

Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo

Vivian Francisca Quiroz-Sarmiento, Ronald Ferrera-Cerrato, Alejandro Alarcón, María Encarnación Lara Hernández

Área de Microbiología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo, Edo. de México. CP 56230, Montecillo, Estado de México

In vitro antagonism of *Aspergillus* and *Trichoderma* strains against garlic-pathogenic filamentous fungi

Abstract. This research focused on studying the antagonistic capability of 22 strains of filamentous fungi to *Penicillium* sp. and *Fusarium* spp. garlic pathogens, via *in vitro* confrontation. Either pathogen or antagonist strains were isolated from the rhizosphere or vegetative organs of garlic mature plants collected from Celaya, Guanajuato. Eight out of 22 fungal strains inhibited the growth of the pathogens; six of them belonged to *Aspergillus* species: *A. nidulans*, *A. ochraceus* (2 strains), *A. wentii* (2 strains), and *A. niger*, and the remaining two strains belonged to the genus *Trichoderma* spp. Mycoparasitism, antibiosis, and competition were the main mechanisms by which the fungal strains inhibit the growth of *Penicillium* and *Fusarium*. There were variations among antagonists to attack the pathogens and their fungal structures. In general, antagonists caused grouping, deformation, and lysis on conidia, as well deformation, lysis, and winding on mycelia of the pathogens.
Key words: *Penicillium*, *Fusarium*, biocontrol, microcultures, mycoparasitism, competition, antibiosis.

Resumen. El presente trabajo evaluó la capacidad antagónica de 22 cepas de hongos filamentosos hacia *Penicillium* sp. y *Fusarium* spp. que afectan al cultivo del ajo, mediante enfrentamientos *in vitro*. Tanto las cepas patógenas como las antagonistas fueron aisladas de la rizósfera y/o material vegetativo de plantas maduras de ajo recolectadas de Celaya, Guanajuato. De las 22 cepas probadas, ocho contribuyeron en la inhibición del crecimiento de los patógenos, seis de las cuales correspondieron a *Aspergillus nidulans*, *A. ochraceus* (2 cepas), *A. wentii* (2 cepas) y *A. niger*, y las dos cepas restantes correspondieron al género *Trichoderma* sp. Los principales mecanismos de acción identificados en la inhibición del crecimiento de las colonias de los hongos patógenos fueron el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia. Los daños causados a las estructuras de los patógenos por los hongos antagónicos variaron según la cepa del antagonista. En general, los antagonistas causaron agrupamiento, deformación y lisis de conidios, así como deformación, lisis y enrollamiento de micelio de los patógenos.
Palabras claves: *Penicillium*, *Fusarium*, biocontrol, microcultivo, micoparasitismo, competencia, antibiosis.

Received 17 January 2008; accepted 20 June 2008.
Recibido 17 de enero 2008; aceptado 20 de junio 2008.

Autor para correspondencia: Ronald Ferrera-Cerrato
ronaldfc@colpos.mx

Introducción

Dentro de los múltiples factores que afectan la producción de cultivos hortícolas se encuentra la proliferación de hongos filamentosos causantes de enfermedades para las plantas (Sánchez, 1998). Como ejemplo, *Sclerotium cepivorum* Berk. es el principal agente patógeno que causa la pudrición blanca en ajo; sin embargo, otros hongos filamentosos que inciden y afectan a este cultivo son *Fusarium oxysporum* (Schl.) enmend. Snyder & Hansen, agente causal de la pudrición basal que ataca al ajo desde su estado de plántula, y *Penicillium hirsutum* Diercks el cual produce un micelio verde-azul en los bulbos y ocasiona la pérdida de vigor de las plantas en las primeras etapas de crecimiento y reduce significativamente la calidad de la semilla de ajo (Heredia y Delgadillo, 2000).

El control biológico, representa una estrategia innovadora para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola (Heredia y Delgadillo, 2000), que se basa en la capacidad de un organismo para inhibir el crecimiento o destruir a un fitopatógeno (Whipps y Lumsden, 2001). En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos, pero el más estudiado es *Trichoderma*, debido a su fácil y rápido crecimiento además de sus características de micoparasitar a otros hongos (Howell y Stipanovic, 1995). Sin embargo, existen otras especies fúngicas que potencialmente pueden inhibir o limitar el crecimiento de los patógenos (Paul, 1999a; 1999b), como es el caso de algunas especies de *Aspergillus* (Alfonso *et al.*, 1992; Lourenço *et al.*, 2006; Suárez-Estrella *et al.*, 2007).

El presente trabajo evaluó el grado de antagonismo de diferentes cepas de hongos del género *Aspergillus* y *Trichoderma* sobre dos cepas de *Fusarium* spp. y una de *Penicillium* sp. en condiciones *in vitro*, aislados de la zona productora de ajo en Guanajuato, así como identificar el daño

que causan los antagonistas en las estructuras de los patógenos.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio. Se utilizaron 22 cepas de hongos filamentosos (cuatro del género *Trichoderma* y 18 del género *Aspergillus*) para probar su efecto antagónico hacia dos cepas de *Fusarium* spp. (SP-P4 y CH-A3), *Penicillium* sp. (CH-A3). Estas cepas de *Fusarium* y *Penicillium* fueron aisladas a partir de plantas de ajo con sintomatología de enfermedad en condiciones de campo (datos no presentados). Todas las cepas de *Aspergillus* y de *Trichoderma* fueron aisladas de rizósfera, rizoplaneo y material vegetativo (raíz y/o bulbo) de plantas de ajo establecidas en plantaciones con fines de exportación de la región de El Bajío, Guanajuato.

Pruebas de Antagonismo *in vitro*

Cada uno de los hongos antagonistas fue colocado por duplicado en un extremo de la caja de Petri, con un disco de 5 mm de PDA con crecimiento fúngico activo. Después de un periodo de incubación a temperatura ambiente (22°C) y con base en la velocidad de crecimiento de los hongos, en el extremo opuesto de la caja de Petri, se colocó otro disco de agar de 5 mm con el hongo patógeno a confrontar. La inoculación de las cepas de los patógenos, previo a la confrontación con las cepas de *Aspergillus* o de *Trichoderma*, fue de dos días para *Penicillium*, y de tres días para *Fusarium*.

El crecimiento de los organismos en cada uno de los enfrentamientos fúngicos, fue evaluado cada 24 h. Se consideraron cinco repeticiones para cada enfrentamiento y para el tratamiento testigo. La evaluación final fue considerada a los 10 días, cuando el patógeno cubrió totalmente la caja de Petri en el tratamiento testigo (sin hongo

antagonista). Para medir el efecto inhibitorio, de los hongos antagónicos hacia los patógenos, se midió el crecimiento de estos últimos. El porcentaje de inhibición se estimó con base en la diferencia obtenida entre el crecimiento obtenido de patógeno confrontado con la cepa antagónica y el crecimiento de la cepa del respectivo patógeno sin antagonista.

A partir de este análisis de inhibición, se seleccionaron únicamente ocho cepas para proceder a la evaluación de la interacción microscópica entre las hifas de los antagonistas con aquellas de los patógenos por separado, como se describe a continuación.

Técnica de Ridell

Para conocer los efectos directos que causaban las ocho cepas de hongos con mayor potencial antagónico, seis del género de *Aspergillus* (SN-7, SN-9, SN-10, SP-11, SP-21, SP-22, RP-12b y ST-2) y dos del género de *Trichoderma* (RP-12b y ST-2), hacia los hongos patógenos, se empleó la técnica de microcultivos de Ridell descrita por Paul (1999a). Esta técnica consiste en colocar dentro de una caja de Petri una varilla de vidrio en forma de “V” y sobre ella, un portaobjetos estéril sobre el cual se dispuso un disco de PDA de 10 mm de diámetro por 20 mm de espesor.

Para el establecimiento de los hongos involucrados (antagónicos y patógenos) se tomó en cuenta su velocidad de crecimiento. Las cepas de *Aspergillus* antagónicas con crecimiento lento se colocaron un día antes que las cepas de *Fusarium*, mientras que para el caso de *Penicillium*, éstas fueron colocadas un día después. Lo anterior debido a que el crecimiento de las antagonistas fue más lento que *Fusarium*, pero más rápido que *Penicillium*.

Por su parte, las dos cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. seleccionadas presentaron un crecimiento más rápido que los patógenos por lo que se colocaron dos y cinco días después que las cepas de *Fusarium* y la cepa de *Penicillium*, respectivamente. La disposición de cada hongo

se realizó en dos puntos cardinales (norte patógeno y sur antagonista). Después de colocar el micelio del hongo con menor velocidad de crecimiento en un extremo del disco de PDA con ayuda de una asa bacteriológica, se colocó un cubreobjeto estéril. Con la finalidad de mantener la humedad en la caja de Petri se adicionaron 10 mL de glicerol al 10%. Cuando se observó crecimiento del hongo con menor velocidad de crecimiento, se procedió a inocular el micelio del hongo de mayor velocidad de crecimiento en el extremo opuesto.

Cuando el disco de agar fue cubierto con el crecimiento de ambos organismos (siete días aproximadamente), el glicerol fue sustituido por formaldehído al 10% durante dos horas para fijar las estructuras fúngicas. Posteriormente, el portaobjetos fue retirado de la caja de Petri, para preparar los frotis. El cubreobjetos fue colocado en otro portaobjetos limpio y provisto de una gota de azul de algodón en lactofenol. El siguiente paso consistió en retirar el disco de agar del portaobjetos original y después de colocar una gota del colorante y un nuevo cubreobjetos. Una vez eliminado el exceso de colorante, las preparaciones fueron selladas y evaluadas microscópicamente. Se utilizó un microscopio modelo III Carl Zeiss con cámara digital integrada.

La evaluación microscópica consistió en identificar agrupamientos y deformaciones de conidios, así como la deformación, el enrollamiento, el estrangulamiento o la fragmentación del micelio de los patógenos, causados por las cepas antagónicas.

Resultados

De las 22 cepas probadas para su antagonismo hacia los patógenos, solo ocho presentaron algún mecanismo de antagonismo hacia la cepa de *Penicillium* y hacia las dos cepas de *Fusarium* (Tabla 1). Seis de estas ocho cepas

Tabla 1. Principales mecanismos de biocontrol de las cepas antagonicas

Cepas antagonicas	Especie	Efectos sobre <i>Penicillium</i> y <i>Fusarium</i>
SN-7	<i>Aspergillus nidulans</i>	Competencia y antibiosis
SN-9	<i>A. ocraceus</i>	Competencia
SN-10	<i>A. ocraceus</i>	Competencia
SN-11	<i>A. wentii</i>	Competencia
SP-21	<i>A. niger</i>	Competencia
SP-22	<i>A. wentii</i>	Competencia
ST-2	<i>Trichoderma</i> sp.	Micoparasitismo
RP-12B	<i>Trichoderma</i> sp.	Micoparasitismo

correspondieron a las especies de *Aspergillus nidulans* (SN-7), *A. ocraceus* (SN-9 y SN-10), *A. wentii* (SN-11 y SP-22) y *A. niger* (SP-21), mientras que las dos restantes pertenecieron a *Trichoderma* spp. (ST-2 y RP-12b), las cuales están en proceso de identificación.

La inhibición del crecimiento de los tres patógenos probados fue dependiente de su combinación con la cepa antagonista (Figura 1). En el caso de *Aspergillus*, las cepas SN9, SN-10 y SP-22, inhibieron a los tres patógenos probados en un rango de 40 al 83%, mientras que la cepa SP-11 inhibió en un 24% el crecimiento de las dos cepas de *Fusarium* y en un 56% a la cepa de *Penicillium* (Figura 1). La cepa de *Aspergillus* SN-7 únicamente produjo inhibición del 38% a la cepa de *Fusarium* sp.1 y a la cepa de *Penicillium*; en contraste,

la cepa SP-21 sólo causó inhibición del 50% a la cepa de *Penicillium* (Figura 1). El mayor efecto inhibitorio del crecimiento de los tres patógenos fue obtenido cuando se confrontaron las dos cepas de *Trichoderma*, cuya inhibición osciló del 70 al 100%. La cepa de *Trichoderma* RP-12b causó el 100% de inhibición del crecimiento de los tres patógenos (Figura 1).

Las especies de *Aspergillus* mostraron mecanismos de competencia y antibiosis, hacia los patógenos, en tanto que las cepas de *Trichoderma* ST-2 y RP-12b mostraron la tendencia hacia el micoparasitismo (Tabla 1), el cual es una de las principales características de este género fúngico para inhibir o restringir el crecimiento de los patógenos. En el caso de las cepas de *Aspergillus*, los mecanismos que se

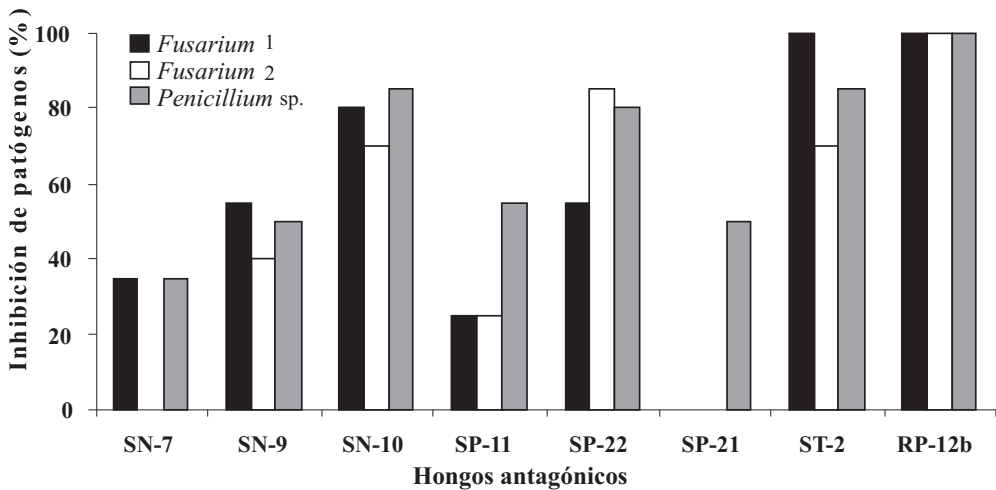


Figura 1. Porcentaje de inhibición de hongos patógenos de ajo, cuando son enfrentados con las cepas antagonicas. n=5.

Tabla 2. Eventos microscópicos observados en las diferentes cepas de hongos antagonicos sobre las estructuras de *Fusarium* y *Penicillium*

Eventos observados	Hongos antagonicos probados							
	SN7	SN9	SN10	SP11	SP21	SP22	ST2	RP12b
Agrupamiento de conidios	1-2-3	1-2	2-3	1-2	1-2-3	1-2-3	1-3	1-3
Deformación de conidios	1-2	1-2-3	1-2	1-3	1-3	1-2-3	1-2-3	1
Deformación de micelio						1-2		
Enrollamiento de micelio	1-3	2		2		3	3	
Enrollamiento de conidios		3						3
Alargamiento de micelio	3					3	3	3
Estrangulamiento de micelio	1				2	3		
Ruptura de micelio		1-3	2					
Deformación de fialides	2	1	1-3	2		2	3	3
Fragmentación de micelio	2-3		1-2-3	1	2	2	1-2-3	1-2-3
Formación de clamidosporas	1	1	1	1	1	1-2		
Lisis de conidios	1-2-3	2-3	2-3	1-2-3	1-3	1-2	1-2-3	1-2-3
Lisis de micelio	2-3	3	2-3	1-2-3	2-3	1-2-3	1-2	1-2-3

Los números indican las cepas patógenas: 1=*Fusarium* sp.1; 2=*Fusarium* sp. 2; 3=*Penicillium* sp.

presentaron fueron la competencia por espacio y la producción de sustancias antibióticas denotadas por el cambio en la coloración del medio de cultivo (datos no presentados).

Las interacciones entre antagonista y patógeno observadas microscópicamente en las estructuras de los hongos patógenos, dependieron según la cepa antagonica (Tabla 2). Los daños más drásticos se presentaron principalmente en conidios (Figura 2) y micelio (Figura 3) de las dos cepas de *Fusarium*, en los que se presentaron procesos de deformación, enrollamiento, estrangulamiento, ruptura, fragmentación y lisis. Además, se observó la deformación de

las fialides de *Penicillium* por efecto de las cepas de *Trichoderma* (Figura 4).

Las cepas antagonicas del género de *Trichoderma*, presentaron una tendencia por agrupar a los conidios de *Fusarium*, causándoles deformación, septos muy marcados y posteriormente la lisis (Figura 2). La cepa de *Aspergillus* SN-9 causó la lisis y deformación del micelio patogénico, presentando en ciertas partes enrollamiento y engrosamiento de micelio e incluso estrangulamiento del mismo (Figura 3).

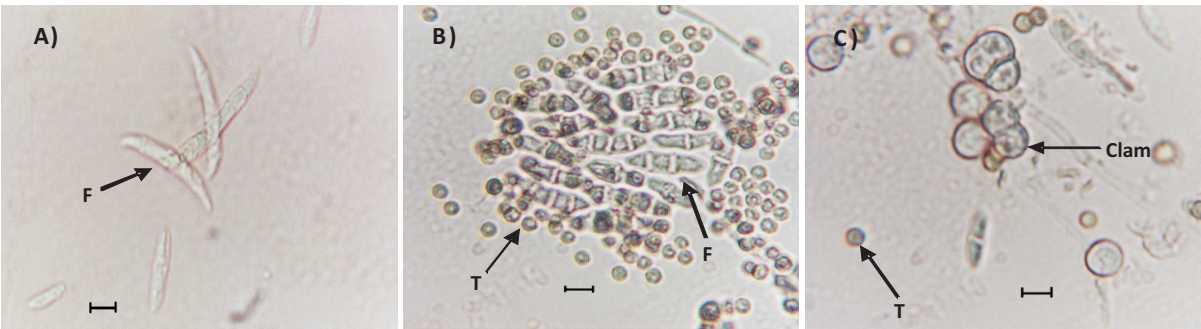


Figura 2. Daños causados a las estructuras de *Fusarium* cepa 1. A) Macroconidios (F) en ausencia de los antagonistas. B) *Trichoderma* (T) rodeando macroconidios de *Fusarium* (F), y causando deformaciones como septos muy marcados y mayor grosor. C) Formación de clamidosporas (Clam) por los patógenos como forma de defensa ante el ataque del antagonista. Barra =5µm.

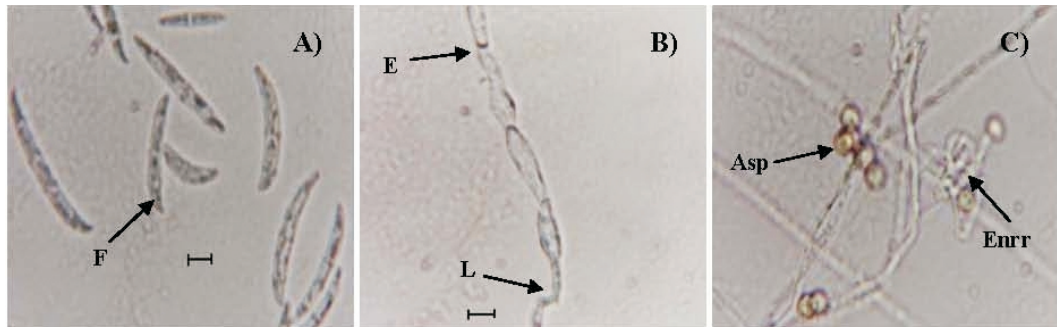


Figura 3. Daños causados a las estructuras de *Fusarium* cepa 2 (F). **A)** Macroconidios (F) en ausencia de los antagonistas. **B)** Estrangulamiento (E) y posterior lisis (L) del micelio del patógeno causado por un antagonista. **C)** Proliferación de esporas de *Aspergillus* (Asp) sobre el micelio del patógeno provocando su enrollamiento (Enrr) y posteriormente lisarlo. Barra = 5µm.

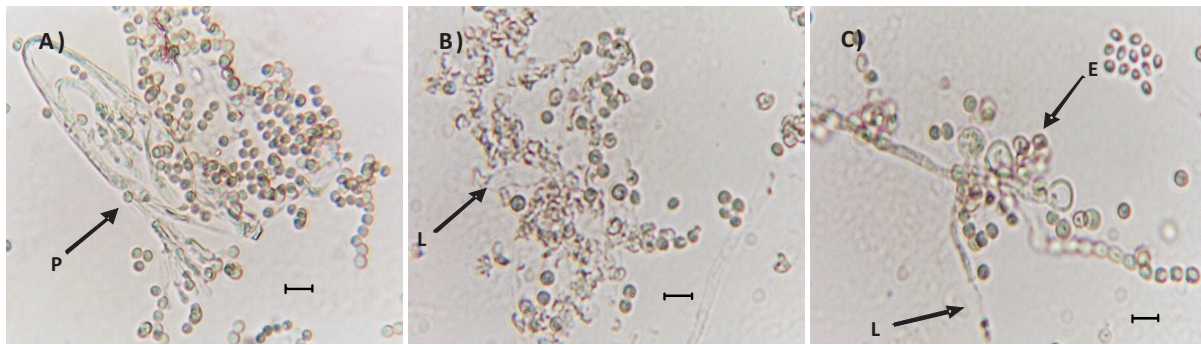


Figura 4. Daños causados a las estructuras de *Penicillium*. **A)** Macroconidios (P) en ausencia de los antagonistas. **B)** Lisis (L) y destrucción total de esporas y micelio por el antagonista. **C)** Las fialides también se deformaron en varios segmentos, el micelio se adelgazo y se enrolló al ser atacado por las cepas antagonistas. Barra = 5µm.

Discusión

La capacidad antagonica de algunas cepas de hongos hacia hongos fitopatógenos se puede definir con base en la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos (Cook, 2000). Esta capacidad es el resultado de la agresividad del antagonista y de la susceptibilidad del patógeno (Paul, 1999a; Sempere y Santamarina, 2008). Lo anterior se hace evidente por la variación observada con respecto a la selectividad de algunas cepas de *Aspergillus* para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos, en comparación con las cepas de *Trichoderma* cuyo rango de hospedantes es al parecer, menos específico (Figura 1).

Las contribuciones que se han hecho en el último siglo sobre control biológico en plantas han sido de gran importancia ya que han abierto el camino a varias investigaciones como el uso de cepas microbianas para

controlar los daños causados por fitopatógenos (Cook, 2000; Whipps, 2001).

Como mecanismos implicados en el antagonismo microbiano están la antibiosis, la competencia, la resistencia sistémica, el parasitismo o el hiperparasitismo y la secreción de enzimas, todos ellos influenciados por factores bióticos y abióticos (Howell y Stipanovic, 1995; Benhamou y Brodeur, 2000; Benítez *et al.*, 2004). De manera particular, los hongos pueden poseer mecanismos relacionados con la competencia, antibiosis y de manera particular el micoparasitismo y el hiperparasitismo (Poinar y Buckley, 2007). Lo cual fue denotado con la diversidad de interacciones hifales entre los antagonistas y los patógenos (Tabla 2).

La capacidad antagonica obtenida por las cepas de *Trichoderma*, constata los múltiples reportes en la literatura relacionados con su efectividad para inhibir y micoparasitar diferentes hongos filamentosos patógenos de plantas, a través

de su actividad fisiológica y bioquímica (Baker, 1987; Chet e Ibar, 1994; Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb, 1996; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2006). En nuestro estudio, las dos cepas de *Trichoderma* ensayadas presentaron mayor efecto antagonico hacia los tres patógenos probados en comparación con las cepas de *Aspergillus* (Figura 1). Las cepas de *Trichoderma*, tuvieron la habilidad de contribuir en la deformación los conidios de *Fusarium* (Figura 2), así como provocar la lisis y destrucción de conidióforos y esporas de *Penicillium* (Figura 4). Estos efectos sobre las estructuras de los patógenos, pueden estar relacionados con la producción de enzimas tales como quitinasa, β -glucanasa, celulasa y proteasa por parte de las cepas de *Trichoderma*, y que son un componente importante en el proceso del micoparasitismo (De la Cruz *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1994; Harman, 2006).

Estos cambios morfológicos en las estructuras de los hongos patógenos causados por la acción del antagonista han sido observados en otros estudios que han considerado diferentes especies de hongos tanto antagonistas como patógenos. Por ejemplo, Benhamou *et al.* (1999) reportaron algunos eventos del micoparasitismo entre *Phythium oligandrum* y varios oomycetos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora megasperma*, *Pythium ultimum*). Los daños ocasionados en las diferentes estructuras fúngicas de los patógenos se relacionaron con la presencia de enrollamientos de hifas, aumento de tamaño de las células producto de la desorganización del citoplasma, retracción y ruptura de la membrana plasmática, alteración y distorsión de la pared celular en los sitios de penetración de hifas del antagonista, desencadenando con todo ello, la colonización masiva en el hospedante y su posterior lisis celular.

Por otra parte, existe especial interés por aislar especies de hongos filamentosos alternativos a *Trichoderma*, por lo que se ha reportado la capacidad antagonica de especies saprotróficas no patogénicas de los géneros *Fusarium*,

Rhizoctonia, *Phialophora* y *Pythium*, hacia patógenos de hábito radical (Whipps y Lumsden, 2001; Paul, 1999a, 1999b). En el caso particular de las especies del género de *Aspergillus*, los trabajos relacionados con su capacidad antagonica hacia otras especies fúngicas son escasos (Alfonso *et al.*, 1992; Lourenço *et al.*, 2006; Suárez-Estrella *et al.*, 2007) y se les ha dado mayor enfoque de investigación a los aspectos dañinos que tiene este género fúngico al producir aflatoxinas que causan problemas de intoxicación a los humanos al ingerir alimentos con presencia de hongos de este género.

Pocas investigaciones han considerado a las especies del género *Aspergillus* como antagonista hacia *Penicillium*. No obstante, se tienen algunos reportes que describen el efecto antagonico de algunas especies de *Aspergillus* hacia patógenos como *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2, y *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, los cuales son causantes de enfermedades en cultivos como tomate y melón (Alfonso *et al.*, 1992; Lourenço *et al.*, 2006; Suárez-Estrella *et al.*, 2007).

El presente trabajo es uno de los primeros reportes en México relacionados con la capacidad de especies de *Aspergillus* para inhibir el crecimiento de hongos patógenos que afectan al cultivo y calidad de la semilla del ajo. Recientemente se han hecho investigaciones utilizando cepas de *Aspergillus* no-productoras de aflatoxina (NPA) en maíz y cacahuete en África (Bandyopadhyay y Cardwell, 2003), en las que se mencionan que la cepa NPA mostró mayor competencia que *Aspergillus flavus* (productora de la toxina), reduciendo así los niveles de aflatoxinas en el maíz. Por otra parte, *A. giganteus* produce una proteína antifúngica que ha sido probada exitosamente para inhibir el crecimiento del micelio y la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* (Moreno *et al.*, 2003). Lo anterior, resalta la importancia del género *Aspergillus* en procesos biotecnológicos aplicados a la agricultura.

Cabe mencionar que, si bien el uso de *Trichoderma*

como agente de biocontrol se encuentra ampliamente, el uso de *Aspergillus* con la misma finalidad y sobre todo en ajo, es prácticamente nulo. Lo anterior resalta la importancia de probar y utilizar hongos antagonistas autóctonos y alternos a *Trichoderma*, para controlar hongos causantes de enfermedades específicas de los cultivos, en sitios específicos. Lo anterior requiere de la integración del control biológico, con tratamientos químicos y culturales para tener mayor efectividad en el manejo de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

Los resultados de este trabajo indican que algunas cepas de *Aspergillus* tienen efectos antagónicos selectivos a hongos fitopatógenos; sin embargo, esto no implica su recomendación para su uso extensivo en campo. Para lo anterior, se sugiere realizar pruebas de patogenicidad de las cepas de *Aspergillus*, y evaluar su parte toxicológica, con el fin de determinar su posible producción de aflatoxinas y los parámetros relacionados con su concentración letal, parte de la planta en donde se almacenan, tiempo de vida media, etc.

Agradecimientos

Trabajo parcialmente financiado por el proyecto SEP-CONACyT 58594.

Literatura citada

Alfonso C., F. del Amo, O.M. Nuero, F. Reyes, 1992. Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 for its biocontrol by nonpathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters 99 : 169-174.

Baker, R., 1987. Mycoparasitism: Ecology and physiology. Canadian Journal of Plant Pathology 9 : 370-379.

Bandyopadhyay, R., K.F. Cardwell, 2003. Species of *Trichoderma* and *Aspergillus* as biocontrol control agents against plant diseases in Africa. In: Neuenschwander, P., C. Borgemeister, J. Langewald, (eds.), Biological control in integrated pest management systems in Africa. CABI Publishing, Wallingford. pp. 193-206.

Benhamou, N., J. Brodeur, 2000. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*. The causal agent of green mold. Phytopathology 90 : 932-943.

Benhamou, N., P. Rey, K. Picard, Y. Tirilly, 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens.

Phytopathology 89 : 506-517.

Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7 : 249-260.

Chet, I., J. Ibar, 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology 48 : 37-43.

Cook, R.J., 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology 38:95-116.

De la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallega, J.M. Lara, T. Benítez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell, 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry 206 : 859-867.

Goldman, H.G., C. Hayes, G.E. Harman, 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends in Biotechnology 12 : 478-482.

Handelsman, J., V.E. Stabb, 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. The Plant Cell 8 : 1855-1869.

Harman, G.E., 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96 : 190-194.

Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2 : 43-56.

Heredia, G.E., S.F. Delgadillo, 2000. El ajo en México. Origen, mejoramiento genético tecnología de producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Instituto Nacional de Investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental Bajío. Celaya. 101 p.

Howell, C.R., R.D. Stipanovic, 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*: Antibiosis. Phytopathology 85 : 469-472.

Howell, C.R., B.D. Stipanovic, D.R. Lumsden, 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling disease. Biocontrol Science Technology 3 : 435-441.

Lourenço Jr., V., L.A. Maffia, R. da Silva-Romeiro, E.S.G. Mizubuti, 2006. Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. Biological Control 38 : 331-340.

Moreno, A.B., A. Martínez del Pozo, M. Borja, B. San Segundo, 2003. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. Phytopathology 93 : 1344-1353.

Paul, B., 1999a. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiousum*. FEMS Microbiology Letters 176 : 25-30.

Paul, B., 1999b. *Phytium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. FEMS Microbiology Letters 181 : 277-280.

Poinar Jr., G.O., R. Buckley, 2007. Evidence of mycoparasitism and hypermycoparasitism in Early Cretaceous amber. Mycological Research 111 : 503-506.

Sánchez, P.J.R., 1998. Variabilidad morfológica y patogénica de cuatro aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk. Tesis de Maestría. Instituto de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo. 72 p.

Sempere, F., M.P. Santamarina, 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berck & Broowe) Petch. by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalium* Curve & Thom. International Journal of Food Microbiology 122 : 35-43.

Suárez-Estrella, F., C. Vargas-García, M.J. López, C. Capel, J. Moreno, 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Crop Protection 26 : 26-53.

Vinale, F., R. Marra, F. Scala, E.L. Ghisalberti, M. Lorito, K. Sivasithamparam, 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology 43 : 143-148.

Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52 : 487-511.

Whipps, J.M., D.R. Lumsden, 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. In: Butt, T.M., C.W. Jackson, N. Magan (eds.), Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potentials. CABI Publishing. Wallingford. pp 9-22.