos con el fin de apoderarse de un nicho. Similares son los efectos producidos por el ácido fumárico secretado por la cepa NI-1 y RE-11, que modula el pH del suelo afectando el establecimiento de nematodos y hongos (Herrera-Parra et al., 2017; Vinale et al., 2014). Además el ácido fumárico es capaz de solubilizar fosfatos, haciéndolos biodisponibles para las células vegetales (Altomare et al., 1999).

El 2,3-butanediol es un metabolito volátil caracterizado en *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii* (Moya, 2017; Siddiquee et al., 2012), además de ser un metabolito secretado por cepas de *Bacillus subtilis* (Yi et al., 2016). Este metabolito se ha caracterizado por presentar una actividad antimicrobiana, inhibiendo el desarrollo de bacterias fitopatógenas y hongos fitopatógenos (*Serpula lacrymans*) (Humphris et al., 2002). Además, se le ha adjudicado una molécula elicitora capaz de inducir resistencia sistémica en plantas (Ubaid et al., 2017; Yi et al., 2016).

El ácido nicotínico es un metabolito caracterizado en *T. harzianum*, *T. viride* y *T. longibrachiatum* (Dahm y Ciesielska, 2009; Manganiello et al., 2018). Este se ha considerado como una molécula elicitora (Manganiello et al., 2018; Moscatiello et al., 2018), aunque se considera un metabolito que se secreta al existir la presencia de un planta (Dahm y Ciesielska, 2009), sin embargo, la cepa NI-1 no necesita de la presencia de células vegetales para secretarla.

Las lactonas son compuestos comunes en el género *Trichoderma*, aunque primero se caracterizaron en el género *Aspergillus* (Muiru, 2015; Zhang et al., 2018). Estos compuestos ya se han reportado en cepas de *T. asperellum* y se les ha adjudicado una actividad antiproliferativa y antimicrobiana (Balde et al., 2010; Leylaie and Zafari, 2018). El ácido 3,6-octadecadecanoico, se considera un metabolito con actividades fungicidas, además de ser caracterizado en diferentes cepas de *Trichoderma* (Banaras et al., 2017; Pohl et al., 2011; Srinivasa and Devi., 2014).

Los aldehídos constituyen uno de los principales metabolitos secundarios de las cepas de *Trichoderma*, estando conservados en diferentes especies (Hung, 2014; Qiu et al., 2018). En el caso de la cepa RE-11 y NI-1 se reportó la presencia de butiraldehído, así mismo en la cepa RE-11 también se detectó la presencia de succindialdehído, molécula caracterizada en *T. viride* y *T. asperellum* (Hung, 2014; Osorio-Hernández et al., 2009), y del que se ha reportado una actividad fungistática, ya que es un metabolito volátil de fácil disipación y degradación en el ambiente (Osorio-Hernández et al., 2009). En la cepa RE-11 se detectó dimetilpentanol e isoxazolidina, moléculas ampliamente caracterizadas como fungicidas (Dilesh et al., 2012; Jayashankara and Rai, 2008; Lee-Pei et al., 2018; Priya et al., 2006).

De manera general se observó que muchos metabolitos que secreta la cepa RE-11 y NI-1 presentan una actividad fungicida o fungistática, de acuerdo a lo reportado en otros estudios, sin embargo dicha actividad puede ser directa (6PP o el imidazol) o de forma indirecta (acidificando el medio). Así mismo estas cepas secretan moléculas que pueden ser aprovechadas por las plantas como fitohormonas o como compuestos elicitores.

9. CONCLUSIONES

El estado de Querétaro presenta una gran diversidad de cepas de *Trichoderma*, superior incluso a las presentes en otras regiones de México. Además se trata del primer estudio que determina las identidades de cepas de este género en la región.

Se implementó la reconstrucción filogenética utilizando una matriz con secuencias concatenadas para determinar las identidades, resultando en una mejor resolución al identificar 10 especies, mientras que al hacer los análisis sin concatenar las secuencias, las cepas se agrupaban solo en 8 especies distintas.

La gran cantidad de especies de *Trichoderma* puede estar correlacionada con la diversidad de climas y ecosistemas presentes en el estado, sin embargo no se tomaron muestras de suelo de todos los municipios del estado de Querétaro. La especie con mayor prevalencia en el estado se trató de *Trichoderma atroviride*.

Al realizar los ensayos de antagonismo con las cepas aisladas, solo dos de ellas tienden a secretar antimicóticos capaces de inhibir a *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *C. gloeosporioides* (>75%).

Al conjuntar los datos de los análisis filogenéticos con los datos de la antibiosis, se determinó que las cepas con mayor capacidad inhibitoria se tratan de *T. koningiopsis* (RE-11) y *T. asperellum* (NI-1).

Las cepas NI-1 y RE-11 son potenciales agentes de control biológico en contra de los fitopatógenos estudiados, además de que pueden ser aplicados en conjunto con un sistema integral de control de plagas a través de la aplicación de sus moléculas filtradas.

El mayor efecto inhibitorio de las cepas se logra al crecerlas en medios sólidos y utilizando medio PDA, por lo que la presencia de ácidos grasos en el medio, así como el estado conformacional del medio influye en la cantidad o el tipo de moléculas secretadas al medio.

La liofilización es un proceso adecuado para concentrar las moléculas antibióticas de *Trichoderma*, así como para eliminar residuos de células que puedan contaminar las formulaciones, a diferencia de los filtrados obtenidos directos del medio que presentaban contaminación.

Las cepas RE.11 y NI-1 secretan al medio moléculas con actividades fungicidas o antimicrobianas, sin embargo estas deben ser concentradas para potenciar el efecto inhibitorio.

Las moléculas de *Trichdoerma* tienen un efecto fungistático, retardando el crecimiento micelial de los fitopatógenos estudiados, así como la germinación de las esporas de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*.

10. PERSPECTIVAS

En este trabajo se aislaron un total de 133 cepas de *Trichoderma*, y aunque esto sea una aproximación a la diversidad total del estado, es necesario la colecta y aislamiento de más cepas de *Trichoderma* para incrementar la colección. Esto puede llevarse a cabo tomando muestras de suelo asociado a rizosfera de plantas de importancia agrícola o cultural en los municipios donde no se colectó suelo. Además se pretende utilizar más marcadores moleculares para asegurar la correcta identificación.

Así mismo, se sabe que *Trichoderma* es capaz de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos de diferentes maneras, no solo a través de un sistema de antibiosis por metabolitos volátiles, por lo que es necesario explorar los otros mecanismos de las cepas, así como incrementar el número de fitopatógenos a estudiar.

Desarrollar ensayos de interacción plantas-*Trichoderma*, y su capacidad promotora de crecimiento vegetal o de inducción de mecanismos de defensa, con énfasis en aquellas cepas que mostraron una importante actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos estudiados.

A pesar de tener dos cepas productoras de moléculas antibióticas de amplio espectro, existen cepas que pueden inhibir a los cuatro fitopatógenos estudiados en más de un 94%; por lo que no se descarta la implementación de estas cepas en un sistema sinérgico para la prevención de infecciones vegetales.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, M., Casimiro, A., Otero Sánchez, M.A., Díaz Castro, A., Martínez Rojero, R.D., Ariza Flores, R., Barrios Ayala, A., 2013. Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del Mango, con *Trichoderma* spp., en Condiciones de Campo. Rev. Mex. Fitopatol. 31, 1–12.
- Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gómez, B., Jimenez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E., 2012. Impact of the Microbial Siderophores and Phytosiderophores on the Iron Assimilation by Plants: A Synthesis. Rev. Fitotec. Mex. 35, 9–21.
- Ahmed, E., Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microb. Biotechnol. 7, 196–208.
- Alka, R.K., Prajapati, B.K., 2017. Effect of *Trichoderma* Spp. and its culture filtrate antagonists on growth and management of *Rhizopus* rot of tomato fruit *in vitro* and *in vivo*. J. Pharmacogn. Phytochem. 6, 394–398.
- Allen, M.F., Moore Jr, T.S., 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.
- Altieri, M.A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Agric. Ecosyst. Environ. 74, 19–31.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2926–2933.
- Andrade, R., Ayer, W.A., Mebe, P.P., 1992. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. Can. J. Chem. 70, 2526–2535.
- Anke, H., Kinn, J., Bergquist, K.-E., Sterner, O., 1991. Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. Biol. Met. 4, 176–180.
- Avila Miranda, M.E., Herrera Estrella, A., Peña Cabriaes, J.J., 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. Soil Biol. Biochem. 38, 1823–1830.
- Ayala-Garay, Ó.J., Aguilar-Pérez, L.A., Martínez-Damián, T., 2014. Efecto del gucorafano aislado defloretes de brocoli sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Rev. Fitotec. Mex. 37, 141–147.
- Balde, E.S., Andolfi, A., Bruyère, C., Cimmino, A., Lamoral-Theys, D., Vurro, M., Damme, M.V., Altomare, C., Mathieu, V., Kiss, R., Evidente, A., 2010. Investigations of Fungal Secondary Metabolites with Potential Anticancer Activity. J. Nat. Prod. 73, 969–971.
- Banaras, S., Javid, A., Shoaib, A., Ahmed, E., 2017. Antifungal Activity of *Cirsium arvense* Extracts Against Phytopathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina*. Planta Daninha 35.

- Bansal, R., Mukherjee, P.K., 2016. Identification of novel gene clusters for secondary metabolism in *Trichoderma* genomes. *Microbiology* 85, 185–190.
- Barrera, J.F., 2007. Introducción, Filosofía y Alcance del Control Biológico, in: *Teoría Y Aplicación Del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México, pp. 2–18.
- Becerra-Morales, D., 2014. Actividad Antagonista de cepas bacterianas contra hongos fitopatógenos de frutos y hortalizas (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro.
- Begum, M.F., Rahman, M.A., Alam, M.F., 2010. Biological Control of *Alternaria* Fruit Rot of Chili by *Trichoderma* Species under Field Conditions. *Mycobiology* 38, 113–117.
- Ben Amira, M., Mom, R., Lopez, D., Chaar, H., Khouaja, A., Pujade-Renaud, V., Fumanal, B., Gousset-Dupont, A., Bronner, G., Label, P., Julien, J.-L., Triki, M.A., Auguin, D., Venisse, J.-S., 2018. MIP diversity from *Trichoderma*: Structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees. *PLOS ONE* 13, e0193760.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260.
- Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C.L., Restani, P., 2000. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit. Contam.* 17, 399–406.
- Bonnarme, P., Djian, A., Latrasse, A., Féron, G., Giniès, C., Durand, A., Le Quéré, J.-L., 1997. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J. Biotechnol.* 56, 143–150.
- Borgers, M., 1980. Mechanism of Action of Antifungal Drugs, with Special Reference to the Imidazole Derivatives. *Rev. Infect. Dis.* 2, 520–534.
- Botero, A., Gómez, I., Benítez, É., García, C., 2015. Liming with dolomite reduces the efficacy of the biocontrol fungus *Trichoderma koningiopsis* against cabbage clubroot. *Agron. Colomb.* 33, 49–57.
- Bremer, J., Figard, P.H., Greenberg, D.M., 1960. The biosynthesis of choline and its relation to phospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 43, 477–488.
- Burla, M., Goverde, M., Schwinn, F.J., Wiemken, A., 1996. Influence of biocontrol organisms on root pathogenic fungi and on the plant symbiotic microorganisms *Rhizobium phaseoli* and *Glomus mosseae*. *J. Plant Dis. Prot.* 103, 156–163.
- Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., Chen, W., 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 106–113.
- Capote, N., Aguado, A., Pastrana, A.M., Sánchez-Torres, P., 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. INTECH Open Access Publisher.
- Cardoza, R.E., Hermosa, M.R., Vizcaíno, J.A., Sanz, L., Monte, E., Gutiérrez, S., 2005. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. *Res. Signpost* 37, 1–22.

- Carpentier, S.C., Dens, K., Van den houwe, I., Swennen, R., Panis, B., 2007. Lyophilization, a Practical Way to Store and Transport Tissues Prior to Protein Extraction for 2DE Analysis? *PROTEOMICS* 7, 64–69.
- Carrero-Carrón, I., Trapero-Casas, J.L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., Jiménez-Díaz, R.M., 2016. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Prot.* 88, 45–52.
- Castrillo, M., 2016. Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. *Mycosphere* 7, 810–819.
- Castrillo, M.L., Bich, G.Á., Modenutti, C., Turjanski, A., Zapata, P.D., Villalba, L.L., 2017. First Whole-Genome Shotgun Sequence of a Promising Cellulase Secretor, *Trichoderma koningiopsis* Strain POS7. *Genome Announc.* 5, e00823–17.
- Chiocchio, V., Venedikian, N., Martinez, A.E., Ana Menendez, A.M., Ocampo, J.A., Godeas, A., 2000. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Int. Microbiol.* 3, 173–175.
- Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47, 289–297.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J.R., Avent, A.G., 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88, 503–513.
- Colavolpe, M.B., Mejía, S.J., Albertó, E., 2014. Efficiency of treatments for controlling *Trichoderma* spp during spawning in cultivation of lignicolous mushrooms. *Braz. J. Microbiol.* 45, 1263–1270.
- Comite Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato A.C., 2018. Manual de Plagas y Enfermedades del Aguacatero.
- Contreras-Cornejo, H.A., López-Bucio, J.S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á.A., López-Bucio, J., 2015a. Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in *Arabidopsis* Root-System Architecture Alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 701–710.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-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.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Vergara, A.G., López-Bucio, J., 2015b. *Trichoderma* Modulates Stomatal Aperture and Leaf Transpiration Through an Abscisic Acid-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *J. Plant Growth Regul.* 34, 425–432.
- Cutler, H.G., Jacyno, J.M., Phillips, R.S., Vontersch, R.L., Cole, P.D., Montemurro, N., 1991. Cyclonerodiol from a Novel Source, *Trichoderma koningii*: Plant Growth Regulatory Activity. *Agric. Biol. Chem.* 55, 243–244.
- Dahm, H., Ciesielska, A., 2009. Bioproduction and Significance of fungal Vitamins, in: *Advances in Fungal Biotechnology*. I. K. International, India, pp. 409–434.

- de Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., 2003. Microbial Community Composition Affects Soil Fungistasis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 835–844.
- de Castro, M.D., Izquierdo, A., 1990. Lyophilization: a useful approach to the automation of analytical processes? *J. Anal. Methods Chem.* 12, 267–279.
- de la Llata-Gómez, R., Bayona-Celis, A., Rivera-Sánchez, E., Valtierra, G., Martínez-Reséndiz, W.E., Montoya-Martínez, A., 2006. Caracterización de los Ecosistemas, Cambios de Uso de Suelo y Unidades Paisajísticas en la Reserva de la Biosfera “Sierra Gorda” de Querétaro, Recursos Naturales. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro, Querétaro.
- 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., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.
- Dilesh, I., Chourasia, O.P., Limaye, S.N., 2012. Synthesis, Characterization, Antimicrobial, Antifungal activity of some s-triazine Derivatives of Isoxazoline, Pyrazoline and PC model Computational Studies. *Res. J. Pharm. Sci.* 1, 10–16.
- Dobson, G., Griffiths, D.W., Davies, H.V., McNicol, J.W., 2004. Comparison of Fatty Acid and Polar Lipid Contents of Tubers from Two Potato Species, *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6306–6314.
- Druzhinina, I.S., Chaverri, P., Fallah, P., Kubicek, C.P., Samuels, G.J., 2004. *Hypocrea flaviconidia*, a new species from Costa Rica with yellow conidia. *Stud Mycol* 50, 401–407.
- Druzhinina, I.S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., Rahimi, M.J., Grujic, M., Cai, F., Pourmehdi, S., Salim, K.A., Pretzer, C., Kopchinskiy, A.G., Henrissat, B., Kuo, A., Hundley, H., Wang, M., Aerts, A., Salamov, A., Lipzen, A., LaButti, K., Barry, K., Grigoriev, I.V., Shen, Q., Kubicek, C.P., 2018. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLOS Genet.* 14, e1007322.
- Druzhinina, I.S., Komoń-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G.J., Kubicek, C.P., 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 358–368.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P., 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47, 55–64.
- Dutta, P., Bhowmick, P., Boruah, S., 2018. Effect of Extracellular Metabolites of *Trichoderma pseudokoningii* on Radial Growth of *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7, 874–879.
- El Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y., 2015. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt. *Plant Pathol. J.* 31, 50–60.

- El-Hasan, E., Walker, F., Schöne, J., Buchenauer, H., 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *J. Plant Dis. Prot.* 114, 62–68.
- Emmatty, D.A., Green Jr, R.J., 1967. The role of nutrients and pH in reversing fungistasis of conidia of *Trichoderma viride*. *Can. J. Microbiol.* 13, 635–642.
- Engelberth, J., Koch, T., Schüller, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., Boland, W., 2001. Ion Channel-Forming Alamethicin Is a Potent Elicitor of Volatile Biosynthesis and Tendril Coiling. Cross Talk between Jasmonate and Salicylate Signaling in Lima Bean. *Plant Physiol.* 125, 369–377.
- Evidente, A., Cabras, A., Maddau, L., Serra, S., Andolfi, A., Motta, A., 2003. Viridepyronone, a New Antifungal 6-Substituted 2H-Pyran-2-one Produced by *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6957–6960.
- Eziashi, E.I., Uma, N.U., Adekunle, A.A., Airede, C.E., Odigie, E.E., 2010. Evaluation of lyophilized and non lyophilized toxins from *Trichoderma* species for the control of *Ceratocystis paradoxa*. *Afr. J. Agric. Res.* 5, 1733–1738.
- Farrant, J., Walter, C.A., Lee, H., Morris, G.J., Clarke, K.J., 1977. Structural and functional aspects of biological freezing techniques. *J. Microsc.* 111, 17–34.
- Fuente-Núñez, C. de la, Whitmore, L., Wallace, B.A., 2013. Peptaibols, in: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier, pp. 150–156.
- Gadagkar, S.R., Rosenberg, M.S., Kumar, S., 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 304B, 64–74.
- Galliard, T., Phillips, D.R., Matthew, J.A., 1975. Enzymic Reactions of Fatty Acids Hydroperoxides in Extracts of Potato Tubers. *Biochim. Biophys. Acta BBA* 409, 157–171.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C., Gutiérrez, L., 2014. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad* 10, 115–121.
- García-Nuñez, H.G., Romero-Gómez, S. de J., Nava-Bernal, E.G., Campos, A.R.M., others, 2012. Isolation of native strains of *Trichoderma* spp., from horticultural soils of the valley of Toluca, for potential biocontrol of *sclerotinia*. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 15.
- García-Ortiz, S., 2015. Controversias y evidencias sobre los organismos genéticamente modificados.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L.F., López-Bucio, J., 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and Ethylene Insensitive 2 functioning. *New Phytol.* 209, 1496–1512.
- Gerdemann, J.W., 1965. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Formed on Maize and Tuliptree by *Endogone fasciculata*. *Mycologia* 57, 562.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C., 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24, 774–786.
- Green, H., Larsen, J., Olsson, P.A., Jensen, D.F., Jakobsen, I., 1999. Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the

- Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1428–1434.
- Hamed, E.R., Awad, H.M., Ghazi, E.A., El-Gamal, N.G., Shehata, H.S., 2015. *Trichoderma asperellum* isolated from salinity soil using rice straw waste as biocontrol agent for cowpea plant pathogens. JAPS. 5, 91-98.
- Harman, G.E., Herrera-Estrella, A.H., Horwitz, B.A., Lorito, M., 2012. Special issue: *Trichoderma* - from Basic Biology to Biotechnology. Microbiology 158, 1–2.
- Haukaas, T.H., Moestue, S.A., Vettukattil, R., Sitter, B., Lamichhane, S., Segura, R., Giskeødegård, G.F., Bathen, T.F., 2016. Impact of Freezing Delay Time on Tissue Samples for Metabolomic Studies. Front. Oncol. 6, 1-9.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E. t, Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I., 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1890–1898.
- Hernández-Castillo, F.D., Lira-Saldivar, R.H., Gallegos-Morales, G., Hernández-Suárez, M., Solis-Gaona, S., 2014. Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. Phytón B. Aires 83, 49–55.
- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Ramos-Zapata, J.A., 2017. *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annuum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. Chil. J. Agric. Res. 77, 318–324.
- Howell, C.R., Stipanovic, R.D., Lumsden, R.D., 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. Biocontrol Sci. Technol. 3, 435–441.
- Hu, M., Li, Q.-L., Yang, Y.-B., Liu, K., Miao, C.-P., Zhao, L.-X., Ding, Z.-T., 2017. Koninginins R-S from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. Nat. Prod. Res. 31, 835–839.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17, 754–755.
- Humphris, S.N., Bruce, A., Buultjens, E., Wheatley, R.E., 2002. The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. FEMS Microbiol. Lett. 210, 215–219.
- Hung, R., 2014. Fungal volatile organic compounds and their effects on seed germination and plant growth in *Arabidopsis thaliana* (PhD Thesis). Rutgers University-Graduate School-New Brunswick.
- Huson, D.H., Scornavacca, C., 2012. Dendroscope 3: An Interactive Tool for Rooted Phylogenetic Trees and Networks. Syst. Biol. 61, 1061–1067.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y., 2009. Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 24, 14–21.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía-México, GEQ, 2017. Anuario estadístico y geográfico de Querétaro 2017.
- Isaias, C.O., Martins, I., Silva, J.B.T. da, Silva, J.P. da, Mello, S.C.M. de, 2014. Antagonistic action and bioactive metabolites of *Trichoderma* spp. against the pathogens *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae*. Summa Phytopathol. 40, 34–41.

- Jaklitsch, W.M., Voglmayr, H., 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Stud. Mycol.* 80, 1–87.
- Jana, S.C., Mandal, M., 2017. Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates on *Sclerotium rolfsii*. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.* 5, 506–514.
- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M., Punja, Z.K., 2008. Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Prot.* 27, 1360–1366.
- Jayaraman, J., Norrie, J., Punja, Z.K., 2011. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. *J. Appl. Phycol.* 23, 353–361.
- Jayashankara, B., Rai, K.L., 2008. Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of a new series of bis (isoxazoline) derivatives. *Arkivoc* 11, 75–85.
- Jit Sud, I., Feingold, D.S., 1981. Mechanism of action of the antimycotic imidazoles. *J. Invest. Dermatol.* 76, 438–441.
- Juárez-Campusano, Y.S., Pacheco-Aguilar, J.R., Martínez-Peniche, R.A., Soto-Muñoz, L., 2016. Detección de la pudrición gris en etapas de infección mediante PCR en cultivos de vid del estado de Querétaro. *Rev. Mex. Fitopatol.* 34, S2–S3.
- Karimi-Aghcheh, R., Bok, J.W., Phatale, P.A., Smith, K.M., Baker, S.E., Lichius, A., Omann, M., Zeilinger, S., Seiboth, B., Rhee, C., Keller, N.P., Freitag, M., Kubicek, C.P., 2013. Functional Analyses of *Trichoderma reesei* LAE1 Reveal Conserved and Contrasting Roles of This Regulator. *GenesGenomesGenetics.* 3, 369–378.
- Knogge, W., 1996. Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8, 1711–1722.
- Knudsen, G.R., Eschen, D.J., Dandurand, L.M., Wang, Z.G., 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2864–2867.
- Kong, P., Hong, C., 2017. Biocontrol of boxwood blight by *Trichoderma koningiopsis* Mb2. *Crop Prot.* 98, 124–127.
- Körmöczi, P., Danilovic, G., Manczinger, L., Jovanovic, L., Pankovic, D., Vagvölgyi, C., Kredics, L., 2013. Species composition of *Trichoderma* isolates from the rhizosphere of vegetable grown in hungarian soils. *Fresenius Environ. Bull.* 22, 1736–1741.
- Kosanović, D., Potocnik, I., Duduk, B., Vukojevic, J., Stajic, M., Rekanovic, E., Milijašević-Marčić, S., 2013. *Trichoderma* species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol. *Ann. Appl. Biol.* 163.
- Kredics, L., García-Jimenez, L., Naeimi, S., Czifra, D., Urbán, P., Manczinger, L., Vagvölgyi, C., Hatvani, L., 2010. A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 1, 295–305.
- Kullnig, C.M., Krupica, T., Woo, S.L., Mach, R.L., Rey, M., Benítez, T., Lorito, M., Kubicek, C.P., 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.* 105, 770–772.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P., 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* 106, 757–767.
- Kumar, V., 2013. Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virol. Mycol.* 03.

- Larsen, T.O., Frisvad, J.C., Ravn, G., Skaaning, T., 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Addit. Contam.* 15, 671–675.
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J.W., 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol. Biotechnol.* 3, 2-14.
- Lee-Pei, L.A., Shamala, S., Bonnie-Tay, Y.P., Mohd-Termizi, Y., Intan Safinar, I., 2018. Profiling of anti-fungal activity of *Trichoderma virens* 156C involved in biocontrol of *Ganoderma boninense*. *J. Oil Palm Res.* 30, 83–93.
- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M., Pollmann, S., 2010. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur. J. Cell Biol.* 89, 895–905.
- Leylaie, S., Zafari, D., 2018. Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic *Trichoderma* Species From Vinca Plants. *Front. Microbiol.* 9.
- Lin, Y.-R., Lo, C.-T., Liu, S.-Y., Peng, K.-C., 2012. Involvement of Pachybasin and Emodin in Self-Regulation of *Trichoderma harzianum* Mycoparasitic Coiling. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2123–2128.
- Lorenz, E.S., 2009. Potential Health Effects of Pesticides (No. UO198). Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Lubbe, A., Ali, K., Verpoorte, R., Hae-choi, Y., 2013. NMR-Based Metabolomics Analysis, in: *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*. Wiley-VCH.
- Malmierca, M.G., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Collado, I.G., Hermosa, R., Monte, E., Gutiérrez, S., 2013. Relevance of trichothecenes in fungal physiology: Disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet. Biol.* 53, 22–33.
- Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M.R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., Napolitano, M., Lombardi, N., Lorito, M., Woo, S.L., 2018. Modulation of Tomato Response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and Its Secondary Metabolite Harzianic Acid. *Front. Microbiol.* 9.
- Marques, E., Martins, I., Mello, S.C.M. de, 2018. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica* 18.
- Martínez, J.A., 2012. Natural fungicides obtained from plants, in: *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. InTech.
- Mbarga, J.B., Ten-Hoopen, G.M., Kuate, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M.E.L., Ambang, Z., Akoa, A., Tondje, P.R., Begoude, B.A.D., 18-22. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Prot.* 36, 2012.
- McAllister, C.B., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J.A., 1994. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: Effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1363–1367.
- McMullin, D.R., Renaud, J.B., Barasubiye, T., Sumarah, M.W., Miller, J.D., 2017. Metabolites of *Trichoderma* species isolated from damp building materials. *Can. J. Microbiol.* 63, 621–632.

- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., Alarcón-Cruz, N., 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. Av. En Investig. Agropecu. 17.
- Mishra, U., Whattal-Dhar, D., 2004. Biodiversity and biological degradation of soil. Resonance 9, 26–33.
- Mohammad, A., Hadi, G., Masoud, A., 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. Afr. J. Biotechnol. 10, 2653–2658.
- Montero-Tavera, V., Guerrero-Aguilar, B.Z., Anaya-López, J.L., Martínez-Martínez, T.O., Guevara-Olvera, L., González-Chavira, M.M., 2013. Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 4, 1043–1054.
- Montiel González, L., González Flores, F., Sánchez García, B.M., Guzmán Rivera, S., Gámez Vázquez, F.P., Acosta Gallegos, J.A., Rodríguez Guerra, R., Simpson Williamson, J., Cabral Enciso, M., Mendoza Elos, M., 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. Rev. Mex. Fitopatol. 23.
- Moscatiello, R., Sello, S., Ruocco, M., Barbulova, A., Cortese, E., Nigris, S., Baldan, B., Chiurazzi, M., Mariani, P., Lorito, M., Navazio, L., 2018. The Hydrophobin HYTLO1 Secreted by the Biocontrol Fungus *Trichoderma longibrachiatum* Triggers a NAADP-Mediated Calcium Signalling Pathway in *Lotus japonicus*. Int. J. Mol. Sci. 19, 2596.
- Moya, P., 2017. Antagonismo y efecto biocontrolador de *Trichoderma* spp. sobre *Drechslera teres*, agente causal de la “mancha en red” de la cebada (*Hordeum vulgare* L. var. *vulgare*) (PhD Thesis). Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Muiru, W.M., 2015. Antimicrobial Compounds from Microorganisms: production, characterization, and applications, in: Antimicrobials: Synthetic and Natural Compounds. CRC Press, Estados Unidos., pp. 29–53.
- Mukesh, S., Mohammad, S., Sonika, P., Vipul, K., Anuradha, S., Shubha, T., Srivastava, Y.K., Shivram, 2015. *Trichoderma*: A scientific approach against soil borne pathogens. Afr. J. Microbiol. Res. 9, 2377–2384.
- Mukherjee, Prasun K., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. Microbiology 158, 35–45.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. Microbiology 158, 35–45.
- Munir, S., Jamal, Q., Bano, K., Sherwani, S.K., Bokhari, T.Z., Khan, T.A., Khan, R.A., Jabbar, A., Anees, M., 2013. Biocontrol ability of *Trichoderma*. Int. J. Agric. Crop Sci. 6, 1246.
- Mutawila, C., Vinale, F., Halleen, F., Lorito, M., Mostert, L., 2016a. Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. Plant Pathol. 65, 104–113.
- Mutawila, C., Vinale, F., Halleen, F., Lorito, M., Mostert, L., 2016b. Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced

- by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathol.* 65, 104–113.
- Naglot, A., Goswami, S., Rahman, I., Shrimali, D.D., Yadav, K.K., Gupta, V.K., Rabha, A.J., Gogoi, H.K., Veer, V., 2015. Antagonistic Potential of Native *Trichoderma viride* Strain against Potent Tea Fungal Pathogens in North East India. *Plant Pathol. J.* 31, 278–289.
- Nagy, V., Seidl, V., Szakacs, G., Komón-Zelazowska, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I., 2007. Application of DNA Bar Codes for screening of Industrially Important Fungi: the Haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7048–7058.
- Nascimento Silva, R., Stecca Steindorff, A., Neves Monteiro, V., 2014. Metabolic Diversity of *Trichoderma*: Carbohydrate Metabolism and Glicoside Hydrolases, in: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, Paises Bajos, pp. 363–376.
- Nawrocka, J., Malolepsza, U., 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biol. Control* 67, 149–156.
- Nguyen, Q.T., Ueda, K., Kihara, J., Ueno, M., 2016. Culture Filtrates of *Trichoderma* Isolate H921 Inhibit *Magnaporthe oryzae* Spore Germination and Blast Lesion Formation in Rice. *Adv. Microbiol.* 06, 521.
- Nieto-Jacobo, M.F., Steyaert, J.M., Salazar-Badillo, F.B., Nguyen, D.V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J.T., Jimenez-Bremont, J.F., Ohkura, M., Stewart, A., Mendoza-Mendoza, A., 2017. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Front. Plant Sci.* 8.
- Nongmaithem, N., Roy, A., Bhattacharya, P.M., 2016. Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. *Braz. J. Microbiol.* 47, 305–313.
- Osorio-Hernández, E., Rodríguez-Herrera, R., Hernández-Castillo, F.D., 2009. *Trichoderma* spp, una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. *CIENCIACIERTA* 2, 132–134.
- Ouedraogo, J.-P., Lagendijk, E.L., Hondel, C.A.M.J.J. van den, Ram, A.F.J., Meyer, V., 2013. Screening for Compounds Exerting Antifungal Activities, in: *Laboratory Protocols in Fungal Biology, Fungal Biology*. Springer, New York, NY, pp. 225–230.
- Parker, S.R., Cutler, H.G., Jacyno, J.M., Hill, R.A., 1997. Biological Activity of 6-Pentyl-2H-pyran-2-one and Its Analogs. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2774–2776.
- Pérez, C.J.P., Bobadilla, M.M., Gómez, M.R., Nuñez, C.L., Hernández, O.A.P., 2008. Evaluación de la pudrición de la mazorca por *Fusarium* spp., en cuatro fechas de siembra en el estado de Querétaro, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 31.
- Pérez-Aragón, B., García-Salazar, J.E., Landeros-Jaime, F., Caltzontzin-Fernández, K., Romero-Valencia, E., Vergara-Pineda, S., 2013. Muerte regresiva en *Phoenix canariensis* y sus agentes causales en el municipio de Querétaro. *Rev. Mex. Fitopatol.* 31, S79.

- PETRIȘOR, C., Paica, A., Constantinescu, F., 2017. Effect of Secondary Metabolites Produced by Different *Trichoderma* spp. Isolates Against *Fusarium oxysporum* f. sp. Radicis-Lycopersici and *Fusarium solani*. Sci. Pap.-Ser. B-Hortic. 61, 407–411.
- Petzinger, E., Weidenbach, A., 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. Livest. Prod. Sci. 76, 245–250.
- Pezet, R., Pont, V., Tabacchi, R., 1999. Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. Phytochem. Anal. 10, 285–288.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annu. Rev. Phytopathol. 52, 347–375.
- Pohl, C.H., Kock, J.L., Thibane, V.S., 2011. Antifungal free fatty acids: a review. Sci. Microb. Pathog. Commun. Curr. Res. Technol. Adv. 3, 61–71.
- Poole, P.R., Whitaker, G., 1997. Biotransformation of 6-pentyl-2-pyrone by *Botrytis cinerea* in liquid cultures. J. Agric. Food Chem. 45, 249–252.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S., 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. Int. J. Biol. Sci. 4, 330.
- Priya, B.S., Basappa, Rangappa, K.S., 2006. Δ^2 -isoxazoline derivatives as antimicrobials. Heterocycl. Commun. 12, 35–42.
- Qiu, Z., Wu, X., Zhang, J., Huang, C., 2018. High-Temperature Induced Changes of Extracellular Metabolites in *Pleurotus ostreatus* and Their Positive Effects on the Growth of *Trichoderma asperellum*. Front. Microbiol. 9.
- Rabeendran, N., Jones, E.E., Moot, D.J., Stewart, A., 2006. Biocontrol of *Sclerotinia lettuce* drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. Biol. Control 39, 352–362.
- Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1, 17–20.
- Rajesh, R.W., Rahul, M.S., Ambalal, N.S., 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. Afr. J. Agric. Res. 11, 1952–1965.
- Rajput, A.Q., 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.
- Ramadan, M.F., Oraby, H.F., 2016. Fatty Acids and Bioactive Lipids of Potato Cultivars: An Overview. J. Oleo Sci. 2016, 6.
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R., Collado, I.G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochem. Rev. 7, 89–123.
- Rodriguez-Pagaza, Y., 2009. Sobrevivencia de micelio y genes asociados a la germinación no errumpente de *Sclerotium cepivorum* Berk (Tesis de Doctorado). Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Roier, S., Zingl, F., Cakar, F., Schild, S., 2016. Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. Microb. Cell 3, 257–259.

- Romero-Gómez, S.J., Augur, C., Viniegra-González, G., 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 22, 1255–1258.
- Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J.M., Schuster, S., Avni, A., 2002. Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J.* 32, 1049–1055.
- Rothmann, C., 2016. The Production of Plant Growth Enhancers by *Trichoderma* Species (Magister Scientiae Thesis). University of the Free State Bloemfontein, Sudáfrica.
- Rouabhi, R., 2010. Introduction and Toxicology of Fungicides. INTECH Open Access Publisher.
- Ruijter, G.J.G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S.J., van de Vondervoort, P.J.I., de Vries, R.P., vanKuyk, P.A., Visser, J., 2003. Mannitol Is Required for Stress Tolerance in *Aspergillus niger* Conidiospores. *Eukaryot. Cell* 2, 690–698.
- RV, A., 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.
- Saad, A.M., 2016. Determination of secondary metabolites products by *Trichoderma harzianum* and evaluate antimicrobial activity. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 7, 105–122.
- SAGARPA, SFA, 2011. Indicadores Estatales Agroeconómicos de Querétaro.
- 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.
- Sakpetch, P., H-Kittikun, A., Kuwahara, Y., Komeda, H., Asano, Y., 2018. Isolation of indigenous antagonistic microorganism to inhibit *Rigidoporus microporus* and other plant pathogens and analysis of the bioactive compounds. *Biol. Control* 124, 53–60.
- Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96, 195–206.
- Samuels, G.J., 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100, 923–935.
- Sánchez, A.D., Barrera, V., Reybet, G.E., Sosa, M.C., 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Rev. Fac. Agron.* 114, 61–70.
- Sánchez, V., Rebolledo, O., 2010. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Rev. Mex. Micol.* 32, 11–18.
- Sánchez-García, B.M., González-Flores, F., Pons-Hernández, J.L., Acosta-Gallegos, J.A., Cabral-Enciso, M., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., Rodríguez-Guerra, R., 2006. *Fusarium lateritium*: nuevo patógeno de la raíz del frijol en México. *Agric. Téc. En México* 32, 251–257.
- Sandoval-Chávez, R.A., Martínez-Peniche, R.A., Hernandez-Iturriaga, M., Fernández-Escartin, E., Arvizu-Medrano, S., Soto-Muñoz, L., 2011. Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón

- (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 17, 161–172.
- Sawa, R., Mori, Y., Iinuma, H., Naganawa, H., Hamada, M., Yoshida, S., Furutani, H., Kajimura, Y., Fuwa, T., Takeuchi, T., 1994. Harzianic Acid, A New Antimicrobial Antibiotic from a Fungus. J. Antibiot. (Tokyo) 47, 731–732.
- SEDEA, Red Agropecuaria- WEB, 2018a. Estadísticas agrícolas en modalidad Riego+Temporal Primavera-Verano 2017, Estadísticas agrícolas. Secretaria de Desarrollo Agropecuario del estado de Querétaro, Querétaro.
- SEDEA, Red Agropecuaria- WEB, 2018b. Estadísticas agrícolas en modalidad Riego+Temporal Otoño-Invierno 2017, Estadísticas agrícolas. Secretaria de Desarrollo Agropecuario del estado de Querétaro, Querétaro.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G., Kubicek, C.P., 2006. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. FEBS J. 273, 4346–4359.
- Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M., Belin, J.-M., 1993. Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl- α -pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2945–2950.
- Sharma, P., Sharma, A., Jasuja D., N., Sharma, N., Joshi C., S., 2015. A Review on Toxicological Effects of Fungicides. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 6, 348–360.
- Sheets, E.E., 2015. Liquid Nitrogen: Its Cryogenic Properties and Unique Healing Process. CSA Med. 1–4.
- Shentu, X.-P., Liu, W.-P., Zhan, X.-H., Yu, X.-P., Zhang, C.-X., 2013. The Elicitation Effect of Pathogenic Fungi on Trichodermin Production by *Trichoderma brevicompactum*. Sci. World J. 2013, e607102.
- Shi, W.-L., Chen, X.-L., Wang, L.-X., Gong, Z.-T., Li, S., Li, C.-L., Xie, B.-B., Zhang, W., Shi, M., Li, C., Zhang, Y.-Z., Song, X.-Y., 2016. Cellular and molecular insight into the inhibition of primary root growth of *Arabidopsis* induced by peptaibols, a class of linear peptide antibiotics mainly produced by *Trichoderma* spp. J. Exp. Bot. 67, 2191–2205.
- Shokri, D., Emtiazi, G., 2010. Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria and its Optimization by Taguchi Design. Curr. Microbiol. 61, 217–225.
- Shundo, L., Almeida, A.P. de, Alaburda, J., Ruvieri, V., Navas, S.A., Lamardo, L.C., Sabino, M., 2006. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. Braz. J. Microbiol. 37, 533–537.
- Siddiquee, S., Cheong, B.E., Taslima, K., Kausar, H., Hasan, M.M., 2012. Separation and Identification of Volatile Compounds from Liquid Cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using Three Different Capillary Columns. J. Chromatogr. Sci. 50, 358–367.
- Soliman-Derbalah, A., Elweenes Elkot, G.A., Mohamed Hamza, A., 2012. Laboratory evaluation of botanical extracts, microbial culture filtrates and silver nanoparticles against *Botrytis cinerea*. Ann. Microbiol. 62.

- Srinivasa, N., Devi., P., 2014. Separation and identification of antifungal compounds from *Trichoderma* species by GC-MS and their bio-efficacy against soil-borne pathogens. *BIOINFOLET* 11, 255–257.
- Sriram, S., Manasa, S.B., Savitha, M.J., 2009. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. *J Biol Control* 23, 449–456.
- Srivastava, M., Kumar, V., Shahid, M., Pandey, S., Singh, A., 2016. African Journal of Agricultural Research - *Trichoderma*- a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: a review. *Afr. J. Agric. Res.* 11, 310–316.
- Stamatakis, A., Ludwig, T., Meier, H., 2005. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* 21, 456–463.
- Sternberg, J.A., Geffken, D., Adams Jr, J.B., Pöstages, R., Sternberg, C.G., Campbell, C.L., Moberg, W.K., 2001. Famoxadone: the discovery and optimisation of a new agricultural fungicide. *Pest Manag. Sci. Former. Pestic. Sci.* 57, 143–152.
- Sukarno, N., Smith, S.E., Scott, E.S., 1993. The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 125, 139–147.
- Sultana, F., Hossain, M.M., Kubota, M., Hyakumachi, M., 2009. Induction of systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to a culture filtrate from a plant growth-promoting fungus, *Phoma* sp. GS8-3. *Plant Biol.* 11, 97–104.
- Sun, J., Pei, Y., Li, E., Li, W., Hyde, K.D., Yin, W.-B., Liu, X., 2016. A new species of *Trichoderma hypoxylon* harbours abundant secondary metabolites. *Sci. Rep.* 6.
- Thi, Q.N., Ueda, K., Kihara, J., Arase, S., Ueno, M., 2012. Effect of culture filtrates of *Trichoderma* sp. isolated from wild mushrooms on the infectious behavior of plant pathogenic fungi. *Bull Fac Life Env Sci Shimane Univ* 17, 23–27.
- Tijerino, A., Elena Cardoza, R., Moraga, J., Malmierca, M.G., Vicente, F., Aleu, J., Collado, I.G., Gutiérrez, S., Monte, E., Hermosa, R., 2011. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 285–296.
- Tlapal Bolaños, B., González Hernández, H., Zavaleta Mejía, E., Sánchez García, P., Mora Aguilera, G., Nava Díaz, C., Laborde, R., Del, J.I., Rubio Cortes, R., 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en Plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el Efecto Sobre la Fisiología de la Planta y Densidad de *Fusarium*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 32, 62–74.
- Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widmer, T., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D., Hebbar, K.P., 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control* 43, 202–212.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C.F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J.A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., De la Cruz-Pérez, A., 2015.

- Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 86, 947–961.
- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés, M., 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol. Control* 39, 32–38.
- Ubaid, J.M., Hadi, M.Y., Hameed, I.H., 2017. Bioactive Chemical Compounds Identified in Methanolic Extract of *Trogoderma granarium*. *Res. J. Pharm. Technol.* 10, 3997.
- Uchiyama, R., Aoki, K., Sugimoto, H., Taka, N., Katayama, T., Itonori, S., Sugita, M., Che, F.-S., Kumagai, H., Yamamoto, K., 2009. Phosphocholine-Containing Glycosyl Inositol-Phosphoceramides from *Trichoderma viride* Induce Defense Responses in Cultured Rice Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 74–78.
- Vazquez-Angulo, J.C., Mendez-Trujillo, V., González-Mendoza, D., Morales-Trejo, A., Grimaldo-Juarez, O., Cervantes-Díaz, L., 2012. Methodology A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from *Trichoderma* spp (Hypocreaceae). *Genet. Mol. Res.* 11, 1379–1384.
- Velayutham, P., Karthi, C., 2015. GC-MS profile of *in vivo*, *in vitro* and fungal elicited *in vitro* leaves of *Hybanthus enneaspermus* (L.) F. Muell. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7, 260–267.
- Vellasamy, S., Nithya, K., Harikrishnan, H., M, J., Balasubramanian, N., 2015. Biocontrol Mechanisms of Siderophores against Bacterial Plant Pathogens. pp. 167–186.
- Vinale, Francesco, Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B.W., Ghisalberti, E.L., 2009. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.* 72, 2032–2035.
- Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., Lorito, M., 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. I., Lorito, M., Sivasithamparam, K., 2006a. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 143–148.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., Sivasithamparam, K., 2006b. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 143–148.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S.L., Lorito, M., 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 123-129.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. I., Ruocco, M., Woo, S., Lorito, M., 2012. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat. Prod. Commun.* 7, 1545–1550.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8.
- Viterbo, A., Chet, I., 2006. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.* 7, 249–258.
- Viterbo, A., Harel, M., Chet, I., 2004. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 151–158.
- Wachira, P., Kimenju, J., Okoth, S., Kiarie, J., 2014. Conservation and Sustainable Management of Soil Biodiversity for Agricultural Productivity, in: Kaneko, N., Yoshiura, S., Kobayashi, M. (Eds.), *Sustainable Living with Environmental Risks*. Springer Japan, Tokyo, pp. 27–34.
- Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., Dou, K., Ren, J., Chen, J., 2017a. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PLOS ONE* 12, e0179957.
- Yakimenko, E.E., Grodnitskaya, I.D., 2000. Effect of *Trichoderma* Fungi on Soil Micromycetes That Cause Infectious Conifer Seedling Lodging in Siberian Tree Nurseries. *Microbiology* 69, 726–729.
- Yang, P., Xu, Q., 2013. The Biocontrol Mechanism of *Trichoderma asperellum* Resistance Plant Pathogenic Fungi. *Adv. Mater. Res.* 726–731, 4525–4528.
- Yi, H.-S., Ahn, Y.-R., Song, G.C., Ghim, S.-Y., Lee, S., Lee, G., Ryu, C.-M., 2016. Impact of a Bacterial Volatile 2,3-Butanediol on *Bacillus subtilis* Rhizosphere Robustness. *Front. Microbiol.* 7.
- Zafari, D., Koushki, M.M., Bazgir, E., 2008. Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. *Afr. J. Biotechnol.* 7.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P.K., 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biol. Rev.* 30, 74–90.
- Zeilinger, S., Omann, M., 2007. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regul. Syst. Biol.* 1, GRSB–S397.
- Zhang, Yuan, Zhang, Yi, Yao, Y.-B., Lei, X.-L., Qian, Z.-J., 2018. Butyrolactone-I from Coral-Derived Fungus *Aspergillus terreus* Attenuates Neuro-Inflammatory Response via Suppression of NF-κB Pathway in BV-2 Cells. *Mar. Drugs* 16, 202.
- Zubair, M., Rizwan, K., Rashid, U., Saeed, R., Saeed, A.A., Rasool, N., Riaz, M., 2017. GC/MS profiling, *in vitro* antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. *Arab. J. Chem.* 10, S1460–S1468.
- Li Guoqing, You Jiayu, Yang Long, Zhang Jing, Wu Mingde, 2016. *Trichoderma koningiopsis* T-51 strain and application thereof in growth promotion of tomatoes and biological prevention and control of *Botrytis cinerea* Pers. CN105586274A.