



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
“Estudio en la duda. Acción en la fe”



IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
***Trichoderma* spp DE LA RIZOSFERA EN SISTEMAS**
AGROFORESTALES-CACAOTALES

TESIS

Que para obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTA

Ursula del Carmen López Ferrer

Directora de tesis

Dra. Hortensia Brito Vega

Asesor

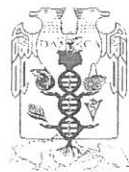
Dr. Edmundo Gómez Méndez

Villahermosa, Tabasco. Abril 2017



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS TERMINALES

Asunto: Autorización de Impresión de
Trabajo Recepcional bajo la
Modalidad de: Tesis.

Fecha: 31 de marzo de 2017.

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON,
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT.
P R E S E N T E.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (a) **C. Ursula del Carmen López Ferrer**, con **matrícula 112C16004**, egresado(a) de la Licenciatura de **Ingeniería en Agronomía**, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, la **impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis**, Titulado: **"Identificación morfológica y molecular de *Trichoderma* spp. de la rizósfera en sistemas agroforestales-cacaotales"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR

U.J.A.T.



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente Alumno.

Archivo
DR.RFB/MC.AMA

CARTA DE AUTORIZACIÓN

La que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la Modalidad de Tesis denominado **"IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE *Trichoderma* spp DE LA RIZOSFERA EN SISTEMAS AGROFORESTALES-CACAOTALES"** de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco del Trabajo Recepcional antes mencionado, será únicamente y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro. Autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitada para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID), y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes mencionado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la Tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los doce días del mes de Abril del año 2017.

AUTORIZO



Ursula del Carmen López Ferrer

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Julia Ferrer y Jose López, porque fueron el pilar principal para que esto fuera posible, que con su esfuerzo, dedicación y amor me sacaron adelante y jamas me dejaron sola. Gracias por todo lo que soy.

A mi alma mater la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por todo el apoyo brindado durante mi formación, orgullosamente Juchiman.

A mi directora de tesis la Dra. Hortensia Brito Vega, gracias por darme un lugar especial en su vida, por brindarme su amistad, su cariño, su paciencia su tiempo y sus conocimientos, por dejarme ser parte de este proyecto, y por todo el apoyo brindado tanto en mi vida profesional como personal, muchas gracias.

A mi pareja, Luis Gustavo Pedrero, por su apoyo incondicional, por sus animos y por estar en todo momento a mi lado compartiendo mis experiencias, fracasos y éxitos.

A mi hermana favorita Ana Karen López Ferrer por sus consejos y animos, por siempre estar ahí para mi en todo momento, por motivarme y defenderme.

A mis asesores y revisores, el Dr. Edmundo, Dr. Salaya, M.C. Ulises Hernandez, Dr. Nava y al Dr. Huijara por apoyarme y compartir conocimientos que fueron parte esencial para concluir mi tesis y por su amistad brindada.

A mis compañeros y a mis verdaderos amigos/as por su sincera e incondicional amistad y quienes le pusieron alegría y diversión a esta larga carrera.

A todos mis profesores que fueron partícipes de mi formación académica, por compartir conmigo sus conocimientos, por su paciencia y su tiempo y la amistad brindada, agradezco de manera especial al Dr. Rufo Sanchez y al Dr. Jaime Cazares por sus consejos, su apoyo y su amistad sincera.

Al Programa de Fomento a la Investigación (PFI) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por la beca otorgada para la realización de la presente tesis por medio del proyecto de investigación "Diversidad y caracterización de hongos endófitos en los sistemas agroforestales cacaotales" con clave UJAT-2012-IB-22.

DEDICATORIA

A mis padres Julia Ferrer Hernandez y Jose López Perez.

Por ser la parte mas importante de mi vida, porque sin ustedes esto no hubiera sido posible, este logro es de ustedes, y jamas encontrare forma de agradecerles el haberme hecho una persona de bien, llena del amor que ustedes siempre me dan, sus esfuerzos y sacrificios valieron la pena, gracias por su confianza y por jamas dejarme sola, los amo infinitamente. Lo logramos!!!

A mis sobrinos Adriana Juliet y Jose Armando

Por alegrar mis días con sus travesuras y ocurrencias. El dia de mañana ustedes tienen que ser mejores que yo. Los adoro con toda mi alma

A mi tio Jose Alberto Ferrer Hernandez

(Que en paz descanse) porque siempre estuviste orgulloso de mi y se que estuvieras muy feliz de ver que porfin lo logre. Donde quiera que estes este logro igual es para ti, por siempre motivarme. Te extraño.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS E HIPOTESIS	3
2.1. Objetivos	3
2.1.1. Objetivo general	3
2.1.2. Objetivos específicos	3
2.2. Hipótesis	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Importancia de <i>Trichoderma</i>	4
3.2. Taxonomía y morfología.....	4
3.3. Ciclo de vida.....	6
3.4. Identificación molecular de <i>Trichoderma</i>	6
3.5. Aplicación en la agricultura de <i>Trichoderma</i>	8
4. MATERIALES Y METODOS	11
4.1. Fase de campo.....	11
4.1.1. Localización del área de estudio	11
4.1.2. Muestreo	11
4.2. Fase de laboratorio	12
4.2.1. Aislamiento de cepas	12
4.2.2. Identificación morfológica.....	13
4.3. Identificación molecular.....	14
4.3.1. Extracción del ADN	14
4.3.2. Amplificación del ADN por PCR	14
4.3.3. Electroforesis	15
4.3.4. Purificación de la amplificación del ADN	15
4.3.5. Inferencia filogenética	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIONES	27
7. LITERATURA CITADA	28
8. ANEXOS	35

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Ubicación de los sitios de muestreo en los municipios de Tabasco bajo los sistemas-agroforestales.....	12
Cuadro 2.	Aislamiento e identificación morfológica de el género <i>Trichoderma</i>	17
Cuadro 3.	Alineación de las secuencias de ADN genómico de las cepas con el BLAST del NCBI (GenBank-National Center for Biotechnology Information).....	22
Cuadro 4.	Especies de <i>Trichoderma</i> presentes en la rizósfera de sistemas agroforestales cacaotales, identificados por amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 4, y de la región 5.8S del ARN ribosomal. Tabasco, México.....	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de las características microscópicas de <i>Trichoderma</i>	6
Figura 2.	Porción del rADN mostrando la ubicación de las regiones ITS (1 y 4) y 5.8S.....	14
Figura 3.	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trichoderma</i> : a) cepa T1, micelio color blanco, anillos concéntricos color verde, conidioforos y fiálides, y b) cepa T2, micelio color vino a 48 h de crecimiento, anillos concéntricos verde oscuro, conidioforos y fiálides.....	18
Figura 4.	Características microscópicas de <i>Trichoderma</i> ; cepa T4: a) fiálides en grupos que nacen en pequeños racimos terminales, b) conidioforos y conidios de forma ovoide; cepa T6: c) conidioforos y conidios, d) esporas.....	19
Figura 5.	Amplificación de la región ITS del ADNr de <i>Trichoderma</i> spp., con los primers ITS1-ITS4 a una altura de 620 pares de bases aproximadamente.....	20
Figura 6.	Amplificaciones de la región ITS del ADNr de <i>Trichoderma</i> spp., diluidas 1:10 con los primers ITS1-ITS4 a una altura de 620 pb aproximadamente a) T1, T2, T3 y b) T5 y T10.....	21
Figura 7.	Relación filogenética de cinco aislamientos de <i>Trichoderma</i> , con 16 especies y como outgroup <i>Aspergillus flavus</i> inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 5.8S e ITS4).	24
Figura 8.	Relación filogenética de cinco aislamientos de <i>Trichoderma</i> con dos especies y como outgroup <i>Aspergillus flavus</i> inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 5.8S e ITS4). La barra de escala = 0.1 sustituciones por sitio.....	25

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue identificar morfológicamente y molecularmente las especies del género *Trichoderma* spp., de la zona de la rizosfera de los sistemas agroforestales-cacaotales del estado de Tabasco. En el aislamiento y la identificación morfológica de el género *Trichoderma/Hypocrea* la cual se realizó con base a las características morfológicas de los conidióforos y de los conidios siguiendo el protocolo descrito en la clave taxonómica de Samuels y Villegas, donde se obtuvieron un total de 13 cepas de la rizósfera de sistemas agroforestales cacaotales, de estas, cuatro corresponden a Comalcalco, cuatro a Cunduacan y cinco a Cardenas del estado de Tabasco, las cuales a las 24 h observaron un micelio de color blanco y algodonoso con tonalidades diferentes formando anillos concéntricos de dos a siete, las cepas fuerón cambiando de color verde claro a verde intenso a las 48 h, esto se debió a la alta producción de esporas en el micelio, tomando un color final de vino tinto. Las características microscópicas de las colonias de *Trichoderma* spp., de las 13 cepas mostraron en forma general que los conidióforos son hialinos, largos, ramificados, no verticilados y en los talos presentan los fiálides individuales o en grupos de dos o tres que nacen en pequeños racimos terminales, los conidios son hialinos de una sola célula de forma ovoides. Las amplificaciones del ADN genómico diluidas 1:10 de las cepas: T1, T2, T3, T5 y T10, las bandas dieron un peso molecular de 500 a 620 pb aproximadamente. En la electroforesis y edición de las secuencias de DNA genómico de las cepas T1Comalcalco, T2Comalcalco, T3Comalcalco, T5Cardenas y T10Cunduacan con el BLAST del NCBI, la homologación de porcentaje de identidad fue aproximadamente del 100% con las especies *T.harzianum* y *T. koningiopsis*. En el árbol filogenético los aislamientos se agrupan en las ramas de las dos especies *T. harzianum* y *T.koningiopsi*, con soportes superiores a 70%. La especie más abundante fue *T. harzianum* (34%), que estuvo presente en 2 de 12 sitios muestreados y *T.koningiopsi* (8%) que estuvo presente en 1 solo sitio, actualmente estas especies de *Trichoderma* son unos de los agentes de mayor uso en programas de control biológico como reguladores de fitopatógenos y promotores del crecimiento vegetal.

1.- INTRODUCCIÓN

Trichoderma spp., fue identificado por Person (1794), la primera delimitación de la especie *harzianum* del genero *Trichoderma* spp., la realizó Harz (1871), quien enfatizó la importancia y las características microscópicas de *Trichoderma*, especialmente por la presencia de fiálides (Bisset, 1991). Se han descrito alrededor de 40 taxones de *Trichoderma* spp., hasta la fecha (Samuels *et al.*, 1999) de los cuales más de 20 se han descrito para usos agrícolas.

Torres *et al.* (2015) reportaron nueve especies de *Trichoderma* identificadas morfológica y molecularmente: *Trichoderma asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*/H. *lixii*, *T. koningiopsis*/H. *koningiopsis*, *T. longibrachiatum*/H. *sagamiensis*, *T. pleurotica*, *T. reesei*/H. *jecorina*, *T. spirale* y *T. virens*/H. *virens* aislados en sistemas agroforestales cacaotales en Tabasco, México. Las especies del género *Trichoderma* se han utilizado en programas de control biológico como reguladores de fitopatógenos como; *Phytophthora* spp., *Sclerotium cepivorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp., (Tondje *et al.* 2007; Vinale *et al.* 2008; Guigon *et al.* 2010; Siameto *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2011; Sánchez *et al.* 2012; Hernández *et al.* 2013).

Con el descubrimiento en 1986 de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como una de las mayores técnicas moleculares que ha permitido establecer la identidad de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, esta técnica en combinación con la secuenciación y análisis de secuencias, con la cual se triplicó la cantidad de especies descritas de *Trichoderma* spp., lo que ha revolucionado la sistemática de hongos sobre todo los que sirven de controladores (Edel, 1998). Para la identificación molecular a nivel de especies para el género *Trichoderma* spp., se han empleado diferentes técnicas de biología molecular entre ellas el RAPD por sus siglas en ingles (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) y UP-PCR (Primer Universal-Reacción en Cadena de la Polimerasa); Sánchez *et al.* (2012) reportaron la identificación de *Hypocrea crassa*/T. *crassum* mediante el análisis de la secuencia de ITS1 (región espaciadora transcrita interna) y *tef1* (factor de elongación 1 alfa), los cuales amplificaron por PCR usando los primers ITS1 e ITS4 para el ITS y EF1-728F y TEF1 para el *tef1*. Hernández *et al.* (2013), con marcadores RAPD y rADN-ITS a

nivel molecular, identificó varias especies, entre ellas *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. atroviride*, *T. pseudokoninngii* y *T. longibrachiatum*. Por lo anterior, es de suma importancia continuar con los estudios y la caracterización molecular de las especies de *Trichoderma* spp., que pueden encontrarse en la rizosfera de los diferentes sistemas agrícolas tropicales como en los agroforestales-cacaotales.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Identificar morfológicamente y molecularmente las especies del género *Trichoderma* spp., de la zona de la rizosfera de los sistemas agroforestales-cacaotales del estado de Tabasco.

2.1.1. Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente *Trichoderma* spp., de la rizosfera de sistemas agroforestales cacaotales.
- Comparar secuencias de las cepas aisladas de *Trichoderma* de los sistemas agroforestales-cacaotales para el modelo algorítmico.
- Realizar la inferencia filogenética de las especies de este género.

2.2. Hipótesis

Algunas especies de *Trichoderma* de importancia se encuentran presentes en la rizosfera de los sistemas agroforestales cacaotales de la región Chontalpa del estado de Tabasco.

3.- ANTECEDENTES

3.1. Importancia de *Trichoderma*

La necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad del campo ha impulsado la búsqueda de estrategias de control de enfermedades agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico, y que además implique bajar el riesgo ambiental y sanitario sin arriesgar la salud humana, que constituye un gran reto para la agricultura y su desarrollo (Gallegos *et al.* 2003; Zavaleta, 1999).

Existe un grupo de hongos que presentan efectos antagónicos contra hongos y bacterias fitopatógenos del suelo y ésta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre estos microorganismos se encuentran los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Fernández, 2001). Los más utilizados son *Trichoderma* spp., por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación.

Correa *et al.* (2007) y Sempere *et al.* (2007), indican que tiene efecto antagonista sobre hongos del suelo como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium*, *Mycosphaerella fijiensis* y *Rhizoctonia*; es importante mencionar que se cuenta con formulados comerciales de *Trichoderma* spp., para el control de diferentes fitopatógenos; sin embargo, estos formulados no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas debido a las diversas condiciones ambientales que existen en la naturaleza, las cuales pueden aumentar o disminuir la efectividad de los formulados. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de otras especies de *Trichoderma* que actúen contra diferentes enfermedades de plantas causadas por microorganismos en diversas condiciones, a fin de obtener resultados satisfactorios.

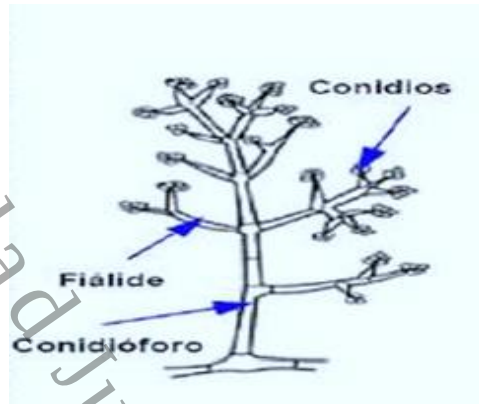
3.2. Taxonomía y morfología

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetozoa (fungi), Division Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euscomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea* (Samuels, 2006).

Dunn *et al.* (1982) describieron la morfología macroscópica el crecimiento de *Trichoderma* en etapas tempranas presenta un color blanco y posteriormente desarrolla un color verdoso, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica, el blanco corresponde al crecimiento del micelio y el color verde corresponde a la formación de fialosporas que en última instancia se vuelven de un color verde opaco. Inicialmente se ve como una superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas, permite que se observe una superficie levemente algodonosa. Así mismo, las colonias de *Trichoderma* crecen rápidamente bajo condiciones favorables de temperatura (20°C - 30°C) con una temperatura óptima 25°C y un período de incubación de 5 días con luz constante y un pH entre 3.7 y 6.0, el contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es 92% y para su esporulación es 93% a 95%, tiene cierta respuesta a la luz, la cual promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración.

Las características microscópicas de este género corresponden a conidióforos que pueden oscilar entre 3 a 12 µm de diámetro, son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6.3-15.6 µm., con verticilios terminales de hasta 4 conidios de un tamaño aproximado de 2 a 3 µm, los conidios son redondos o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio (Figura 1). Sus clamidosporas son intercalares y formadas por

el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color verde suave y un tamaño menor de 15 μm (Samuels, 1996; Bisset, 1991; Hoog, 2000).



Fuente: Donati, (2011). Recuperado el 16 de agosto 2016

Figura 1. Representación esquemática de las características microscópicas de *Trichoderma*.

3.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Trichoderma*, inicia cuando el organismo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica que mide 5-10 μ de diámetro. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5 μ de diámetro son liberadas en un gran número. También se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o mas clamidosporas se pueden fusionar (Rifai, 1969; Doyle, 1991; Seaby, 1996).

3.4. Identificación molecular de *Trichoderma*

A pesar de que la caracterización morfológica es el método más utilizado para identificar especies de *Trichoderma* (Druzhinina *et al.* 2004), ésta es muy propensa a errores, con la consecuencia de que alrededor del 50% de los aislados depositados en colecciones bajo este método, están mal identificados, influyendo el incremento en el número de aislamientos, la variabilidad fenotípica y su proximidad con *Hypocrea* y *Gliocladium* (Druzhinina *et al.* 2005). Una alternativa para sobrellevar éste problema es la utilización del denominado “Reconocimiento de Especies

Filogenéticas por Concordancia Genealógica” (GCPSR, por sus siglas en Inglés) (Taylor *et al.* 2000), la cual es una alternativa con base en análisis moleculares para complementar la identificación morfológica. Para la identificación de *Trichoderma*, se han utilizado los genes: factor de la elongación de la traducción 1 α (tef1), subunidad II de la ARN polimerasa (rpb2), quitinasa 18-5 (ech42), calmodulina (calm1), actina, β -tubulina 2 (tubb2), proteína nuclear (las1) y la subunidad A del gen de la ATP citrato liasa (acla); los cuales proveen loci informativos para estudios multigenes (Hoyos-Carvajal *et al.* 2011). Sin embargo, la gran mayoría de los investigadores que se dedican al estudio de *Trichoderma* como organismo biocontrolador, no invierten una gran cantidad de tiempo y dinero en estos análisis, sino que más bien siguen utilizando la identificación morfológica y la identificación molecular con base en las secuencias de las regiones espaciadores transcritas internas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) del DNA ribosomal, de estas secuencias se realizan búsquedas de homologías mediante la opción BLAST-N del NCBI (GenBank-National Center for Biotechnology Information) y se comparan con las reportadas en las bases de datos (Druzhinina *et al.* 2004).

Las secuencias repetidas en grupos altamente diversos como los microsatélites y minisatélites, así como las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS por sus siglas en ingles) del ADNr nuclear, son marcadores moleculares muy usados en análisis filogenéticos y estudios poblacionales (Castro *et al.* 2008). La comparación de secuencias de ITS de ADN ribosomal (ADNr) es usada en taxonomía, tiene un alto grado de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas y es prácticamente constante para una especie específica. Además las regiones ITS son flanqueadas por secuencias conservadas que facilitan el diseño de iniciadores para su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Jaramillo-Pineda *et al.* 2015).

Las aplicaciones de la técnica PCR son muy amplias entre las más usadas para el campo agropecuario se encuentra la detección e identificación de virus, bacterias, hongos, nematodos (Cenis, 1993). El éxito de esta técnica consiste en su sencillez teórica y en la rapidez en su ejecución, que permite la identificación de un

microorganismo en el menor tiempo tras la extracción de DNA a partir de cualquier tejido y en combinación con otras técnicas que llevan a la identificación del microorganismo.

3.5. Aplicación de *Trichoderma* en la agricultura

La versatilidad, adaptabilidad y la fácil manipulación de las especies de *Trichoderma* permite su uso efectivo en el control biológico (Martínez *et al.* 2013). El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura, es el antagonismo con microorganismos fitopatógenos (Guedez *et al.* 2012; Cuervo *et al.* 2014; Landero *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016; Youssef *et al.* 2016). Además, ha mostrado influencia en la promoción del crecimiento de algunas plantas de importancia económica (Youssef *et al.* 2016; Singh *et al.* 2016). Otro efecto favorable es que induce resistencia a fitopatógenos en las plantas con las que se asocia (Liu *et al.* 2016).

Trichoderma produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, los cuales son activos contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de la espора hasta la esporulación, además ésta reúne una serie de características en su interacción directa con el patógeno, que, según Harman (2000) y Howell (2006), hace de este organismo un buen agente antagonista de hongos y bacterias causantes de enfermedades en las plantas.

Los organismos que se oponen de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otros, se considera que es un organismo antagonista (Infante *et al.* 2009). Los mecanismos antagónicos que utiliza *Trichoderma* spp., se describen como antibiosis, micoparasitismo y competencia, sin ser estos mutuamente excluyentes y pudiendo por lo tanto actuar a la vez (Dubos, 1987). La competencia por nutrientes y espacio, es entendida como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás; un factor esencial para que exista competencia es que se halla en cantidades insuficientes de un elemento,

si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio y, por último, la desactivación de las enzimas de los patógenos (Benítez *et al.* 2004, Saravanakumar *et al.* 2016). Sea mediante contacto directo o sin establecer contacto físico alguno, *Trichoderma* spp., puede inhibir el crecimiento de otros hongos y bacterias mediante la producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, viridina y gliovirina (Howell, 1993, Zeilinger *et al.* 2016). El micoparasitismo puede ser definido como el uso del patógeno como alimento por su antagonista, en el que generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos (Benítez *et al.* 2004, Zeilinger *et al.* 2016; Saravanakumar *et al.* 2016; Mallikharjuna *et al.* 2016).

De acuerdo a las referencias consultadas las cepas de *Trichoderma* más comercializadas para el control biológico son *Trichoderma viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum* (Harman, 2000, Ávila-Miranda *et al.* 2006, Rojo *et al.* 2007, Mbarga *et al.* 2014; Buysens *et al.* 2016).

La inducción de resistencia sistémica por *Trichoderma* en el hospedero es uno de los mecanismos indirectos de mayor interés en la actualidad (Mukherjee *et al.* 2013) e involucra cambios celulares en el hospedero, tales como un aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y aumento en la actividad peroxidasa y quitinasa (Harman, 2006, Saravanakumar *et al.* 2016). Otros procesos relacionados con la inducción sistémica contra patógenos del suelo, tal como *F. Oxysporum* f. spp., *Lycopersici* son el confinamiento, la inhibición del patógeno y los cambios histológicos en el hospedero. Estos últimos relacionados con la producción de reguladores de crecimiento y estimulación de la división, diferenciación y crecimiento celular en la planta por el agente elicitor (Hermosa *et al.* 2013).

Se ha comprobado que *T. harzianum* estimula y mejora el crecimiento de las plantas, lo que puede significar un posible aumento en los rendimientos. La rápida colonización de la rizosfera y de las capas superficiales de las raíces permiten el

control biológico y la supresión de los hongos fitopatógenos del suelo, siendo una de las principales características de *T. harzianum*, que por consecuencia de este biocontrol se estimula el crecimiento de las plantas (Harman *et al.* 2004, Youssef *et al.* 2016). Además del efecto biocontrolador, varios mecanismos se han propuesto para explicar el efecto promotor del crecimiento, entre ellos, Sutton (1993), señala que *T. harzianum* produce metabolitos que estimulan el crecimiento y desarrollo vegetal; Windham (1986) y Zeilinger *et al.* (2016), determinaron la producción de fitohormonas de crecimiento por parte del hongo como el ácido 3-indol acético (AIA) y sus análogos, la presencia de éstos estimula el desarrollo radicular.

Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) reportarán aumentos en la producción de biomasa, mejora a la resistencia bajo condiciones de estrés, productividad e incremento en la absorción de nutrientes en cultivos como el clavel, crisantemo, petunia, pepino, berenjena, guisante, pimiento, rábano, tabaco, tomate, lechuga, zanahoria, papa, maíz, amapola, algodón, mijo, frijol, cacao, pastos ornamentales y especies forestales.

Por sus características como promotor del crecimiento en las plantas se utiliza frecuentemente *T. harzianum* en diferentes productos comerciales y formulaciones (Moreno-Sarmiento *et al.* 2007, Youssef *et al.* 2016).

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fase de campo

4.1.1 Localización del área de estudio

El estado de Tabasco se encuentra localizado en el sureste de la República Mexicana, entre los 17°15' y 18°39' de altitud norte y los 91°00' y 94°07' de longitud oeste. Los climas prevalecientes son *Am* y *Af* que corresponden a climas cálidos húmedos, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen (García, 2004). Cuenta con 191 km de la costa del país, es decir, el 1,58%, colinda al norte con el golfo de México, al noreste con el estado de Campeche, al sureste con la República de Guatemala, al oeste con el estado de Veracruz y al sur con Chiapas. La superficie de su territorio ocupa una extensión cercana a los 25 000 km². Una de las Subregiones es la Chontalpa, es territorialmente hablando, la segunda en importancia de las que constituyen el estado, ocupa 7,482.13 km², es decir, el 31.34% del territorio tabasqueño; cuenta con 593,668 habitantes, de los cuales 241,168 pertenecen a la zona urbana y 352,500 a las rurales (SIAP-SAGARPA 2016). El área de estudio está conformada por tres municipios: Cunduacán, Cárdenas y Comalcalco con los sitios de muestreos (Cuadro 1).

4.1.2. Muestreo

Se tomaron cuatro muestras compuestas por municipio de estudio, en cada sitio se tomaron 30 submuestras homogéneas al azar en zig-zag del horizonte, evitando las orillas y tomando la parte media de la plantación (0-30 cm de profundidad) y se homogeneizó para una muestra compuesta (NOM-021-SERMANAT-2000).

Cuadro 1. Ubicación de los sitios de muestreo en los municipios de Tabasco bajo los sistemas-agroforestales.

SITIO	MUNICIPIO	LOCALIDAD	COORDENADAS
1	Cunduacán.	Yoloxochilt 1ra sección	18° 06' 16.9"N 93° 16' 50.2"W
2	Cunduacán.	Miahuatlan	18° 06' 07.7"N 93° 09' 54.2"W
3	Cunduacán.	San Severo	18° 08' 05.5"N 93° 07' 48.9"W
4	Cunduacán.	Yoloxochilt 2da sección	18° 04' 55.7"N 93° 15' 06.4"W
5	Comalcalco.	Oriente 3ra sección	18° 18' 38.3"N 93° 13' 01.5"W
6	Comalcalco.	Oriente 2da sección	18° 18' 54.3"N 93° 12' 37.0"W
7	Comalcalco.	Chipilín	18° 19' 03.8"N 93° 13' 24.4"W
8	Comalcalco.	Benito Juárez	18° 18' 43.6"N 93° 12' 54.7"W
9	Cárdenas.	Arroyo hondo 2° sección	18° 01' 37.2"N 93° 25' 01.5"W
10	Cárdenas.	Poblado C-28	17° 59' 33.1"N 93° 20' 53.4"W
11	Cárdenas.	Arroyo hondo 1ra sección	18° 01' 01.0"N 93° 26' 11.5"N
12	Cárdenas.	Poblado C-33	17° 96' 75.0"N 93° 56' 50.0"W

4.2. Fase de laboratorio

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Rizosfera del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional (IPN).

4.2.1 Aislamiento de cepas

El aislamiento de *Trichoderma* se realizó por el método de dilución en placa de acuerdo a la metodología descrita por Rivas y Pavone (2010) y Villamil *et al.* (2012). De las muestras compuestas por cada sitio de muestreo se tomó 10 g del material edáfico, el cual se suspendió por separado en un matraz Herlenmeyer de 500 mL que

contenía 100 mL de agua destilada esterilizada y se agitó durante 5 minutos, para después tomar alícuotas de 1 mL con una micropipeta graduada de 100 a 1000 μ L y se transfirieron en tubos de ensayo que contenía 4 mL de agua destilada estéril, se realizaron diluciones seriadas de 1/10 (p/v) para cada muestra, de estas se sembraron alícuotas de 0.5 mL en cajas petri con medio de cultivo Agar Dextrosa Papa (PDA por sus siglas en inglés) suplementado con ampicilina y amoxicilina (1 mg mL⁻¹ cada uno) y se dispersó uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo con una varilla “L” de vidrio, se prepararon 3 repeticiones por dilución utilizada. Las cajas fueron incubadas a 25 °C $\pm$ 1 durante ocho días. Para el reconocimiento del género *Trichoderma* se siguió el criterio de crecimiento rápido y extendido de color blanco a verde sugerido por Rivas y Pavone (2010). Se hicieron montajes al microscopio para observar la presencia de características morfológicas de conidios y conidióforos. Posteriormente, se hicieron reaislamientos de cepas de *Trichoderma* hasta obtener colonias puras. Pasando los ocho días, de las cajas petri con un asa de platino se tomaron fracciones de micelio de la colonia con características morfológicas y se transfirió en medio de cultivo PDA dispersándolo en forma estriada. Las cajas se incubaron a 25 °C $\pm$ 1 durante ocho días y se conservaron para realizar la extracción de ADN.

4.2.2 Identificación morfológica

La identificación se realizó con base a las características morfológicas de los conidióforos y de los conidios siguiendo el protocolo descrito en la clave taxonómica de Samuels *et al.* (1999) y Villegas (2005). De las cepas de *Trichoderma* completamente esporuladas se realizó montajes en portaobjetos, la fijación se hizo con ácido láctico y la tinción con lactofenol. Se colocó el cubre objeto y se observaron las estructuras morfológicas, utilizando un estereoscopio y un microscopio compuesto marca Carl Zeiss.

4.3 Identificación molecular

4.3.1 Extracción del ADN

El ADN de las especies de *Trichoderma* se obtuvo del micelio de las colonias sembradas en cajas petri con PDA, el micelio fue homogeneizado en tubos de eppendorf para después realizar la extracción de ADN genómico utilizando el método de DNAzol Genomic ADN Isolation Reagent (cat. No. DN 127, Molecular Research Center, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual se basa en el uso de una solución de lisis guanidina-detergente que hidroliza ARN y permite la precipitación selectiva del ADN a partir de un lisado celular, y finalmente el ADN se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop, 2000; Thermo Scientific).

4.3.2 Amplificación del ADN por PCR

La *región espaciadora transcrita interna (ITS)*, se amplificó por PCR usando los cebadores ITS1, el 5.8S del rDNA (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al. 1990). La mezcla de reacción de la PCR se preparó con un volumen final de 25 μ L conteniendo: H₂O up, buffer sin MgCl₂ (1X), dNTPS (0.4 mM), MgCl₂ (1 mM), ITS-1 (0.4 μ M), ITS-4 (0.4 μ M), Taq Polimerasa (1 unidad) y ADN (60 ng). El programa de amplificación consistió en los siguientes ciclos: 1 ciclo de 95°C por 4 min, 32 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 2 min y un ciclo de 72°C por 5 min. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Labnet International Inc, MultiGene Gradient Cat. TC9600-G, serie 090863).

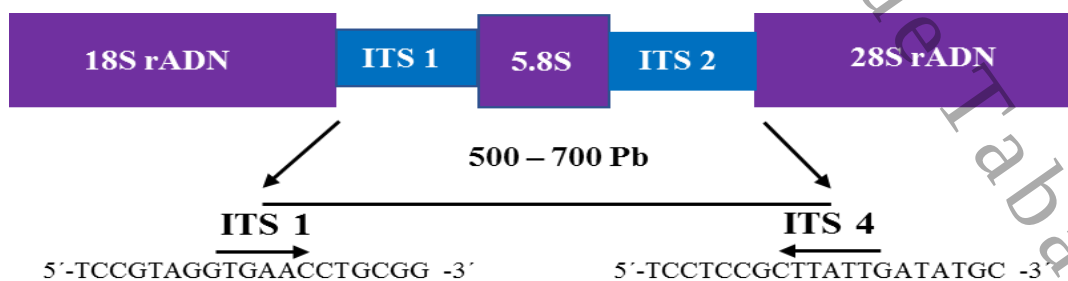


Figura 2. Porción del rADN mostrando la ubicación de las regiones ITS (1 y 4) y 5.8S.

4.3.3 Electroforesis

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis (Camara de electroforesis, Galileo bioscience, modelo 80-0708, serie 023629) en geles de agarosa al 1% en un amortiguador TAE 0.5% (Tris Acetate-EDTA), teñidos con bromuro de etidio, separados a 95 V durante 30 min (Electrophoresis Power Supply-EPS 301, Amersham Biosciences, serie T80010972) con un marcador de 1 kb ADN Ladder (Invitrogen Cat. No. 15615-016). Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (Bio Rad, Universal Hood II, serie 765/07032).

4.3.4 Purificación de la amplificación del ADN

Los fragmentos de PCR fueron purificados con el Kit QIAquick PCR Purificación (Cat.No. 28104, QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y se midieron las concentraciones de DNA de las amplificaciones con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Posteriormente, cada producto de PCR purificado con la concentración de DNA mínima de 400 ng/μl fueron secados en baño maria con una temperatura de 45°C. Los productos fueron secuenciados por el LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad) del CINVESTAV en Irapuato México.

4.3.5 Inferencia Filogenética

Las secuencias enviadas por el LANGEBIO del CINVESTAV en Irapuato, México, fueron editadas y se ensamblaron con el Software Suite For Sequence Analysis DNASTAR Lasergene (versión 7.0), de las secuencias editadas se realizaron búsquedas de homologías mediante la opción BLAST-N del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Para la comparación de los valores generados con la secuencia de estudio se considero una similitud de $\geq 97\%$.

La inferencia filogenética se realizó usando secuencias del GenBank, como grupo externo (outgroup) se utilizó una secuencia de *Aspergillus Flavus* (número de acceso Gen Bank: AF138287); también se utilizaron secuencias de 16 especies de *Trichoderma*: *T. Harzianum* (EU280079, LN846720, KU896349, AF057593 y

AF057600), *T. Pleurotica* (JQ040377), *T. Virens* (JQ040400), *T. Spirale* (EU280082), *T. Brevicompactum* (JQ040334), *T. Reesei* (JQ040380), *T. Longibrachiatum* (JN108926), *T. Koningiopsi* (JQ040370, FJ884183), *T. Asperellum* (JQ040317), *T. Ovalisporum* (DQ315458), *T. Erinaceum* (EU280106), *T. Hamatum* (DQ109530), *T. Viridescens* (EU280104), *T. Atroviride* (KC469612), *T. Rossicum* (EU280089), *T. Crassum* (EU280085). Con el software MEGA 6 (versión 6.06) se realizó el alineamiento y posteriormente se eliminaron los gaps, después se determinó el modelo con el algoritmo de Neighbor-Joining, se usó el método estadístico de Máxima Parsimonia con un 1000 de bootstrap.

5.- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Morfología de *Trichoderma* ssp.

En el aislamiento y la identificación morfológica de el género *Trichoderma/Hypocrea* se obtuvieron un total de 13 cepas de la rizósfera de sistemas agroforestales cacaotales, de estas, cuatro corresponden a Comalcalco, cuatro a Cunduacan y cinco a Cardenas del estado de Tabasco (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamiento e identificación morfológica de el género *Trichoderma*.

Municipio	Localidad	Coordenadas	Clave de las cepas
Comalcalco	Chipilín	18° 19' 03.8"N	T1, T2, T3, T4.
Cardenas	Arroyo hondo 2° sección	18° 01' 37.2"N	T5, T6, T7
	Poblado C-28	17° 59' 33.1"N	T8
Cunduacan	Yoloxochilt 1ra sección	18° 06' 16.9"N	T9, T10
	Yoloxochilt 2da sección	18° 04' 55.7"N	T11
	Miahuatlan	93° 16' 50.2"W	T12, T13

Las propiedades físico-químicas del suelo de las localidades pertenecientes a los tres municipios del estado de Tabasco, donde se aisló *Trichoderma* spp., presentó un pH moderadamente ácido (5.6) a neutro (6.9), 9.3% de materia orgánica y densidad aparente de 1.26 g/cm³ (Antele, 2015). Estas propiedades del suelo nos indican que el hongo habita en suelos acidos-neutros con un alto contenido de materia organica y con un sistema de conservación sustentable del ecosistema. De estos suelos es de donde se realizó el aislamiento e identificación macroscópica del género *Trichoderma* spp., a las 24 h se observó un micelio de color blanco y algodonoso con tonalidades diferentes formando anillos concéntricos de dos a siete, las cepas fueron cambiando de color verde claro a verde intenso a las 48 h, esto se debió a la alta producción de esporas en el micelio, tomando un color final de vino tinto (Figura 3).

Estas características concuerdan con lo descrito por Villegas (2005), Romero *et al*, (2009) y en relación a la morfología con otro trabajo reportado por Rivas-Cordero y Pavone-Maniscalco (2010) que identificaron del género *Trichoderma* seis especies de la rizósfera de plantas de *T. cacao* del estado de Carabobo, Venezuela y Torres de la Cruz *et al*, (2015) que encontraron nueve especies de *Trichoderma/Hypocrea* en el agroecosistema cacao en el estado de Tabasco, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*/H. *sagamiensis*, *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis*/H. *koningiopsis*, *T. spirale*, *T. pleurotica* y *T. reesei*/H. *jecorina*.

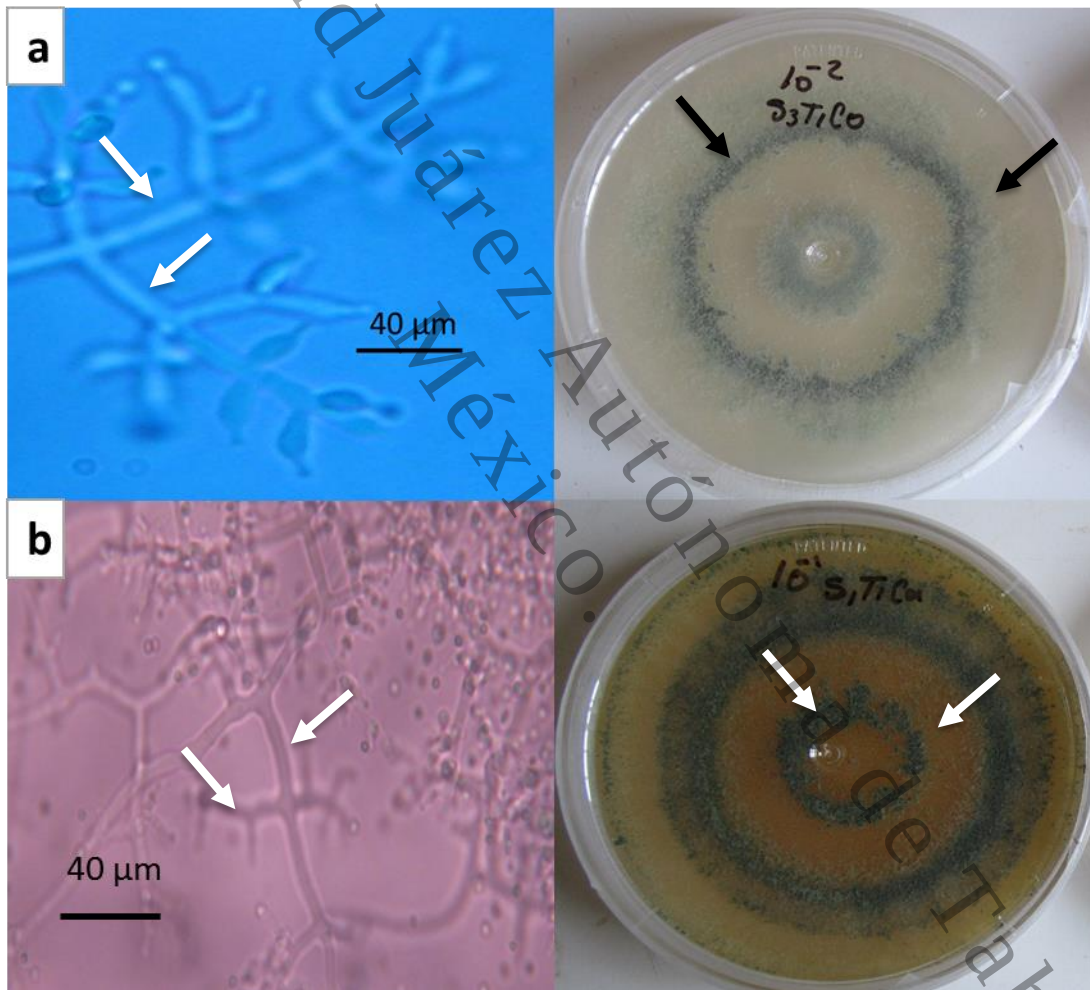


Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de *Trichoderma*. a) cepa T1, micelio color blanco, anillos concéntricos color verde, conidioforos y fiálides, y b) cepa T2, micelio color vino a 48 h de crecimiento, anillos concéntricos verde oscuro, conidióforos y fiálides.

Las características microscópicas de las colonias de *Trichoderma* spp., de las 13 cepas mostraron en forma general que los conidióforos son hialinos, largos, ramificados, no verticilados y en los talos presentan los fiálides individuales o en grupos de dos o tres que nacen en pequeños racimos terminales, las axilas son de 90°, los conidios son hialinos de una sola célula de forma ovoides y algunos rugosos o ásperos (Figura 4). Estas características coinciden con Samuels *et al.* (1999) y Villegas (2005) quienes describen que morfológicamente en el género *Trichoderma*, sobresalen sus conidióforos para varias especies con un agregado de masa conidial en forma de penachos los cuales son fértiles y presentan brazos cortos con axilas que se proyectan de 90° o 100°, poseen de uno hasta cuatro fiálides que son largos no verticilados y unicelulares en forma de botella, con ramificaciones irregulares que

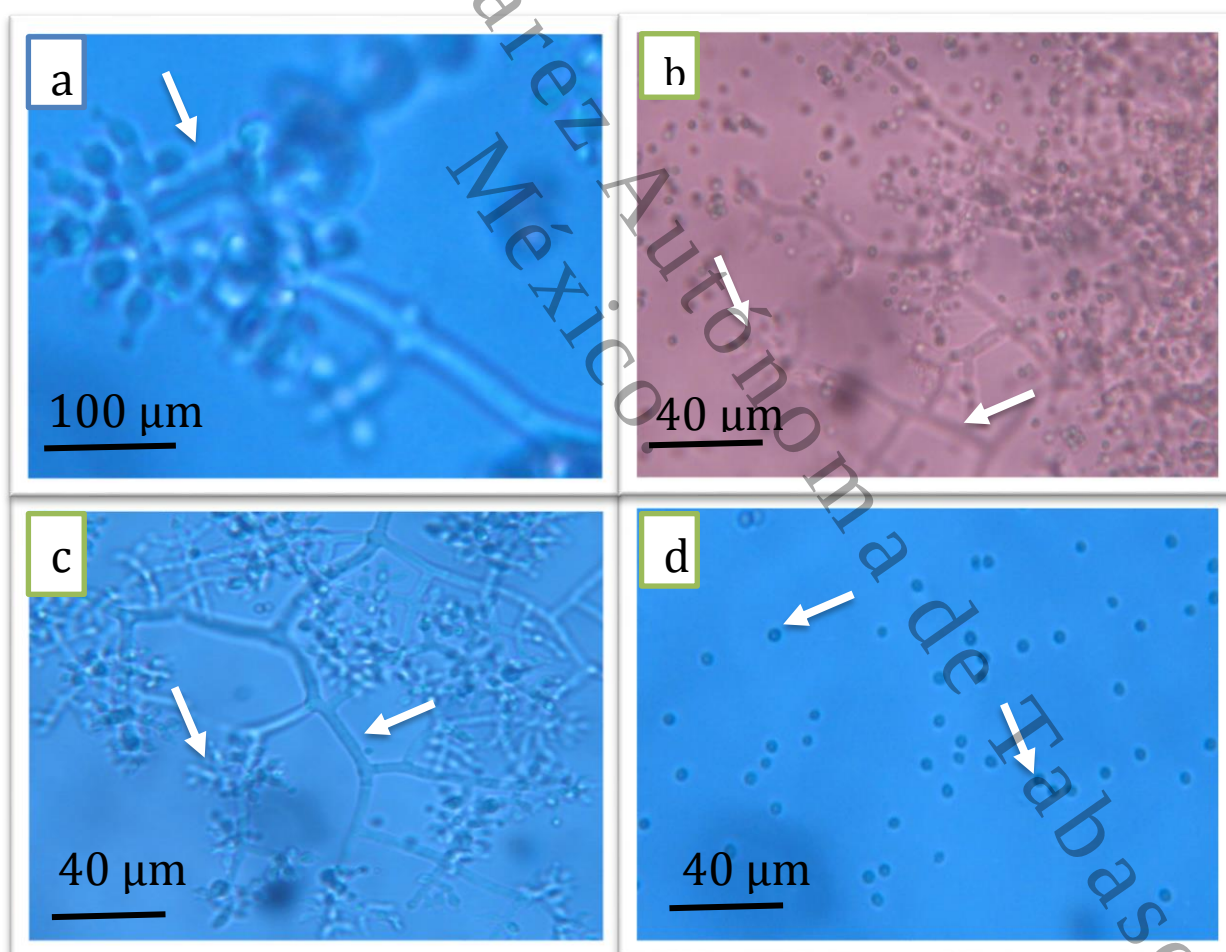


Figura 4. Características microscópicas de *Trichoderma*; cepa T4: a) fiálides en grupos que nacen en pequeños racimos terminales, b) conidióforos y conidios de forma ovoide; cepa T6: c) conidioforos y conidios, d) esporas.

nacen en el centro del talo en formas pequeñas y al final están los conidios del tipo globosos, subglobosos o elipsoidales. Algunas especies tienen la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, las cuales son estructuras de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas, esto lo demuestran los estudios realizados por Samuels *et al.* (1999) y Torres-De la Cruz *et al.* (2015).

5.2. Amplificación del ADN genómico por PCR.

Para la identificación molecular de las especies *Trichoderma* se utilizaron los primers ITS1-ITS4 diseñados por White *et al.* (1990), los cuales son considerados como universales para la amplificación de la región ITS del ADNr de hongos. Las amplificaciones del ADN genómico en la electroforesis dieron como resultados bandas de entre 500 y 750 pb, en cuyos productos de PCR de ADN genómico y en el gel de agarosa no se observaron bandas en la mayoría de los pozos (Figura 5). La ausencia de bandas de amplificación en *Trichoderma* se puede deber a la presencia de productos inhibidores de PCR en el ADN extraído con el protocolo (Saltos, 2012).

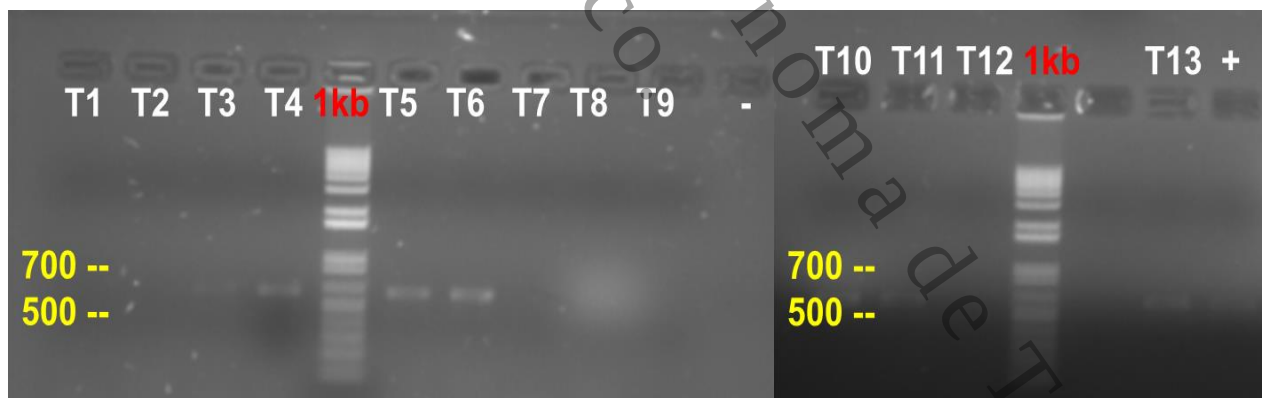


Figura 5. Amplificación de la región ITS del ADNr de *Trichoderma* spp., con los primers ITS1-ITS4 a una altura de 620 pb aproximadamente.

Las amplificaciones del ADN genómico diluidas 1:10 de las cepas: T1, T2, T3, T5 y T10, las bandas dan un peso molecular de 500 a 620 pb aproximadamente, las cuales fueron las esperadas de acuerdo al tamaño de las secuencias parciales del ITS1 e ITS4 del ADNr (522–620 pb) según White *et al.* (1990). Las bandas muestran un marcado tenue, lo cual puede ser resultado del protocolo de extracción de ADN genómico utilizado (DNAzol Genomic ADN Isolation Reagent) (Figura 6). Saltos (2012) trabajó con tres protocolos para la amplificación de DNA genómico: 1) CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide), 2) SDS (Dodecilsulfato sódico) + phenol:cloroformo:isoamilalcohol y 3) CTAB + PVP (Polivinilpirrolidona); con los protocolos 1 y 3 obtuvo bandas tenues degradadas, mientras que con el protocolo 2 mostró bandas intensas en la electroforesis, pero con la desventaja de que este protocolo incluye mas tiempo además de ser compuestos altamente tóxicos y costosos. Al contrario, del método DNAzol que es menos toxico, mas rápido en cada paso de la técnica y es económico.

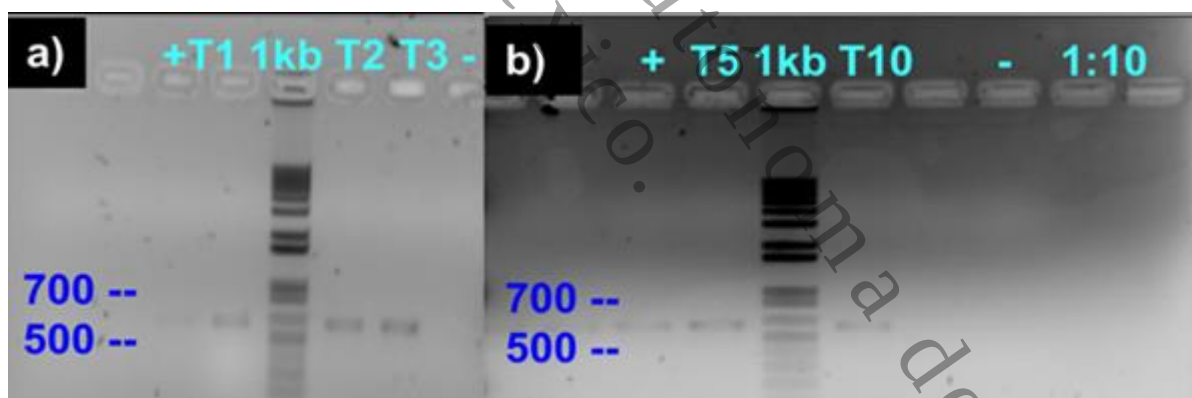


Figura 6. Amplificaciones de la región ITS del ADNr de *Trichoderma* spp., diluidas 1:10 con los primers ITS1-ITS4 de 620 pb aproximadamente a) T1, T2, T3 y b) T5 y T10

5.3. Inferencia filogenética.

En la alineación de las secuencias de DNA genómico de las cepas T1Comalcalco, T2Comalcalco, T3Comalcalco, T5Cardenas y T10Cunduacan con el BLAST del NCBI, la homologación de porcentaje de identidad fue aproximadamente del 100% con las especies *T.harzianum* y *T. koningiopsis* (Cuadro 3). Torres *et al.* (2015) encontraron nueve especies de *Trichoderma* identificadas morfológica y molecularmente aislados en suelos de sistemas agroforestales cacaotales en Tabasco, México entre las que se encuentran *T. harzianum* y *T. koningiopsis*. La especie *T. harzianum* ha sido desde el siglo XX la base del estudio conociendo su morfología, su estudio genómico molecular y su diversidad patogénica así como la utilización como un biocontrolador de enfermedades en especies vegetales (Samuels *et al.* 1999; Romero *et al.* 2009). Mientras que *T. koningiopsis* ayuda a la supresión de la esporulación de *B. cinérea* en cultivos de tomate (You *et al.* 2016). Además se encontró que las cepas de *Trichoderma* spp., son más resistentes que la mayoría de los hongos a compuestos tóxicos como fungicidas químicos y a compuestos antimicrobianos producidos por microorganismos del suelo y plantas (Harman *et al.* 2004).

Cuadro 3. Alineación de las secuencias de DNA genómico de las cepas con el BLAST del NCBI.

Cepa	% de identidad	Número de acceso al GenBank	Organismo Genbank
T1COMALCALCO	100	AF057600	<i>Trichoderma harzianum</i>
T2COMALCALCO	100	KU896349	<i>Trichoderma harzianum</i>
T3COMALCALCO	100	AF057593	<i>Trichoderma harzianum</i>
T5CARDENAS	100	FJ884183	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
T10CUNDUACAN	99	LN846720	<i>Trichoderma harzianum</i>

Se muestra el árbol filogenético obtenido de 16 especies con las secuencias del género *Trichoderma* con su número de acceso al GenBank y como outgroup *Aspergillus flavus*, y los cinco aislamientos de los sistemas agroforestales cacaotales, estos aislamientos se agrupan en las ramas de las dos especies *T. harzianum* y *T. koningiopsi*, con soportes superiores a 70%. La filogenia fue inferida por el método neighbor-joining, modelo Tamura (T92+G) y la distancia evolutiva fue estimada por el método distancia de proporción. Los números en los nodos representan el porcentaje del bootstrapping con 1,000 repeticiones. La barra de escala = 0.2 sustituciones por sitio. La elección del outgroup y de las especies del género *Trichoderma* se basó en los resultados de la comparación de los nucleótidos de las secuencias de estudio con la base de datos del genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2017).

En el presente estudio, la especie más abundante fue *T. harzianum* (34%), que estuvo presente en 2 de 12 sitios muestreados y *T. koningiopsi* (8%) que estuvo presente en 1 solo sitio (Figura 7).

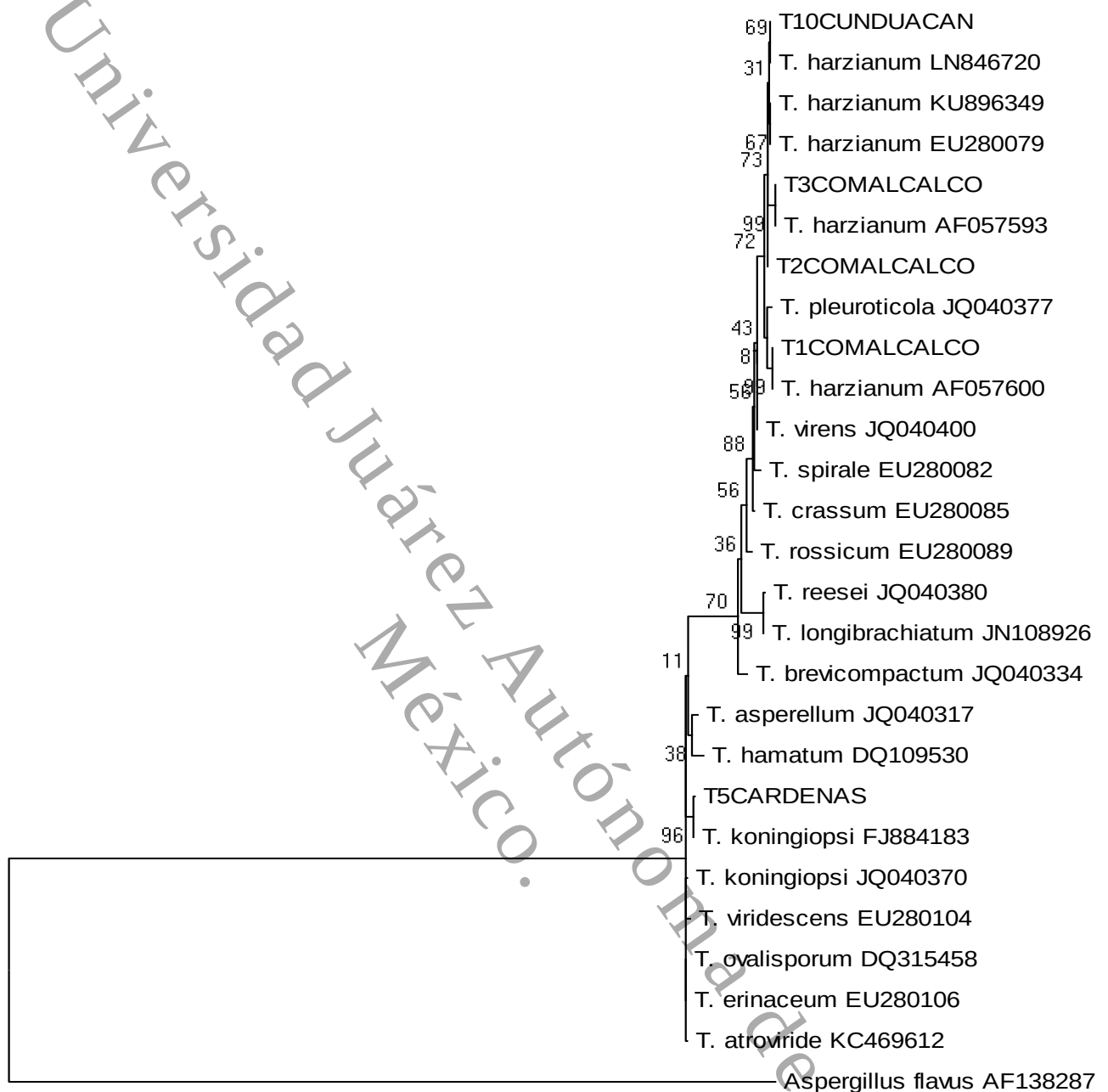


Figura 7. Relación filogenética de cinco aislamientos de *Trichoderma*, con 16 especies y como outgroup *Aspergillus flavus* inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 5.8S e ITS4).

En la relación filogenética de los cinco aislamientos de *Trichoderma* con dos especies y como outgroup *Aspergillus flavus* inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 5.8S e ITS4), se reafirma la agrupación de las dos especies con *T. harzianum* y *T. koningiopsi* para identificar molecularmente las cinco cepas de hongos aislados y purificados de los sistemas agroforestales cacaotales (Figura 8).

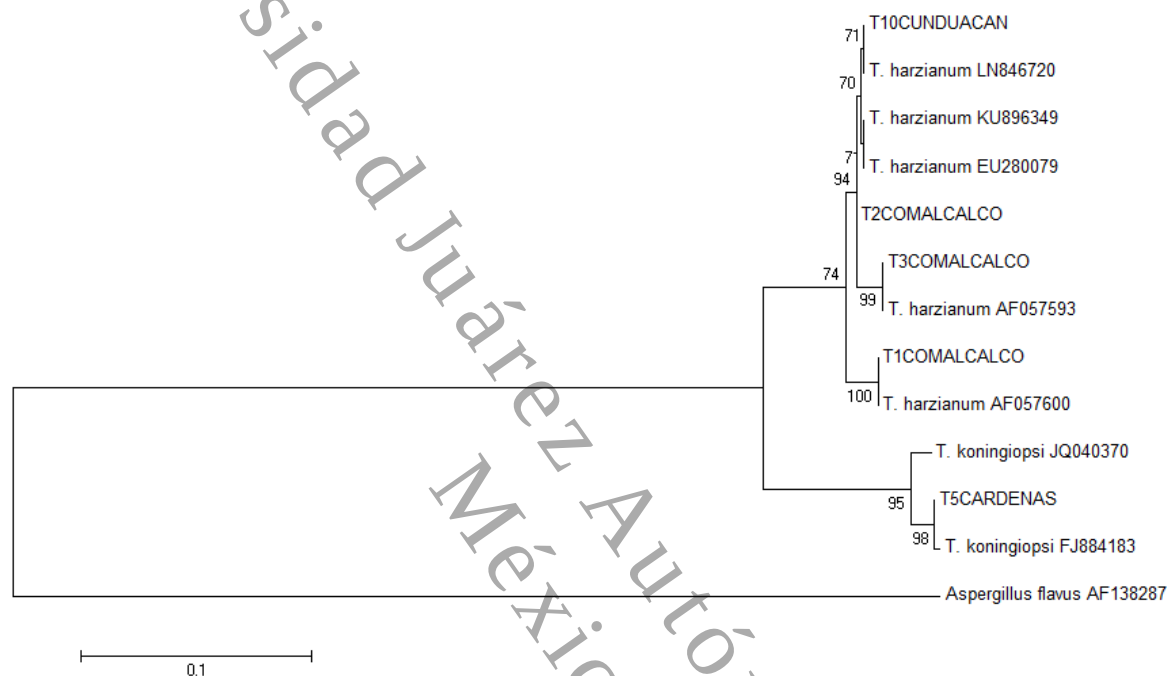


Figura 8. Relación filogenética de cinco aislamientos de *Trichoderma* con dos especies y como outgroup *Aspergillus flavus* inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 5.8S e ITS4). La barra de escala = 0.1 sustituciones por sitio.

La herramienta BLAST mostró que la secuencia del gen ITS de las cepas T1COMALCALCO, T2COMALCALCO, T3COMALCALCO, T5CARDENAS y T10CUNDUACAN en la alineación on line las homologías fueron del 94-100% a especies identificadas correctamente como *T. harzianum* y *T. koningiopsi*, las secuencias obtenidas fueron visualizadas con el programa software MEGA 6 se realizaron los alineamientos de las secuencias, edición y elaboración de arboles filogenéticos (Figura 5 y 6). Estas se depositaron en el GenBank y sus números de acceso se muestran en el Cuadro 4 (ver Anexo A).

Cuadro 4. Especies de *Trichoderma* presentes en la rizósfera de sistemas agroforestales cacaotales, identificados por amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 4, y de la región 5.8S del ARN ribosomal. Tabasco, México.

Cepa	Identificación molecular	Identidad %	Referencia (Genbank)
T1COMALCALCO	<i>T. harzianum</i>	100	KY490998
T2COMALCALCO	<i>T. harzianum</i>	94	KY490999
T3COMALCALCO	<i>T. harzianum</i>	94	KY491000
T10CUNDUACAN	<i>T. koningiopsis</i>	98	KY491001
T5CARDENAS	<i>T. harzianum</i>	94	KY491002

Para la identificación molecular de las especies TAXA existen cuatro propuestas de conceptos: 1) el concepto morfológico de especies (“Morphological Species Concept”, MSC), 2) el concepto biológico de especies (“Biological Species Concept”, BSC), 3) el concepto filogenético de especies (“Phylogenetic Species Concept”, PSC) y 4) el concepto evolutivo de especies (“Evolutionary Species Concept”, ESC). Avise y Wollenberg (1997) discuten que el ESC es el concepto netamente teorico pero los otros tres tratan de reconocer especies evolutivas. De acuerdo con los autores mencionados acerca de los conceptos de reconocimiento de especies Taylor *et al.* (2000) propone que el acercamiento a una definición de especies en hongos se haga desde el PSC mediante el análisis de numerosos locus polimórficos. Es por ello que el proceso de identificación de las especies *Hypocrea/Trichoderma* ha crecido considerablemente por el análisis de secuencias de distintos genes o secuencias neutras como ITS (Kullnig-Gradinger *et al.* 2002). Actualmente ha aumentado el número de marcadores genéticos como el factor de elongación de la transcripción (*tef1*), calmodulina (*cal*), actina (*act*), subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*) (Samuels *et al.* 2009, Druzhinina *et al.* 2012).

El protocolo de PCR para la amplificación de ADN ribosomal genómico para la identificación de especies que comenzó a ser aplicado por Kullnig *et al.* (2002). En este caso se utilizó para conocer las especies del género *Trichoderma* de las cepas aisladas de los sistemas agroforestales, se realizó, apartir de las secuencias rADN-

ITS, se amplificaron con los ITS1 e ITS4 y la subunidad 5.8S del ADN ribosomal y compararon las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en las bases de datos internacionales como el EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) y NCBI, y a la vez fueron depositadas en el banco de genes las secuencias editadas y se le proporcionaron un número de acceso.

Como parte de la caracterización molecular de cepas de interés en el estado anamórfico *Trichoderma*, se han aplicado las técnicas de marcadores moleculares al azar con el fin de obtener polimorfismos útiles para monitorear la colonización y supervivencia de las cepas aplicadas en ensayos de control biológico (Barrera, 2012). Las técnicas más utilizadas para obtener este tipo de marcadores moleculares para los agentes de control biológico (BCAs) son: RAPD ("Random Amplified Polymorphic ADN") por Abbassi *et al.* (1999), UP-PCR (PCR con cebadores universales "Universal Primed PCR") por Bulat *et al.* (1998), T-RFLP ("Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism") por Cordier y Alabouvette (2009) y AFLP ("Amplification Fragment Length Polymorphism") por Larralde-Corona *et al.* (2008).

6.- CONCLUSIONES

Se identificaron morfológicamente 13 cepas del género *Trichoderma* y molecularmente dos especies, *T. harzianum* y *T. koningiopsi*, de las 13 cepas solo se amplificaron cinco y de estas cinco corresponden cuatro a *T. harzianum* y una a *T. koningiopsi* de la zona de la rizosfera de los sistemas agroforestales-cacaotales del estado de Tabasco.

Actualmente las especies de *T. harzianum* y *T. koningiopsi* son unos de los agentes de mayor uso en programas de control biológico como reguladores de fitopatógenos y promotores del crecimiento vegetal principalmente en hortalizas como solanáceas y brassicas, y frutales tropicales, *C. papaya* y *T. cacao*.

7.- LITERATURA CITADA

- Abbasi, P. A., Miller, S. A., Meulia, T., Hoitink, H. A. J., & Kim, J.-M. (1999). Precise Detection and Tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in Compost-Amended Potting Mixes by Using Molecular Markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5421–5426. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91738/>
- Antele, G.J.B. (2015). Levantamiento nutrimental de los suelos y bioquímicas de la mazorca (*Theobroma cacao* L.) en los sistemas agroforestales-cacaotales. Tesis de licenciatura. DACA-UJAT. Villahermosa, Tabasco, México. 50 p.
- Avila Miranda, M., Herrera Estrella, A., & Peña Cabriales, 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 Biology And Biochemistry*, 38(7), 1823-1830. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.036>
- Awise, J. C. & Wollenberg, K. (1997). Phylogenetics and the origin of species. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA* 96, 7748-7755. Recuperado de <http://www.pnas.org/content/94/15/7748.full#ref-list-1>
- Barrera V. A. (2012). El género *Hypocrea* Fr. (*Hypocreales*, *Ascomycota*) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 240 p. Recuperado de www.digital.bl.fcen.uba.ar
- Benítez, T.; A.M. Rincón; M.C. Limón y A.C. Codón. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Intl. Microbiol.* 7(4), 249-260. Recuperado de <http://www.im.microbios.org/0704/0704249.pdf>
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.*, 69(11), 2357-2372. <http://dx.doi.org/10.1139/b91-297>
- Bulat, S. A., Lübeck, M., Mironenko, N., Funck Jensen, D., & Stephensen Lübeck, P. (1998). UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Mycological Research*, 102(8), 933–943. Recuperado de <https://www.cambridge.org/core/article/div-class-title-up-pcr-analysis-and-its1-ribotyping-of-strains-of-span-class-italic-trichoderma-span-and-span-class-italic-gliocladium-span-div/E36D423DBD7CBB9F5E444D17DBCC8288>
- Buysens, C., César, V., Ferrais, F., Dupré de Boulois, H., & Declerck, S. (2016). Inoculation of *Medicago sativa* cover crop with *Rhizophagus irregularis* and *Trichoderma harzianum* increases the yield of subsequently-grown potato under low nutrient conditions. *Applied Soil Ecology*, 105, 137-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.011>
- Castro G. M., Sánchez, R. & Troncoso L. (2008). ITS como marcador nuclear de polimorfismo en poblaciones de *Peromytilus purpuratus* (Lamarck, 1819). *Revista Tumbaga*, 3, 128-140. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3994413.pdf>
- Cenis, J. (1993). Identification of Four Major Meloidogyne spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, 83(1), 76. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-83-76>

- Cordier, C. & Alabouvette, C. (2009). Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non target soil micro-organisms. *European Journal of Soil Biology*, 45(3), 267-274. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1164556308001556>
- Correa, S. M., Mello, R. Z., Ávila, B. L., Minare, R. R., Padua, y D. Gomes. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11, 3-9. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144001.pdf>.
- Cuervo, J., A., Sánchez., V., Romero., T., & Ramirez., M. (2014). *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal Of Microbiology Research*, 8(16), 1704-1712. <http://dx.doi.org/10.5897/ajmr2013.6279>
- Donati, S. (2011). Efecto de *Trichoderma Harzianum* cepa L1 sobre la calidad de plantines en *Pinus taeda*. Tesis de licenciatura. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay 144 p.
- Doyle, O. (1991). *Trichoderma* green mould. *The Irish Mushroom Review*. 3, 13-17.
- Druzhinina I., Kopchinskiy A. (2004). *Trichoderma* Morphology. International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. Recuperado de <http://www.isth.info/tools/morphkey/index.php>
- Druzhinina, I. & Kubicek, C. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal Of Zhejiang University Science*, 6B(2), 100-112. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.b0100>
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, G. A. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47, 55–64. <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-006-0279-7>
- 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 Genetics and Biology*, 49(5), 358–368. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.02.004>
- Dubos, B. (1987). Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: Innovative approaches to plant disease control, ed. by I. Chet, pp.107-135. John Wiley and Sons, New York, Ecological and Applied Microbiology. Recuperado de <http://prodinra.inra.fr/record/106693>
- Dunn, M., Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (1982). Compendium of Soil Fungi. *Taxon*, 31(3), 600. <http://dx.doi.org/10.2307/1220704>
- Edel (1998). Identificación microbiana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología bacteriana, Universidad de Oviedo. España, *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(4), 238-45
- Fernández-Larrea V. O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 62, 96-100.
- Gallegos Morales, G., Cepeda Siller, M., & Olayo Paredes, R. (2003). *Entomopatogenos*. Mexico City, Mexico: Trillas.
- García E (2004) Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlos a condiciones de la República Mexicana). Cuarta edición. Instituto

- de Geografía Universidad Nacional Autónoma de México. 90 p. Recuperado de http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo_siglo21/serie_lib/modific_al_sis.pdf
- Guédez, Clemencia, Cañizalez, Luis, Castillo, Carmen, & Olivar, Rafael. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44-49. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100009&lng=es&tlng=es.
- Guigon L. C., Guerrero Prieto, V., Vargas Albores, F., Carvajal Millan, E., Ávila Quezada, G. D., Bravo Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. Su tasa de crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 87-96. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/612/61218468002.pdf>
- Harman, G. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4), 377-393. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2000.84.4.377>
- Harman, G. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-96-0190>
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hermosa R., B. Rubio, M., R. E. Cardoza, C. Nicolas, E. Monte, S. Gutierrez. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16, 69-80. Recuperado de <http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/72575/72340>
- Hernández A., Jiménez M., Arcia A., Ulacio D., Méndez N. (2013). Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. Mediante RAPD y rADN-ITS. *Bioagro*, 25(3), 167-174. Recuperado de [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev25\(3\)/3.%20MS%201301.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev25(3)/3.%20MS%201301.pdf)
- Hernández M. J. L., Sánchez Pérez, M. I., García Olivares, J. G., Pérez, N. M., González Prieto, J. M. y Quiroz Velásquez, J. C. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(2), 176-185. Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/28009>
- Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J. and Figueras, M. J. (2000). Atlas de hongos clinicos. 2da edición. Ed. CBS Utrece y the Netherland, 2, 1-1126.
- Howell, C. (2006). Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *Phytopathology*, 96(2), 178-180. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-96-0178>
- Howell, C., Stipanovic, R., & Lumsden, R. (1993). Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science And Technology*, 3(4), 435-441. <http://dx.doi.org/10.1080/09583159309355298>

- Hoyos-Carvajal L., Bissett J. (2011). Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. En: Grillo O., Venora G. (Eds.). The dynamical processes of biodiversity-Case of studies of evolution and spatial distribution. *Intech*. 366 pp
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, 51(3), 409-416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018>
- Infante D., B, Martinez, N, Gonzalez y Y. Reyes (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24, 14-21. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
- Jaramillo-Pineda J, Guerrero-Olazarán M, Fuentes-Garibay J. A, Viader-Salvadó J. M, Meza-García J. L & Morales-Ramos L. H. (2015). Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33, 1-11. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n1/2007-8080-rmfi-33-01-00001.pdf>
- Kullnig-Gradinger, C.M., G. Szakacs, C.P. Kubicek, (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. *Mycological Research*, 106, 757-767. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208601148>
- Landero Valenzuela, N., Nieto Angel, D., Téliz Ortiz, D., Alatorre Rosas, R., Fredy Ortíz García, C., & Orozco Santos, M. (2015). Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*, 91, 88-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>
- Larralde-Corona, C. P., Santiago-Mena, M. R., Sifuentes-Rincon, A. M. (2008) Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology Biotechnology*, 80, 167-177. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-008-1532-0>
- Liu, S., Liao, C., Lo, C., Yang, H., Lin, K., & Peng, K. (2016). Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. *Physiological And Molecular Plant Pathology*, 96, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.06.003>
- Mallikharjuna Rao, K., Siva Raju, K., & Ravisankar, H. (2016). Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 47(1), 25-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.007>
- Martínez, B, Infante, Danay, & Reyes, Yusimy. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522013000100001&lng=es&tlng=es.
- Mayden R. L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In *Species: The Units of Biodiversity*. Oaridge, H.A. Dawah and MR. Wilson. (Eds.), pp 381-424. Chapman & Hall. Recuperado de

- <http://www.faculty.biol.ttu.edu/Strauss/Phylogenetics/Readings/Mayden1997.pdf>
- Mbarga, J., Begoude, B., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., & Schiffers, B. et al. (2014). A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*, 77, 15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.06.004>
- Moreno-Sarmiento, N., L. Moreno-Rodríguez y D. Uribe-Vélez. (2007). Biofertilizantes para la agricultura en Colombia, 38-45.
- Mukherjee, P., Horwitz, B., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 51(1), 105-129. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2017). Recuperado el 20 de Enero de 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Norma Oficial Mexicana. (2000). Qué establece las especificaciones de Fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. NOM-021-RECNAT-2000. 2ª ed, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 89. Recuperado de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116, 1-56
- Rivas, C.M. y Pavone, M.D. (2010). Diversidad de *Trichoderma* spp. En plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer. *Interciencia*, 35(10), 777-783. Recuperado de http://www.interciencia.org/v35_10/777.pdf
- Rojo, F., Reynoso, M., Ferez, M., Chulze, S., & Torres, A. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, 26(4), 549-555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.006>
- Romero, A.O., Huerta, L.M., Damian, H.M.A., Domínguez, H.F. y Arellano, V.D.A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.
- Salto, R. N. (2012). Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino (*Lulworthia grandispora*). Tesis de licenciatura. Universidad De Guayaquil Facultad De Ciencias Naturales Escuela De Biología. Guayaquil, Ecuador. 90 p.
- Samuels, G.J., Lieckfeldt, E. y Nirenberg, H.I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1), 71-88.
- Samuels, G. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923-935. [http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562\(96\)80043-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562(96)80043-8)
- Samuels, G. J. & Ismaiel, A. (2009). *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtii*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia*. 101(1), 142-156. Recuperado de <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=27641&content=PDF>

- Samuels, G. J. (2006). Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96 (2), 195-206. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHTO-96-0195>
- Sánchez L. V., Martínez Bolaños, L., Zavala González, E. A. y Ramírez Lepe, M. (2012). Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. *Revista Mexicana de Micología*, 36, 17-26. Recuperado de <http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2012/10/Vol.-36-p%C3%A1ginas-17-26.pdf>
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., & Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, 94, 37-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>
- Seaby, D. (1996). Investigation of the epidemiology of green mould of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology*, 45(5), 913-923. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1996.tb02902.x>
- Sempere, F. & Santamarina, M. (2007). In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia*, 163(3), 183-190. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-007-0101-x>
- Siameto, E. N., Okoth, S., Amugune, N. O. y Chege, N. C. (2011) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma harzianum* from embu district, Kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 81-90. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/939/93916247011.pdf>
- SIAP-SAGARPA, (2016). Sistema producto cacao. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>. Consulta: noviembre 2016
- Singh, V., Upadhyay, R., Sarma, B., & Singh, H. (2016). *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research*, 193, 74-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.002>
- Sutton, J. (1993). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry Leaves. *Phytopathology*, 83(6), 615. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-83-615>
- Taylor, J., Jacobson, D., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D., Hibbett, D., & Fisher, M. (2000). Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. *Fungal Genetics And Biology*, 31(1), 21-32. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>
- Tondje, P., Roberts, D., Bon, M., Widmer, T., Samuels, G., & Ismaiel, A. et al. (2007). Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control*, 43(2), 202-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.004>
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 86(4), 947-961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>

- Villamil, C.J.E., Blanco, V.J.E. y Viteri, R.S.E. (2012). Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad de Agronomía Medellín*, 65(1), 6305-6315. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1799/179924340002.pdf>
- Villegas, M. (2005). Características generales de *Trichoderma* y su potencial biológico en la agricultura sostenible, http://www.oriusbiochem.com/escrito?nom=Trichoderma_pers.Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible. Consulta: Noviembre 2016.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology And Biochemistry*, 40(1), 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Windham, M. (1986). A Mechanism for Increased Plant Growth Induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76(5), 518. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-76-518>
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101, 31-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>
- Youssef, S., Tartoura, K., & Abdelraouf, G. (2016). Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 100, 79-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.001>
- Zavaleta, M. E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana*. 17(3), 201-207. Recuperada de <http://www.redalyc.org/pdf/573/57317304.pdf>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

8.- ANEXOS

A)

LOCUS KY490998 543 bp DNA linear PLN 14-MAR-2017

DEFINITION *Trichoderma harzianum* isolate T1COMALCALCO internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION KY490998

VERSION KY490998.1

KEYWORDS .

SOURCE *Trichoderma harzianum*

ORGANISM [Trichoderma harzianum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 543)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE *Trichoderma* species identified molecularly in the inhibition of *Moniliophthora roreri*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 543)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JAN-2017) Division Academica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Km 25 carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco 86000, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES

Location/Qualifiers

source 1..543
/organism="Trichoderma harzianum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="T1COMALCALCO"
/db_xref="taxon:5544"

[misc RNA](#) <1..>543
/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

1 accgagttta aactcccaaa cccaatgtga acgctaccaa actgttgact cggcgggcatc
61 tctgccccgg ggcggtcgca gccccggacc aaggcgcccg ccggangacc aacccaaaac
121 tcttatttga taccctctcg cgggttattt ttactatctg agccttctcg ggcctctctg
181 tgggcgtttc gaaaatgaat caaaactttc aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat
241 gaagaacgca gcgaaatgcy ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga atcatcgaat
301 ctttgaacgc acattgcgcc cgccagtatt ctggcgggca tgcctgtccg agcgtcattt
361 caaccctcga accctccggy ggggtcggcg ttggggatcg gccctccctc tggggggcgg
421 tctccgaaat gcagtggcgy tctcgccgca gcctctctcg cgcagtagtt tgcacactcc
481 caccgggagc gcggcgcgcy cacagccggt aaacacccaa cttctgaaat gttgacstcg
541 gat

LOCUS KY490999 497 bp DNA linear PLN 14-MAR-2017

DEFINITION *Trichoderma harzianum* isolate T2COMALCALCO internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION KY490999

VERSION KY490999.1

KEYWORDS .

SOURCE *Trichoderma harzianum*

ORGANISM [Trichoderma harzianum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 497)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE *Trichoderma* species identified molecularly in the inhibition of *Moniliophthora roreri*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 497)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JAN-2017) Division Academica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Km 25 carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco 86000, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..497
/organism="Trichoderma harzianum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="T2COMALCALCO"
/db_xref="taxon:5544"

[misc RNA](#) <1..>497
/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

1 aatgtgaacg ttaccaaact gttgcctcgg cgggatctct gcccggggtg cgtcgcagcc
61 ccggaccaag gcgcccgcgc gaggaccaac caaaactctt attgtatacc cctcgcggg
121 tttttttata atctgagcct tctcggcgcc tctcgtaggc gtttcgaaaa tgaatcaaaa
181 ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag
241 taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccgcga
301 gtattctggc gggcatgcct gtccgagcgt catttcaacc ctcgaacccc tccggggggg
361 cggcggttggg gatcgggcct cccttagcgg gtggccgtct ccgaaatata gtggcggtct
421 cgccgcagcc tctcctgcgc agtagtttgc aactcgcac cgggagcgcg gcggtccac
481 agccgttaaa cacccaa

LOCUS KY491000 546 bp DNA linear PLN 14-MAR-2017

DEFINITION *Trichoderma harzianum* isolate T3COMALCALCO internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION KY491000

VERSION KY491000.1

KEYWORDS .

SOURCE *Trichoderma harzianum*

ORGANISM [Trichoderma harzianum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 546)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE *Trichoderma* species identified molecularly in the inhibition of *Moniliophthora roreri*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 546)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JAN-2017) Division Academica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Km 25 carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco 86000, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..546
/organism="Trichoderma harzianum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="T3COMALCALCO"
/db_xref="taxon:5544"

[misc RNA](#) <1..>546
/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

1 acccagtata caactcccaa acccaatgtg aacgttatca aactgttgcc tcggcgggat
61 ctctgccccg ggtgtgtcgc agccccggac caaggcgccc gccggaggac caaccaaacc
121 tcttattgta taccctctcg cgggtttttt tataatctga gccttctcgg cgctctcgt
181 aggcgtttcg aaaatgaatc aaactttca acaacggatc tcttggttct ggcacgatg
241 aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga tcatcgaatt
301 tttgaacgca cattgcgccc gccagtattt tggcgggcat gcctgtccga gcgtcatttc
361 aaccctcgaa cccctccggg gggctcggcg tggggatcgg cctccctta ggggggtggc
421 cgtttccgaa atacagtggc ggtctcgccg cagcctttcc ctgcgcagta gtttcacac
481 tcgcatcggg agcgcggcgc gtccacagcc gttaaaccac caacttctga aatgttgacc
541 tcggat

LOCUS KY491001 497 bp DNA linear PLN 14-MAR-2017

DEFINITION *Trichoderma harzianum* isolate T10CUNDUACAN internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION KY491001

VERSION KY491001.1

KEYWORDS .

SOURCE *Trichoderma harzianum*

ORGANISM [Trichoderma harzianum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 497)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE *Trichoderma* species identified molecularly in the inhibition of *Moniliophthora roreri*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 497)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JAN-2017) Division Academica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Km 25 carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco 86000, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES

Location/Qualifiers

source 1..497
/organism="Trichoderma harzianum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="T10CUNDUACAN"
/db_xref="taxon:5544"

[misc RNA](#) <1..>497
/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

1 tgttgccctcg gcggggatctc tgccccgggt gcgtcgcagc cccggaccaa ggcgcccggc
61 ggaggaccaa ccaaaactct tattgtatac cccctcgcgg gtttttttta taatctgagc
121 cttctcggcg cctctcgtag gcgnttcnaa aatgaatcaa aactttcaac aacggatctc
181 ttggttcttg catcgatgaa gaacgcagcg aaatgcgata agtaattgga attgcagaat
241 tcagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgcccgc cagtattctg gcgggcatgc
301 ctgtccgagc gtcatttcaa cctcnaacc cctccggggg gtcggcgttg gggatcggcc
361 ctcccttagc ggggtggcgt ctccgaaata cagtggcggt ctgcgcgag cctctcctgc
421 gcagagtttg cacactcgca tcgggagcgc ggcgcgtcca cagccgttaa acaccaact
481 tctgaaatgt tgacctc

LOCUS KY491002 484 bp DNA linear PLN 14-MAR-2017

DEFINITION *Trichoderma koningiopsis* isolate T5CARDENAS internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION KY491002

VERSION KY491002.1

KEYWORDS .

SOURCE *Trichoderma koningiopsis* (*Hypocrea koningiopsis*)

ORGANISM [Trichoderma koningiopsis](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 484)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.
and Salaya-Dominguez, J.M.

TITLE *Trichoderma* species identified molecularly in the inhibition of *Moniliophthora roreri*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 484)

AUTHORS Lopez-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., Lopez-Morales, D., Gomez-Mendez, E.
and Salaya-Dominguez, J.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JAN-2017) Division Academica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Km 25 carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco 86000, Mexico

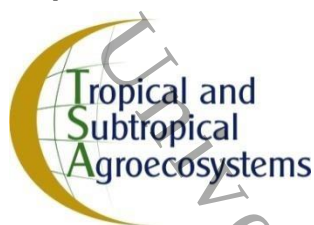
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..484
/organism="Trichoderma koningiopsis"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="T5CARDENAS"
/db_xref="taxon:337941"
[misc RNA](#) <1..>484
/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN
1 aatgtgaacg ttaccaaact gttgcctcgg cgggggtcacg ccccggtgc gtcgcagccc
61 cggaaccagg cgcccgccgg agggaccaac caaactcttt ctgtagtccc ctgcgggacg
121 ttattattta cagctctgag caaaaaattc aaatgaatca aaactttcaa caacggatct
181 cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa
241 ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccg ccagtattct ggcggggcatg
301 cctgtccgag cgtcatttca accctcgaac cccctaggg gggtcggcg ttggggatcg
361 gggaccccta agacgggatc ccggccccga aatacagtgg cggctcgcgc gcagcctctc
421 ctgcgcagta gtttgcacaa ctgcaccgg gagcgcggcg cgtccacgtc cgtaaaacac
481 ccaa

B)

Review [Revisión]



PAPEL DE *Trichoderma* EN LOS SISTEMAS AGROFORESTALES-CACAOTAL COMO UN AGENTE ANTAGÓNICO¹

[*Trichoderma* ROLE IN AGROFORESTRY-CACAOTAL SYSTEMS AS AN ANTAGONAL AGENT]

Ursula del Carmen López-Ferrer¹, Hortensia Brito-Vega^{1*}, David López-Morales¹, José Manuel Salaya-Domínguez¹ and Edmundo Gómez-Méndez¹

¹Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Agropecuarias, Km. 25. Carretera Villahermosa-Teapa, Tel. (993) 3581500 Ext.

6602, 3581585 y 390 27 74. Teapa, Tabasco, México.

E-mails: ursulalopezferrer@hotmail.com, brito05@yahoo.com.mx*, lopezmoralesd@hotmail.com, salaya71@hotmail.com, egomezmen@hotmail.com.

*Corresponding author

RESUMEN

Los sistemas agrícolas y agroforestales cacaotales son importantes para la producción de alimentos y conservación de la biodiversidad. Entre esta diversidad existe un grupo de hongos del género *Trichoderma* que presentan efectos antagónicos contra los fitopatógenos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. En el sistema agroforestal-cacaotal las enfermedades con mayor frecuencia y con mayor impacto en la producción de cacao (*Theobroma cacao*) es la pudrición negra (*Phytophthora* spp.), la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la moniliasis (*Moniliophthora roreri*). El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis de los principales aspectos teóricos y prácticos sobre el género *Trichoderma* y su rol en los agrosistemas-cacaotales y en agricultura como un agente antagónico. Una de las características microscópicas morfológicas en la delimitación del género, especialmente por la presencia de estructuras llamadas fialides. Los mecanismos antagónicos que utiliza *Trichoderma* spp., se describen como competencia, antibiosis y micoparasitismo. El micoparasitismo está teniendo una relevancia sobre las implicaciones de las enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos en su caso la enfermedad *Moniliophthora roreri*. Este hongo puede inhibir el crecimiento de otros hongos y bacterias mediante la producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles. Por otra parte, participa en la producción de reguladores de crecimiento y estimulación de la división, diferenciación y crecimiento celular en la planta por el agente elicitor. Las especies del género *Trichoderma* que se encuentran comercializadas para el control biológico, promotor de crecimiento y biofertilizante son: *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*. Las especies *T. virens* y *T. harzianum* son con mayor uso para el control antagónico de *M. roreri*, *Phytophthora* spp., y *M. perniciosa* en sistemas agroforestales-cacaotales (*Theobroma cacao* L.) con resultados óptimos al efecto inhibidor para estas enfermedades.

Palabras claves: Agrícola; antibiosis; fitopatógenos; mecanismos antagónicos; metabolitos secundarios.

SUMMARY

Agricultural and cocoa agroforestry systems are important for food production and biodiversity conservation. Among this diversity there is a group of fungi of the genus *Trichoderma* that present antagonistic effects against phytopathogens and this action can be used as a form of biological control of plant pathogens. In the agroforestry- cacao system the diseases with the highest frequency and with the greatest impact on cocoa production (*Theobroma cacao*) are black rot (*Phytophthora* spp.), Broom broom (*Moniliophthora perniciosa*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*). The objective of this work was to perform an analysis of the main theoretical and practical aspects about the genus *Trichoderma* and its role in agriculture as an antagonistic agent. One of the microscopic features in the delimitation of the genus, especially by the presence of structures called phalid. The antagonistic mechanisms used by *Trichoderma* spp. Are described as competition, antibiosis and mycoparasitism. Mycoparasitism is having a relevance on the implications of extracellular enzymes such as chitinases, cellulases, β -1-3-glucanases and proteases that lyse or digest the walls of fungi, *Moniliophthora roreri* disease. This fungus can inhibit the growth of other fungi and bacteria by producing several volatile and non-volatile secondary metabolites. On the other hand, it participates in the production of regulators of growth and stimulation of the division, differentiation and cellular growth in the plant by

¹ Submitted November 24, 2016 – Accepted March 06, 2017. This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the elicitor agent. *Trichoderma* species that are commercialized for biological control, growth promoter and biofertilizer are *T. viride*, *T. polysporum* and *T. harzianum*. The *T. virens* and *T. harzianum* species are most used for the antagonistic control of *M. royeri*, *Phytophthora* spp., and *M. pernicioso* in agroforestry-cacao systems (*Theobroma cacao* L.) with optimal results to the inhibitory effect for these diseases.

Key words: Agricultural; antibiosis; phytopathogens; antagonistic mechanisms; secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

La agroforestería es una de las formas de contribuir a la producción de alimentos tanto de animales como del propio ser humano. El sostenimiento de la seguridad alimentaria ha sido la meta principal desde el inicio de la civilización, se ha señalado que el alimento perdurable, pueden ser establecidos únicamente sobre la base de la seguridad ecológica (Mendieta y Rocha, 2007). Los sistemas agroforestales cacaotales son herramientas importantes para la conservación de la biodiversidad, porque tienen diferentes especies y formas de vida vegetal y animal (Beer, 1999, Salgado *et al.*, 2007). Por su estructura estratificada son capaces de proporcionar hábitat, recursos y alimentos a animales y plantas (Guiracocha *et al.*, 2001). La necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad del campo ha impulsado la búsqueda de estrategias de control de enfermedades agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico, y que además implique bajar el riesgo ambiental y sanitario sin arriesgar la salud humana, constituye hoy en día un gran reto para la agricultura y su desarrollo (Zavaleta, 1999; Gallegos *et al.*, 2003). Existe un grupo de hongos que presentan efectos antagonísticos contra los fitopatógenos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre estos microorganismos se encuentran el género *Trichoderma* (Fernández, 2001), de este género destaca la especie *T. harzianum* que desde el siglo XX ha sido la base del estudio conociendo su morfología, diversidad patogenicidad y la utilización como un biocontrolador de enfermedades en otras especies vegetales (Samuels *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis de los principales aspectos teóricos y prácticos sobre el género *Trichoderma* y su rol en la agricultura y en los sistemas agroforestales-cacaotales, que permita a los lectores disponer de información importante, y que se encuentra dispersa en diferentes fuentes, para la selección y uso de este controlador biológico.

El rol en la agricultura del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* spp., fue descrito por primera vez en 1794 por Person quien clasificó cuatro especies (*T. viride*, *Xylohypha nigrescens*, *Sporotrichum aureum* y *Trichotecium roseum*) que actualmente no se consideran relacionadas entre sí, la primera delimitación morfológica de *Trichoderma* spp., la realizó Hartz en 1871, quien enfatizó la importancia y las características microscópicas en la delimitación del

género, especialmente por la presencia de filídes (Bisset, 1991). Se han descrito alrededor de 40 taxones de *Trichoderma* spp., hasta la fecha (Samuels *et al.*, 1999) de los cuales más de 20 se han descrito para usos agrícolas. Estudios recientes por Torres *et al.*, (2015) encontraron nueve especies de *Trichoderma* identificadas morfológica y molecularmente: *Trichoderma asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*/H. *lixii*, *T. koningiopsis*/H. *koningiopsis*, *T. longibrachiatum*/H. *sagamiensis*, *T. pleurotica*, *T. reesei*/H. *jecorina*, *T. spirale* y *T. virens*/H. *virens* aislados en sistemas agroforestales cacaotales en Tabasco, México.

La versatilidad, adaptabilidad y la fácil manipulación de las especies de *Trichoderma* permite tener diferentes roles en la agricultura (Martínez *et al.* 2013). El principal beneficio de *Trichoderma* es el antagonismo con microorganismos patógenos de las plantas (Guedez *et al.*, 2012; Cuervo *et al.*, 2014; Landero *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Youssef *et al.*, 2016), además, ha mostrado influencia en la promoción del crecimiento vegetativo (Youssef *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016) y, otro efecto favorable, es que induce resistencia a fitopatógenos en las plantas con las que se asocia (Liu *et al.*, 2016).

Trichoderma produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, las cuales son activas contra fitopatógenos en diferentes fases de ciclo de vida, desde la germinación de la espóra hasta la esporulación, además ésta reúne una serie de características en su interacción directa con el patógeno, que, según Harman, (2000) y Howell, (2006), hace de este organismo un buen agente antagonista de hongos causantes de enfermedades en los cultivos (Tabla 1). Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista (Infante *et al.*, 2009).

Este género plantea un importante desafío para la sistemática, dado a que las relaciones filogenéticas de muchos de sus miembros todavía no son claras (Rivas y Pavone, 2010). El hongo *Trichoderma* es uno de los agentes de mayor uso en programas de control biológico como reguladores de fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008). Se ha reportado su uso en una diversidad de cultivos de importancia agrícola, como el cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizado como un biocida para el biocontrol de *Crinipellis pernicioso* y *M. royeri* que causan enfermedades del cacao (Cuervo *et al.*, 2014).

Tabla 1. El hongo *Trichoderma* como uno de los agentes de mayor uso en programas de control biológico como reguladores de fitopatógenos.

Especie	Cultivo	Acción	Autor
<i>T. Harzianum</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Resistencia a <i>Botrytis cinerea</i>	Liu et al., 2016
	<i>C. papaya</i>	Inhibición de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Landero et al., 2015
	<i>S. lycopersicum</i>	Promotor del crecimiento y control de <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Youssef et al., 2016 Guedez et al., 2012
<i>T. Asperellum</i>	<i>S. lycopersicum</i> , <i>C. annuum</i> y <i>C. pepo</i> .	Mejora la germinación de la semilla y la longitud de la radícula	Singh et al., 2016
<i>T. Viride</i> y <i>T. Koningii</i>	<i>Gossypium</i>	Inhibición de <i>Rhizoctonia solani</i>	Gajera et al., 2016
<i>T. Koningiopsis</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Supresión de la esporulación en <i>B. cinerea</i>	You et al., 2016
<i>T. Atroviride</i>	Cítricos	Antagonismo de <i>Guignardia citricarpa</i>	Lima et al., 2016
	<i>P. vulgaris</i>	Inhibición de <i>Fusarium solani</i> y promotor del crecimiento	Toghueo et al., 2016
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>C. papaya</i>	Inhibición de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Landero et al., 2015
<i>T. Viridescens</i>	<i>T. cacao</i>	Antagonismo de <i>M. roreri</i> y <i>Phytophthora</i>	Cuervo et al., 2014

Importancia de los agroforestales-cacaotales

La agroforestería es reconocida como un sistema productivo tanto de madera como de alimentos y como un sistema de manejo del suelo, de esta manera se tiene un mejor aprovechamiento de los recursos naturales y la mejora del ecosistema (Palomeque, 2009). El objetivo de la agroforestería es reducir la erosión del suelo, mantenimiento de la fertilidad del suelo, mantenimiento de la cantidad y calidad del agua, retención de carbono, reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, mantenimiento y ordenación de la diversidad biológica en el paisaje agrícola (Mendieta y Rocha, 2007). Los sistemas agroforestales son una forma de uso de la tierra en donde leñosas perennes interactúan biológicamente en un área con cultivos y animales. Así también, los sistemas agroforestales pueden servir a los esfuerzos de conservación dependiendo de los factores como diseño y origen, su permanencia en el paisaje, su ubicación relativa al hábitat natural restante y el grado de conexión dentro del hábitat (Palomeque, 2009).

Los cacaotales son adecuados para reforestar áreas completamente taladas y pueden convertirse en corredores biológicos entre segmentos de selva, permitiendo la repoblación de aves, mamíferos, reptiles y anfibios, entre otros (Ogata, 2007). El cacao es un cultivo que está ligado culturalmente al desarrollo del trópico cálido húmedo de México. El área cultivada a nivel nacional es de aproximadamente 61 562 hectáreas, de estas, 41 000 hectáreas se cultivan en Tabasco y 20 544 hectáreas en Chiapas (SIAP- SAGARPA, 2016). En ambos estados representa una fuente importante de ingresos con el 99.9 % de la producción nacional de tal forma que en Tabasco 36 555 productores dependen económicamente de este cultivo y 11 069 en Chiapas (Avendaño et al., 2011). Sin embargo, actualmente el cacao deja de ser atractivo para los productores porque se enfrenta a problemas fitosanitarios como *Phytophthora* spp., agente causal de la mazorca negra y la pudrición del fruto o mazorca causado por el hongo *Moniliophthora roreri* y que es considerada como una de las enfermedades más destructiva en América Latina (SIAP-SAGARPA, 2016).

Plagas y Enfermedades en el sistema agroforestal-cacaotal

En el sistema agroforestal cacaotal uno de los factores principal son las enfermedades causadas por plagas, bacterias y hongos que afectan al cultivo y su frecuencia son: *Moniliophthora roreri* (100%), *Phytophthora capsici* (67%), *Fusarium* sp. (10.1%), *Colletotrichum gloeosporioides* (3.7%), *Ceratocystis cacaofunesta* (0.9%), *Atta* sp. (33.9%), *Toxoptera aurantii* (11%), arañas (7.3%), *Xyleborus ferrugineus*, *Xylosandrus morigerus*, *Hypothenemus birmanus*, *Corthylus minutissimus*, *Taurodermus sharpi*, *Hypothenemus interstitialis* (5.5%), *Vanduzeeae segmentata* (5.5%), pájaro carpintero (4.6%), *Selenothrips rubrocinctus* (3.7%), *Clastoptera laenata* (3.7%) y tuzas (3.7%). *Moniliophthora* es el principal factor que afecta la supervivencia del cacao y su biodiversidad (Gómez et al., 2015). Entre los Oomycetes dentro de esta clasificación taxonómica se destacan *Moniliophthora perniciosa* Stahelc conocida con el nombre común la escoba de bruja, la moniliasis provocada por *Moniliophthora roreri* y la pudrición negra por *Phytophthora* spp., estas enfermedades causan la pudrición de mazorcas principalmente.

En el sistema agroforestal-cacaotal identificaron diversos hongos, donde tuvo una mayor frecuencia fueron *Lasiodiplodia theobromae* Griffiths & Maubl. (90%), *Phytophthora palmivora* (85%) y *Colletotrichum gloeosporioides* (70%). No se hallaron aislamientos típicos de *P. tropicalis*. Las enfermedades de mayor incidencia fueron las pudriciones de la mazorca por *P. palmivora* (65%), por *L. theobromae* (55%) y antracnosis por *C. gloeosporioides* (55%). Se detectaron, además, mancha foliar por *Cercospora* sp. (20%) y por *Phomopsis* sp. (10%), chancros del tallo por *P. palmivora* (15%), muerte regresiva por *L. theobromae* (10%) y agallas causadas por *Fusarium decemcellulare* (10%). Este último hongo se asoció por las agallas tipo abanico similar a pequeñas escobas de bruja y se descartó la presencia de *Moniliophthora perniciosa* en Cuba asociada a esta sintomatología (Martínez y Pérez, 2015).

Por otra parte, la pudrición negra y la moniliasis de la mazorca constituyen unas de las enfermedades que con mayor frecuencia se detectan en plantaciones de cacao del país y con mayor impacto en la producción de cacao (*Theobroma cacao*), con pérdidas hasta del 60% de la cosecha (Martínez y Pérez, 2015; Gómez et al., 2015). Son consideradas como unas de las amenazas más grave al suministro mundial de chocolate. Una alternativa al control de estas enfermedades es la utilización del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. (Cordero, 2010; Peabody, 2005). A lo largo de las últimas décadas la infección de cacao cultivado con *Moniliophthora roreri*, conocida comúnmente como moniliasis, ha dificultado la producción del cacao en

América Latina de manera significativa (Seng et al., 2014).

Control de plagas o enfermedades

La agricultura comercial al combate de plagas y enfermedades sigue siendo una cuestión importante; esta actividad representa hasta 20 % o más del costo de producción, dependiendo de la severidad ocasionada. Los plaguicidas y agentes químicos antimicrobianos adquirieron un papel preponderante en la protección de cultivos contra plagas y enfermedades. Sin embargo, la aplicación intensiva y desmedida de los productos químicos ha tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas. Asimismo, estos productos se pueden acumular en los alimentos, suelos y aguas, si no se respetan las dosis, intervalos de seguridad y los productos aprobados para un cultivo (Gutiérrez-Ramírez et al., 2013).

El manejo integrado de plagas es un conjunto de técnicas de control que son eficaces desde el punto de vista biológico, ecológico y económico; posibilita y resalta el empleo de elementos naturales para regular poblaciones de plagas o patógenos por debajo del nivel de daño que sería económicamente aceptable. Una de las herramientas del manejo integrado de plagas es el control biológico, que ha adquirido relevancia por la preocupación de la preservación del ambiente y la inocuidad alimentaria (Gutiérrez-Ramírez et al., 2013).

El concepto de control biológico involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos patógenos. Van Driesche et al., (2007) y Gutiérrez-Ramírez et al., (2013) definen el control biológico como el uso de enemigos naturales, para disminuir la población de uno o más organismos plagas a densidades menores sea de forma temporal o permanente. El término control biológico, enfatizando en el uso de enemigos naturales para el control de insectos, bacterias y hongos (Rodríguez y Arredondo, 2007). El éxito de esta alternativa de manejo de plagas depende de los enemigos naturales usados, pues constituyen el recurso fundamental sustentable. De lo anterior se origina la importancia de conocer la taxonomía, biología, ecología y el comportamiento del agente de control de interés (Nicholls, 2008; Gutiérrez-Ramírez et al., 2013).

El manejo biológico surge como una alternativa promisorio para el control del fitopatógeno, con resultados exitosos contra un amplio rango de ellos (Fravel, 2005). Estudios realizados durante los últimos años han demostrado el gran potencial de hongos (Krauss y Soberanis, 2003; Suárez y Cabrales, 2008) y bacterias endófitas para el control de la moniliasis. Entre los principales antagonistas se encontraron hongos de los géneros *Trichoderma*, *Lecanicillium*,

Gliocladium y *Paecilomyces*, bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y actinomicetos (Suárez y Rangel, 2013). Dentro de los principales mecanismos de acción que poseen estos agentes de biocontrol están el micoparasitismo, la competencia por nutrientes, la antibiosis, la tolerancia a factores ambientales adversos, la resistencia a plagas y enfermedades, y la promoción de crecimiento vegetal.

Control biológico de *Moniliophthora Roreri*

Moniliophthora roreri fue observada por primera vez en Ecuador en 1916 extendiéndose por todo el país (López, 1987). Posteriormente se diseminó por todo Sudamérica siguiendo la ruta por Centroamérica hasta llegar a México. En marzo de 2005 fue detectada por primera vez en el municipio de Pichucalco, Chiapas, México y posteriormente se encontró en Huimanguillo, Tabasco el mismo año (Phillips-Mora et al., 2009). En México, a causa de este hongo llamado *Moniliophthora roreri* se han registrado pérdidas en las cosechas, e incrementado los altos costos económicos, sociales y ambientales, similar a lo observado en otros países de América Central. Su severa agresividad afecta negativamente la rentabilidad del cultivo al depender en gran parte del manejo de fungicidas químicos, material vegetativo genéticamente resistente, manejo agronómico y cultural, causando pérdidas que oscilan entre el 20 % y 100 % de la producción (SIAP-SAGARPA, 2016). En los estados productores de cacao el poco o nulo manejo de las plantaciones, la edad avanzada de los productores y de las plantaciones, está provocando su abandono y derribo, y como consecuencia la pérdida de la diversidad genética (Avendaño et al., 2011).

Para el control de esta enfermedad se han hecho numerosos estudios en diferentes lugares en México y Latinoamérica, principalmente con microorganismos, especialmente hongos del género *Trichoderma* que ha sido utilizado por su capacidad de parasitar muchos fitopatógenos, el cual actúa mediante la producción de antibióticos, por medio de los cuales inhibe el desarrollo de otros hongos que compiten por espacio o nutrientes como ocurre en flores y frutos con *Botrytis* y *M. roreri* (Villegas, 2005). En el sistema cacaotal se identificaron a nivel molecular y morfológico nueve especies de *Trichoderma*: *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*/H. *lixii*, *T. koningiopsis*/H. *koningiopsis*, *T. longibrachiatum*/H. *sagamiensis*, *T. pleuroticola*, *T. reesei*/H. *jecorina*, *T. spirale* y *T. virens*/H. *virens* aislados en sistemas agroforestales cacaotales en Tabasco (Torres et al., 2015). Villamil et al. (2012), reporta que cepas de *Trichoderma* presentaron 70% a 100% de antagonismo como agentes para el biocontrol de *Moniliophthora roreri* aislados de frutos de cacao y de la rizósfera. En pruebas *in vitro* *T. virens* y *T. harzianum* nativas aisladas del agrosistemas-cacaotal mostraron ser

promisorios agentes antagonísticos contra *M. roreri*, la especie *T. harzianum* produce y secreta ácido noanoico (pelargónico) en un medio de cultivo líquido. El ácido nonanoico fue muy inhibitorio para la germinación de esporas y el crecimiento micelial de patógenos del cacao, principalmente *Crinipellis perniciosa* y *Moniliophthora roreri* (Aneja et al., 2015; Krauss y Soberanis, 2001). Hoyos-Carvajal et al., (2009) reportaron el aumento en la producción de biomasa vegetal, la resistencia bajo condiciones de estrés, productividad e incremento en la absorción de nutrientes en el cultivo de cacao, y especies forestales. Por sus características como promotor del crecimiento en las plantas se utiliza frecuentemente *T. harzianum* como un organismo biofertilizante con diferentes productos comerciales y formulaciones (Moreno-Sarmiento et al., 2007; Youssef et al., 2016).

Mecanismos antagonísticos

Los mecanismos antagonísticos que utiliza *Trichoderma* spp., se describen como competencia, antibiosis y micoparasitismo, sin ser estos mutuamente excluyentes y pudiendo por lo tanto actuar a la vez (Dubos, 1987). La competencia es por nutrientes, por oxígeno y por espacio, es entendida como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que se halla en cantidades insuficientes de un elemento, si hay exceso no hay competencia y por último la desactivación de las enzimas de los patógenos (Benítez et al., 2004; Saravanakumar et al., 2016). Sea mediante contacto directo o sin establecer contacto físico alguno, *Trichoderma* spp., puede inhibir el crecimiento de otros hongos y bacterias mediante la producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, viridina y gliovirina, a lo que se llama antibiosis (Howell, 1993; Zeilinger et al., 2016). El micoparasitismo puede ser definido como el uso del patógeno como alimento por su antagonista, en el que generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos (Benítez et al., 2004; Zeilinger et al., 2016; Saravanakumar et al., 2016; Mallikharjuna et al., 2016). Las cepas de *Trichoderma* más comercializadas para el control biológico, para sistemas agroforestales-cacaotal, sustentables y para otros cultivos de importancia económica, que son *Trichoderma viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, la cual es la más utilizada y reportada en las investigaciones (Harman, 2000, Ávila et al., 2006, Rojo et al., 2007; Mbarga et al., 2014; Buysens et al., 2016). *Trichoderma* fue aplicado y analizado en plantaciones de cacao, donde el mecanismos de micoparasitismo parcialmente se vio superada por

otros organismos patógenos en su habita y pero aun así presento inhibición 50 a 80 % (Krauss *et al.*, 2013).

La inducción de resistencia sistémica por *Trichoderma* en el hospedero es uno de los mecanismos indirectos de mayor interés en la actualidad (Mukherjee *et al.*, 2013) e involucra cambios celulares en el hospedero, tales como un aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y aumento en la actividad peroxidasa y quitinasa (Harman, 2006; Saravanakumar *et al.*, 2016). Otros procesos relacionados con la inducción sistémica contra patógenos del suelo, tal como *F. Oxysporum* f. spp. *Lycopersici* son el confinamiento, la inhibición del patógeno y los cambios histológicos en el hospedero. Estos últimos relacionados con la producción de reguladores de crecimiento y estimulación de la división, diferenciación y crecimiento celular en la planta por el agente elicitor (Hermosa *et al.*, 2013).

La rápida colonización de la rizosfera y de las capas superficiales de las raíces permiten el control biológico y la supresión de los hongos fitopatógenos del suelo, siendo una de las principales características de *T. harzianum*, que por consecuencia de este biocontrol se estimula el crecimiento de las plantas (Harman *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2016). Además del efecto biocontrolador, varios mecanismos se han propuesto para explicar el efecto promotor del crecimiento, entre ellos, Sutton, (1993), señala que *T. harzianum* produce metabolitos que estimulan el crecimiento y desarrollo vegetal (Tabla 2); Windham, (1986) y Zeilinger *et al.*, (2016), determino la producción de fitohormonas de crecimiento por parte del hongo como el ácido 3-indol acético (AIA) y sus análogos, viéndose favorecido el desarrollo radical.

Tabla 2. Los metabolitos secundarios derivados de *Trichoderma* con funciones en procesos de autoregulación, micoparasitismo, competencia en interacción con la planta (Zeilinger *et al.*, 2016).

Autoreguladores	Micoparasitismo/ competencia/ antimicrobianos	Estimulación de la defensa de las plantas
• 1-octen-3-ol • 3-octanone • emodin • pachybasin	• 6-PP • viridin • trichothecenes (trichodermin, harzianum A) • gliotoxin • peptaibols • harzianic acid	• harzianolide • 6-PP • peptaibols • trichokonins • harzianic acid

CONCLUSIÓN

Actualmente el género *Trichoderma* es uno de los agentes de mayor uso en programas de control biológico como antagonico y regulador de fitopatógenos en su caso en los sistemas agroforestales-cacaotal. Uno de los mecanismos antagonicos que utiliza *Trichoderma* spp., él que se reportan en las investigaciones es el micoparasitismo, en este mecanismo generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos en su caso la enfermedad *Moniliophthora roreri*. Las especies *T. virens* y *T. harzianum* se han reportado su uso en el cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizados para el biocontrol de *M. roreri* con resultados óptimos con efecto antagonico para esta enfermedad. Aparte se ha comprobado que *T. harzianum* estimula y mejora el crecimiento de las plantas, lo que puede significar un

posible aumento en los rendimientos y calidad de la mazorca de cacao.

Agradecimiento

Al Programa de Fomento a la Investigación (PFI) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por labeca otorgada para la realización del presente trabajo por medio del proyecto de investigación "Diversidad y caracterización de hongos endófitos en los sistemas agroforestales cacaotales" con clave UJAT-2012-IB-22.

REFERENCIAS

Aneja, M., Thomas, J.G., Prakash, K.H. 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology,

- 67(6); 304-307.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.05.002>
- Avendaño, A.C.H., Villarreal, F.J.M., Campos, R.E., Gallardo, M.R.A., Mendoza, L.A., Aguirre, M.J.F., Sandoval, E.A., Espinosa, Z.S. 2011. Diagnóstico del cacao en México. 1ra edición. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México, México, 80 p.
- Avila Miranda, M., Herrera Estrella, A., Peña Cabriales, 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 Biology and Biochemistry*, 38(7): 1823-1830.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.036>
- Beer, J. 1999. *Theobroma cacao*: un cultivo agroforestal. *Agroforestería en las Américas*, 6(22), 4.
- Benítez, T.; A.M. Rincón; M.C. Limón y A.C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7(4): 249-260.
<http://www.im.microbios.org/0704/0704249.p df>
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal Botany*, 69(11): 2357-2372.
<http://dx.doi.org/10.1139/b91-297>
- Buysens, C., César, V., Ferrais, F., Dupré de Boulois, H., Declerck, S. 2016. Inoculation of *Medicago sativa* cover crop with *Rhizophagus irregularis* and *Trichoderma harzianum* increases the yield of subsequently-grown potato under low nutrient conditions. *Applied Soil Ecology*, 105: 137-143.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.011>
- Cordero, M.R. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp., en plantaciones de *Theobroma cacao* l. del estado carabobo, venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (stahel) singer/diversity of *Trichoderma* spp. on *Theobroma cacao* l. fields in Carabobo state, venezuela, and its biocontrol capacity on *Crinipellis perniciosa* (stahel) singer. *Interciencia*, 35(10): 777-783.
http://www.interciencia.org/v35_10/777.pdf
- Cuervo, J., A., Sánchez, V., Romero, T., Ramirez, M. 2014. *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research*. 8(16), 1704-1712.
<http://dx.doi.org/10.5897/ajmr2013.6279>
- Dubos, B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: *Innovative approaches to plant disease control*, ed. by I. Chet, pp.107-135. John Wiley and Sons, New York, Ecological and Applied Microbiology.
<http://prodinra.inra.fr/record/106693>
- Fernández-Larrea V.O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas*. 62:96-100.
- Fravel, D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43:1-23. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924
- Gajera, H., Hirpara, D., Katakpara, Z., Patel, S., Golakiya, B. 2016. Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Infection, Genetics and Evolution*. 45:383-392.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.02 6>
- Gallegos Morales, G., Cepeda Siller, M., & Olayo Paredes, R. 2003. *Entomopatogenos*. Mexico City. Trillas. México.
- Gómez, E.H., Morales, J.H., Avendaño Arrazate, C.H., Guillen, G.L., Garrido Ramírez, E.R., Nápoles, J.R., Díaz, C.N. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(2):232-246.
<http://rmf.smf.org.mx/Vol3322015/Integrado/Volumen3322015.pdf>
- Guédez, Clemencia, Cañizalez, Luis, Castillo, Carmen, Olivar, Rafael. 2012. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 32(1):44-49.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci _arttext&pid=S1315-25562012000100009&lng=es&tlng=es
- Guiracocha, G., Harvey, C., Somarriba, E., Krauss, U. Carrillo, E. 2001. Conservación de la biodiversidad en sistemas agroforestales con cacao y banano en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*. 8(30): 7-11.
- Gutiérrez-Ramírez, A., Robles-Bermúdez, A., Santillán-Ortega, C., Ortiz-Catón, M., Cambero-Campos, O.J. 2013. Control

- biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*. 2(3): 102-112.
<http://biociencias.uaan.edu.mx/publicaciones/04-03/biociencias4-3-3.pdf>
- Harman, G. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions. Derived from Research on *Trichoderma harzinum* T-22. *Plant Disease*. 84(4):377-393.
<http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2000.84.4.377>
- Harman, G. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96(2):190-194.
<http://dx.doi.org/10.1094/phyto-96-0190>
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2(1):43-56.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hermosa R., B. Rubio, M., R. E. Cardoza, C. Nicolas, E. Monte, S. Gutierrez. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*. 16:69-80.
<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/72575/72340>
- Howell, C. 2006. Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *Phytopathology*. 96(2):178-180.
<http://dx.doi.org/10.1094/phyto-96-0178>
- Howell, C., Stipanovic, R., Lumsden, R. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology*. 3(4):435-441.
<http://dx.doi.org/10.1080/09583159309355298>
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Bissett, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*. 51(3):409-416.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018>
- Infante, D., Martinez, B., Gonzalez, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*. 24:14-21.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
- Krauss, U., Soberanis, W. 2001. Biocontrol of Cocoa Pod Diseases with Mycoparasite Mixtures. *Biological Control*. 22(2):149-158.
<http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.0956>
- Krauss, U., Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., Arroyo, C., Corrales, E., Casanoves, F. 2013. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control*. 67(3):317-327.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.011>
- Krauss, U., Soberanis, W. 2003. Control Biológico de Monilia (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par) para la rehabilitación de cacaotales en América Latina. *Biological Control*. 22(2):149-158.
- Landero Valenzuela, N., Nieto Angel, D., Téliz Ortiz, D., Alatorre Rosas, R., Fredy Ortiz García, C., Orozco Santos, M. 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*. 91:88-93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>
- Lima, F., Félix, C., Osório, N., Alves, A., Vitorino, R., Domingues, P. 2016. Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*. 99:38-46.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.009>
- Liu, S., Liao, C., Lo, C., Yang, H., Lin, K., Peng, K. 2016. Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 96:1-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.06.003>
- López, M.R. 1987. El cacao en Tabasco. Primera edición. Serie Agronomía n°13. Universidad Autónoma Chapingo. 287 p.
- Mallikharjuna Rao, K., Siva Raju, K., Ravisankar, H. 2016. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(1):25-32.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.007>
- Martínez de la Parte, E., Pérez Vicente, L. 2015. Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. (Spanish). *Revista de Protección Vegetal*. 30(2):87-96.
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp., y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. 28(1):1-11. Recuperado en 10 de noviembre de 2016, de

- http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tlng=es.
- Mbarga, J., Begoude, B., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., Schiffers, B. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*. 77:15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.06.004>
- Mendieta, L.M., Rocha, M.L.R. 2007. Sistemas agroforestales. Universidad agraria. Managua, Nicaragua. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/training_material/docs/1_RENF08M538.pdf. Consulta: noviembre 2016
- Moreno-Sarmiento, N., Moreno-Rodríguez, L., Uribe-Vélez, D. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. 38-45.
- Mukherjee, P., Horwitz, B., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 51(1):105-129. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Nicholls, E.C.I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 2-124. ISBN 978-958-714-186-3
- Ogata, N. 2007. El Cacao. *Biodiversitas*. 72: 1-5. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv72art1.pdf>.
- Palomeque, F.E. 2009. Sistemas agroforestales. Huehuetán, Chiapas, México. <https://www.socla.co/wp-content/uploads/2014/sistemas-agroforestales.pdf?iv=58>. consulta: noviembre 2016.
- Peabody, E. 2005. Los dos patógenos más devastadores del cacao son parientes cercanos. <https://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2005/051012.es.htm?pf=1>. US consultado: 03 de febrero 2017
- Phillips-Mora, W., Cerda, R. 2009. Catálogo: enfermedades del cacao en Centroamérica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba, Costa, Rica. ISBN: 978-9977-57-501-8
- Rivas, C.M., Pavone, M.D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. En plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. *Interciencia*, 35(10): 777-783. http://www.interciencia.org/v35_10/777.pdf
- Rodríguez D.B.L.A., Arredondo B.H.C. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. 2-67.
- Rojo, F., Reynoso, M., Ferez, M., Chulze, S., Torres, A. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, 26(4):549-555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.006>
- Romero, A.O., Huerta, L.M., Damian, H.M.A., Dominguez, H.F., Arellano, V.D.A. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2):143-151. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11759/12297>
- Salgado-Mora, M.G., Macías-Sámamo, J.E., López-Báez, O., Ibarra Núñez, G. 2007. Diversidad arbórea en cacaotales del Soconusco, Chiapas, México. *Interciencia*. 32(11):763-768. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33901107>
- Samuels, G.J., Lieckfeldt, E., Nirenberg, H.I. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1):71-88. http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_51_0071-0088.pdf
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., Chen, J. 2016. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. *Biological Control*. 94:37-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>
- Seng, J., Herrera, G., Vaughan, C. S., McCoy, M. B. 2014. Use of *Trichoderma* fungi in spray solutions to reduce *Moniliophthora roreri* infection of *Theobroma cacao* fruits in Northeastern Costa Rica. *Revista De Biología Tropical*. 62(3):899-907.
- SIAP-SAGARPA, 2016. Sistema producto cacao. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>. Consulta: noviembre 2016
- Singh, V., Upadhyay, R., Sarma, B., Singh, H. 2016. *Trichoderma asperellum* spore dose depended

- modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research*. 193:74-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.002>
- Suárez, L., Cabrales, C. 2008. Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp., y *Bacillus* sp., y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roleri* en el departamento de Norte de Santander. *Revista de la Universidad Francisco de Paula Santander*. 13:45-56.
- Suárez C.L.Y., Rangel, R.A.L. 2013. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roleri*. *Acta Agronómica*. 62(1):370-383.
- Sutton, J. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry Leaves. *Phytopathology*. 83(6):615. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-83-615>
- Toghueo, R., Eke, P., Zabalgoeazcoa, Í., de Aldana, B., Nana, L., Boyom, F. 2016. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*. 96:8-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.008>
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J., Ávalos- Contreras, N., Cappello-García, S., De la Cruz- Pérez, A. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86(4):947-961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Van Driesche, R.G., Hoddle, M.S., Center, T.D., Ruíz, C.E., Coronada, B.J., Manuel, A.J. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Washington. U. S. D. A. 3-46. https://www.fs.fed.us/foresthealth/technology/pdfs/VANDRIESCHE_CONTROL_Y_PLAGAS_WEB.pdf
- Villamil, C.J.E., Blanco, V.J.E., Viteri, R.S.E. 2012. Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roleri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad de Agronomía Medellín*, 65(1): 6305-6315. http://www.redalyc.org/pdf/1799/1799243400_02.pdf
- Villegas, M. 2005. Características generales de *Trichoderma* y su potencial biológico en la agricultura sostenible, http://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible. Consulta: Noviembre 2016.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(1):1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Windham, M. 1986. A Mechanism for Increased Plant Growth Induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 76(5): 518. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-76-518>
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., Li, G. 2016. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*. 101:31-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>
- Youssef, S., Tartoura, K., Abdelraouf, G. 2016. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*. 100:79-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.001>
- Zavaleta, M. E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana*. 17(3):201-207. <http://www.redalyc.org/pdf/573/57317304.pdf>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2):74-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

Identificación morfológica y molecular de *Trichoderma* spp, de la rizosfera en sistemas agroforestales-cacaotales

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.revista.ccba.uady.mx Internet	1649 palabras — 10%
2	docplayer.es Internet	339 palabras — 2%
3	pdfs.semanticscholar.org Internet	164 palabras — 1%
4	www.elsevier.es Internet	102 palabras — 1%
5	tesis.ipn.mx Internet	88 palabras — 1%
6	repositorio.espe.edu.ec Internet	78 palabras — < 1%
7	www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx Internet	76 palabras — < 1%
8	cict.umcc.cu Internet	59 palabras — < 1%
9	www.scielo.org.mx Internet	58 palabras — < 1%
10	redi.unjbg.edu.pe Internet	57 palabras — < 1%
11	repositorio.uaaan.mx:8080	

54 palabras — < 1%

12 dspace.ups.edu.ec
Internet

30 palabras — < 1%

13 www.scielo.org.co
Internet

26 palabras — < 1%

14 repositorio.ug.edu.ec
Internet

24 palabras — < 1%

15 osjournal.org
Internet

23 palabras — < 1%

16 transparencia.tabasco.gob.mx
Internet

21 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 20 PALABRAS