

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN ANTAGÓNICA *in vitro* DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS DE RAÍZ EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. MONTCALM

Trichoderma spp. NATIVE STRAINS MOLECULAR IDENTIFICATION AND *in vitro* ANTAGONISTIC EVALUATION OF ROOT PHITOPATHOGENIC FUNGUS OF THE COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. MONTCALM

Bertha M. Sánchez-García¹, Elsa Espinosa-Huerta², Emiliano Villordo-Pineda³,
Raúl Rodríguez-Guerra⁴, María A. Mora-Avilés^{3*}

¹Instituto Tecnológico de Roque. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas. 38110. Celaya, Guanajuato, México. ²Instituto de Fitosanidad, Campus Montecillo, Km. 36.5 Carretera México- Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ³Universidad Politécnica de Guanajuato, Laboratorio de Fitopatología. Avenida Universidad Sur 1001. 38483. Localidad Juan Alonso, Cortazar, Guanajuato. (mora_alejandra@yahoo.com). ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Región Noreste, Campo Experimental General Terán. Km 31 Carretera Montemorelos-China. 67400. General Terán, Nuevo León, México.

RESUMEN

Trichoderma spp. es un hongo de la división Ascomycota con gran potencial para controlar enfermedades en los cultivos con importancia económica. Este hongo antagonista inhibe el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, entre los que destacan los causantes de enfermedades radiculares, como *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. El objetivo de este estudio fue identificar especies de *Trichoderma* y caracterizar su actividad antagónica *in vitro* en cepas patógenas de *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. solani* con virulencia diferente, determinada a partir de pruebas de patogenicidad en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. La hipótesis fue que la identificación y caracterización antagónica de especies de *Trichoderma* contra hongos patógenos define su eficiencia en el control biológico. El diseño experimental fue completamente al azar, con al menos tres repeticiones. La identificación molecular de *Trichoderma* spp. se realizó a través de regiones ITS1 e ITS2 separadas por el gen 5.8S del rRNA ribosomal (ITS, Internal Transcribed Spacer). El antagonismo se evaluó con la prueba de papel celofán modificada y cultivos duales para estimar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). Siete cepas de *Trichoderma* identificadas por técnicas moleculares mostraron 95 a 100 % de identidad a *T. harzianum* y *T. asperellum*. Las cepas de *Trichoderma* expresaron capacidad antagónica alta con valores medios de PICR de 73.1 a 76.4 en las cepas patógenas, lo que sugiere efecto de antibiosis (77.6 PICR) y diferentes tipos de interacción hifal. Las cepas antagonistas

ABSTRACT

Trichoderma spp. is a fungus of the Ascomycota division with great potential to control diseases in economically important crops. This antagonistic fungus inhibits the growth of phytopathogenic microorganisms, including those responsible for root diseases, such as *Rhizoctonia* spp. and *Fusarium* spp. The objective of this study was to identify *Trichoderma* species and to describe their *in vitro* antagonistic activity in pathogenic strains of *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* and *F. solani*, with different virulence determined based on pathogenicity tests in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. The hypothesis was that the identification and antagonistic description of *Trichoderma* species against pathogenic fungi defines their biological control efficiency. The experimental design was completely random, with at least three repetitions. The molecular identification of *Trichoderma* spp. was done through ITS1 and ITS2 regions, separated by the 5.8S ribosomal RNA gene (ITS, Internal Transcribed Spacer). The antagonism was evaluated using the modified cellophane method and dual cultures to estimate the percentage of radial growth inhibition (PRGI). Seven *Trichoderma* strains identified using molecular techniques showed 95-100 % identity to *T. harzianum* and *T. asperellum*. *Trichoderma* strains showed high antagonistic capacity with 73.1 to 76.4 mean PRGI values in pathogenic strains, suggesting an antibiosis effect (77.6 PRGI) and different hyphal interaction types. Antagonistic strains were statistically similar for pathogen growth and development inhibition; however, *T. asperellum*'s antagonistic values were higher than *T. harzianum*'s with regard to all pathogenic strains,

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2016. Aprobado: diciembre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 51: 63-79. 2017.

fueron estadísticamente similares en la inhibición del crecimiento y desarrollo de los patógenos, pero *T. asperellum* obtuvo valores de antagonismo superiores a *T. harzianum* con todas las cepas patógenas, incluso *R. solani* que fue el patógeno más agresivo para el cv. Montcalm (valor medio 7.0). El efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* en los hongos fitopatógenos pudo determinarse con pruebas *in vitro* y corroborado en bioensayos *in vivo*, con porcentajes de inhibición similares.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, antagonismo, micoparasitismo.

INTRODUCCIÓN

Los métodos para el control de enfermedades incluyen el uso de genotipos resistentes, prácticas culturales, compuestos volátiles, extractos de plantas, control químico y control biológico (Nashwa *et al.*, 2008). El control químico es uno de los más utilizados y, en la mayoría de los casos, causa contaminación ambiental, su costo es elevado y su control no es selectivo; esto afecta la sobrevivencia de microorganismos antagonistas. El control biológico es una alternativa complementaria eficiente y económica para el control de enfermedades foliares y las ocasionadas por patógenos en el suelo (Infante *et al.*, 2009). El género *Trichoderma* incluye varias especies que sirven como agentes de control biológico con efecto estimulante en los cultivos e inductor de resistencia sistémica a diferentes patógenos en plantas (Harman, 2004). La identificación de esta especie y su caracterización es crucial para aplicarlo adecuadamente en el control biológico específico de patógenos en los cultivos agrícolas. Los métodos de identificación morfológica de especies de *Trichoderma* se han reforzados con técnicas moleculares, como la identificación de las regiones ITS1 e ITS2 separadas por el gen 5.8S del rRNA ribosomal (ITS, Internal Transcribed Spacer). El resultado es la reclasificación de cepas de este hongo (White *et al.*, 1990; Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2006). Cepas de *T. harzianum* se reubicaron en especies como *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. longibrachiatum* (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Kullnig *et al.*, 2001) y *T. atroviride* o *T. viride* se reubican como *T. asperellum* (Watanabe *et al.*, 2005).

Trichoderma es un hongo antagonista, con mecanismos de acción en los patógenos que le permite

even *R. solani*, which was the most aggressive pathogen for cv. Montcalm (mean value: 7.0). The antagonistic effect of *Trichoderma* strains on phytopathogenic fungi was determined with *in vitro* tests and corroborated with *in vivo* bioassays with similar inhibition percentages.

Key words: *Trichoderma* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, antagonism, mycoparasitism.

INTRODUCTION

Methods for disease control include the use of resistant genotypes, cultural practices, volatile compounds, and plant extracts, as well as chemical and biological control (Nashwa *et al.*, 2008). Chemical control is one of the most used methods and, in most cases, pollutes the environment, it is expensive, and its control is not selective; this affects the survival of antagonistic microorganisms. Biological control is an efficient and economical complementary alternative for the control of foliar diseases and those caused by soil pathogens (Infante *et al.*, 2009). The *Trichoderma* genus includes several species that serve as biological control agents, which stimulates crops and induces systemic resistance to different pathogens in plants (Harman, 2004). The identification and description of this species are crucial for its proper application in the biological control of specific pathogens in agricultural crops. The morphological identification methods of *Trichoderma* species have been reinforced with molecular techniques, such as the identification of the ITS1 and ITS2 regions separated by the 5.8S ribosomal RNA gene (ITS, Internal Transcribed Spacer), resulting in the strain reclassification of this fungus (White *et al.*, 1990; Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2006). *T. harzianum* strains were relocated in species such as *T. asperellum*, *T. atroviride*, and *T. longibrachiatum* (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Kullnig *et al.*, 2001), while *T. atroviride* or *T. viride* were relocated as *T. asperellum* (Watanabe *et al.*, 2005).

Trichoderma is as an antagonistic fungus, with growth and disease control mechanisms that affect pathogens: direct competition for space and nutrients; production of metabolites and antibiotics; and direct parasitism in fungi (mycoparasitism) (Ezziyany *et al.*, 2004a). These fungal species are used all over the world to control fungal diseases such as *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T.*

controlar su crecimiento, y por tanto la enfermedad, por competencia directa por espacio y nutrientes, producción de metabolitos, antibióticos y parasitismo directo en los hongos (micoparasitismo) (Ezziyyani *et al.*, 2004a). Las especies de este hongo se utilizan en el mundo para el control de enfermedades fungosas, como *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. gamsii* y *T. polysporum* (Samuels *et al.*, 2010; Schuster y Schmoll, 2010), porque se aíslan fácil y su crecimiento es rápido en sustratos diferentes (Howell, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004a; González *et al.*, 2012). Sin embargo, los hongos antagonistas, como *Trichoderma* spp., en el control de hongos patógenos que ocasionan pudriciones de raíz es limitado, porque las interacciones del antagonista con el patógeno no se han caracterizado. Los hongos fitopatógenos que causan pudriciones de raíz en los cultivos con importancia económica, forman parte de un consorcio integrado por *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. y *Pythium* sp. (Bolkan, 1980). Las especies de *Fusarium* spp. se adaptan y desarrollan varias condiciones, por lo que su eliminación o control puede ser un gran reto (Mitra y Lele, 1981).

La hipótesis fue que la identificación y caracterización antagónica de *Trichoderma* spp. en hongos patógenos, causantes de pudriciones de raíz, define su eficiencia en el control biológico. Los objetivos del estudio fueron: 1) identificar la especie de las cepas de *Trichoderma* a través de la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen 5.8S del ARN ribosomal (ITS, Internal Transcribed Spacer); 2) la secuenciación de los amplicones y caracterizarlas por su actividad antagónica en cepas patógenas del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), como *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. solani* con diferente agresividad; y 3) proporcionar información para determinar si las cepas antagonistas de *Trichoderma* controlan eficientemente a los hongos patógenos de la raíz en este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aislados fúngicos de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Trichoderma* spp.

El muestreo de suelo se realizó en una parcela cultivada con maíz y frijol en el ciclo primavera-verano 2013, en el

atroviride, *T. gamsii*, and *T. polysporum* (Samuels *et al.*, 2010; Schuster and Schmoll, 2010), because they are easily isolated and they grow quickly in different substrates (Howell, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004a; González *et al.*, 2012). However, antagonistic fungi (such as *Trichoderma* spp.) have a limited control over pathogenic fungi that cause root rot, because the antagonist-pathogen interactions have not been described. Phytopathogenic fungi that cause root rot in economically important crops are part of a consortium made up of the *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. and *Pythium* sp. genera (Bolkan, 1980). *Fusarium* spp. species adapt and develop in a wide variety of conditions; therefore, their elimination or control can be a great challenge (Mitra and Lele, 1981).

Our hypothesis was that the identification and antagonistic description of *Trichoderma* spp. in pathogenic fungi, which cause root rot, defines its biological control efficiency. This study had three objectives: 1) to identify the species of the *Trichoderma* strains through the amplification of the ITS1 and ITS2 regions, separated by 5.8S ribosomal RNA gene (ITS, Internal Transcribed Spacer); 2) to identify the amplicon sequencing and to describe the strains based on their antagonistic activity in pathogenic strains of bean crops (*Phaseolus vulgaris* L.), such as *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, and *F. solani* with different aggressiveness; and, 3) to provide information to determine if the *Trichoderma* antagonistic strains efficiently control the pathogenic fungi of this crop's root.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining fungal isolates from *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, and *Trichoderma* spp.

Soil sampling was carried out in a field cultivated with corn and bean in the spring-summer 2013 cycle, at the Bajío Experimental Field (CEBAJ) of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Celaya, Guanajuato (20° 34' 33.44" N, 100° 4' 19.24" W, and 1775 masl).

Sampling (90 samples of approximately 250 g) was performed using the zigzag method, with soil sample taken at 5, 10, and 15 cm deep. The samples were diluted 1:1000 in double distilled water and 0.25 mL of that dilution were placed in sterile Petri dishes (Star®Dish) with a water-agar medium

Campo Experimental Bajío (CEBAJ) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Celaya, Guanajuato (20° 34' 33.44" N, 100° 4' 19.24" O y 1775 msnm).

El muestreo, de 90 muestras de aproximadamente 250 g, se realizó con el método zig-zag, con tomas de muestra de suelo a 5, 10 y 15 cm de profundidad. Las muestras se diluyeron 1/1000 en agua doble destilada estéril y 0.25 mL de la dilución se agregó a cajas Petri estériles (Star® Dish) con medio agar-agua (2 %, Bioxon®) (AA). Las cajas se mantuvieron en condiciones naturales de luz y oscuridad, a 23-25 °C y se analizaron 48 y 72 h después con un microscopio compuesto, con objetivos de aumento de 40X a 400X (Leica CME®), para observar germinación de esporas o formación de colonias de hongos. De los hongos desarrollados se extrajo un fragmento de la colonia o punta de hifa, se transfirió a cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA, Bioxon®) para purificarlos, identificarlos y conservarlos.

Purificación, identificación y conservación de cepas

Los aislados se purificaron por cultivo monoconidial, por suspensión conidial en medio AA. Después de 24 h se observó la germinación de conidios, y con observación al microscopio compuesto se extrajo un conidio germinado; este se cultivó en medio PDA. Los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Trichoderma* se identificaron morfológicamente con las claves dicotómicas morfológicas de Barnett y Hunter (1988). Las especies de las cepas del género *Fusarium*, se identificaron con las claves de Nelson *et al.* (1983). Solo las siete cepas de *Trichoderma* se identificaron con técnicas moleculares con la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen 5.8S del ARN ribosomal (ITS, Internal Transcribed Spacer) (White *et al.*, 1990; Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2006). La amplificación por PCR se realizó con los iniciadores ITS4 e ITS5 (Bellemain *et al.*, 2010). Los fragmentos amplificados se secuenciaron por el Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario del Colegio de Posgraduados (Campus Montecillos, Texcoco, Estado de México).

Las cepas de *Fusarium* spp., *R. solani* y *Trichoderma* spp. se conservaron colocando discos de colonia en tubos Falcon® de 15 mL, con aceite mineral al 100 %, a 4 °C. Las siete cepas de *Trichoderma* y una de *R. solani* se mantuvieron en estado activo en cajas Petri con PDA y las cinco cepas de *Fusarium* en medio de cultivo synthetic low-nutrient agar (SNA) (Spezieller Nährstoffarmer Agar) (glucosa 0.2 g L⁻¹, sacarosa 0.2 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.0 g L⁻¹, KNO₃ 1.0 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g L⁻¹, KCl 0.5 g L⁻¹, 1 N NaOH 0.6 mL L⁻¹, agar 23.0 g L⁻¹, (Nirenberg, 1976).

(2%, Bioxon®) (WA). The dishes were kept under natural light and darkness conditions, at 23-25 °C. They were analyzed after 48 and 72 h with a compound microscope, with 40X-400X magnification lenses (Leica CME®), in order to observe spore germination or fungus colonies formation. A fragment of the colony or hyphal tip was extracted from the developed fungus, and transferred to Petri dishes with a potato-dextrose-agar medium (PDA, Bioxon®), in order to purify, identify, and preserve them.

Strain purification, identification, and conservation

The isolates were purified using a monoconidial culture and a conidial suspension in WA medium. After 24 h, we observed the germination of conidium. Using a compound microscope, a germinated conidium was extracted and cultured in a PDA medium. The morphology of the *Rhizoctonia*, *Fusarium*, and *Trichoderma* genera was identified with Barnett and Hunter's morphological dichotomous keys (1988). The species of the *Fusarium* genus strains were identified with the keys of Nelson *et al.* (1983). Only the seven *Trichoderma* strains were identified with molecular techniques, amplifying the ITS1 and ITS2 regions, separated by 5.8S ribosomal RNA gene (ITS, Internal Transcribed Spacer) (White *et al.*, 1990; Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2006). PCR amplification was performed with ITS4 and ITS5 primers (Bellemain *et al.*, 2010). The amplified fragments were sequenced at the Integral Phytosanitary Diagnostic Laboratory of the College of Postgraduates (Montecillos Campus, Texcoco, Estado de Mexico).

Strains of *Fusarium* spp., *R. solani*, and *Trichoderma* spp. were preserved placing colony discs, in 15 mL Falcon® tubes, with 100% mineral oil, at 4 °C. The seven *Trichoderma* strains and one *R. solani* strain were kept in an active state in Petri dishes with PDA and five *Fusarium* strains were kept in a synthetic low-nutrient agar culture medium (SNA: Spezieller Nährstoffarmer Agar) (0.2 g L⁻¹ glucose, 0.2 g L⁻¹ sucrose, 1.0 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1.0 g L⁻¹ KNO₃, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.5 g L⁻¹ KCl, 0.6 mL L⁻¹ 1 N NaOH, 23.0 g L⁻¹ agar) (Nirenberg, 1976).

Pathogenic and antagonistic strains

Five strains of the *Fusarium* genus (Fsol-1, Fvert-4, Fsol-9, Foxy-23, Foxy-43) and one of *R. solani* were analyzed. The selection of pathogenic strains was established by means of pathogenicity tests in cv. Montcalm bean plants, which are susceptible to root rot (Schneider and Kelly, 2000; Cichy *et al.*, 2007; Michcrop.com, 2016). In a greenhouse, cv. Montcalm seeds were germinated in trays with peat (Sunhine 3 Mix®). Fifteen days after they were sowed, the plants were removed

Cepas patogénicas y antagonistas

Cinco cepas del género *Fusarium* (Fsol-1, Fvert-4, Fsol-9, Foxy-23, Foxy-43) y una de *R. solani* se analizaron. La selección de las cepas patogénicas se estableció por pruebas de patogenicidad en plantas de frijol cv. Montcalm, que es susceptible a pudriciones de raíz (Schneider y Kelly, 2000; Cichy *et al.*, 2007; Michcrop.com, 2016). Semillas del cv. Montcalm se germinaron en charolas con turba (Sunhine 3 Mix[®]), en invernadero. Quince días después de la siembra las plantas se extrajeron de las charolas, el sustrato se eliminó con agua y se les seccionó un tercio de la raíz. Diez plantas por cada cepa de *Fusarium* spp. se sumergieron en inóculo con 25 conidios mL⁻¹ (Schneider y Kelly, 2000) por 4 min (Castellanos *et al.*, 2011). Las plantas se trasplantaron en macetas con capacidad de 1 L y el sustrato mencionado antes. Granos de trigo infestados con la cepa de *R. solani* se utilizaron como inóculo y se aplicaron cinco granos, cada grano como unidad formadora de colonia (UFC) por cada una de las 10 plantas de frijol a los 15 días de la germinación (Mora, 1996). Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero a 28-32 °C y luz natural, con riegos cada 3 días; las plantas control fueron del cv. Montcalm sin inocular. La evaluación de las plantas para ambos patógenos se realizó 28 días después de la inoculación, con la escala del CIAT (plantas con valores de 1 a 3 se consideraron resistentes; con 4 a 6 moderadamente susceptibles y con 7 a 9 susceptibles) (CIAT, 1987).

Las cepas de *Trichoderma* analizadas fueron siete (Tri-1, Tri-2, Tri-3, Tri-4, Tri-5, Tri-6 y Tri-7), seis de ellas (Tri-1, Tri-2, Tri-3, Tri-4, Tri-6 y Tri-7) se obtuvieron del suelo muestreado y Tri-5 la proporcionó CINVESTAV-Unidad Irapuato.

Antibiosis de *Trichoderma* spp.

La preselección de la capacidad inhibitoria de las cepas de *Trichoderma* hacia los hongos fitopatógenos se realizó con el método de papel celofán (Dennis y Webster, 1971) modificado, con un diseño al azar y tres repeticiones (cada una fue una caja Petri). La prueba determina la capacidad de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de micelio de las cepas de *Fusarium* spp. y *R. solani*. Círculos de papel filtro Whatman[®], del tamaño de una caja de Petri (90 mm de diámetro), esterilizados en autoclave (121 °C por 15 min), se colocaron sobre medio de cultivo PDA, en condiciones asépticas; un disco de 7 mm de diámetro de cada cepa de *Trichoderma* se colocó en la parte central de la caja. Las cajas se mantuvieron a 22-25 °C por 48 h. Luego, el disco de papel se retiró cuidadosamente. El centro de la misma caja se inoculó con otro disco con el hongo fitopatógeno, las cajas se mantuvieron a la misma temperatura y por el mismo periodo. Cada día se midió el crecimiento radial (mm), hasta

from the trays, the substrate was removed with water, and a third of the root was cut off. Ten plants of each *Fusarium* spp. strain were immersed in an inoculum with 25 mL⁻¹ conidia (Schneider and Kelly, 2000) during 4 minutes (Castellanos *et al.*, 2011). The plants were transplanted into 1 L pots with peat. Wheat grains infested with the *R. solani* strain were used as inoculum. Fifteen days after germination, five grains were applied as colony-forming units (CFU), for each of the 10 bean plants (Mora, 1996). The inoculated plants were kept in a greenhouse, at 28-32 °C, with natural light and they were watered every 3 days. The control plants were non-inoculated cv. Montcalm. Plant evaluation for both pathogens was performed 28 days after inoculation, using the CIAT scale (plants with values from 1 to 3 were considered resistant, 4 to 6 moderately susceptible, and 7 to 9 susceptible) (CIAT, 1987).

Seven *Trichoderma* strains were tested (Tri-1, Tri-2, Tri-3, Tri-4, Tri-5, Tri-6, and Tri-7). Six of them were obtained from the sampled soil (Tri-1, Tri-2, Tri-3, Tri-4, Tri-6, and Tri-7), and one (Tri-5) was provided by CINVESTAV (Irapuato Unit).

Antibiosis of *Trichoderma* spp.

The preselection of *Trichoderma* strains' capacity to inhibit phytopathogenic fungi was carried out using the modified cellophane method (Dennis and Webster, 1971), with a random design and three repetitions (each one in a separate Petri dish). The test determines *Trichoderma's* ability to inhibit the mycelium growth of the *Fusarium* spp. and *R. solani* strains. Petri dish-size (90 mm diameter), autoclave-sterilized (121 °C for 15 min) circles of Whatman[®] filter paper, were placed in PDA culture media under aseptic conditions. A 7-mm diameter disc of each *Trichoderma* strain was placed in the centre of the dish. The dishes were kept at 22-25 °C for 48 h. Afterwards, the paper circle was carefully removed. The center of the same Petri dish was inoculated with another disc with a phytopathogenic fungus, the dishes were kept at the same temperature and for the same period. Radial growth (mm) was measured everyday, until the control (pathogen inoculated in Petri dishes, without Whatman[®] filter paper) filled the dish. The percentage of radial growth inhibition (PRGI) of *Fusarium* and *R. solani* was calculated using the following formula: $PRGI = [(D1 - D2) / D1] \times 100$ (Worasatit *et al.*, 1994). In this formula, D1 is the pathogen colony diameter in PDA without *Trichoderma* and D2 is the pathogen colony diameter in the dish where *Trichoderma* had previously grown on Whatman[®] filter paper. The isolates with 55 % + percentages were selected for the *in vitro* comparison test (Michel-Aceves *et al.*, 2005), in order to define their antagonistic potential.

que el testigo (patógeno inoculado en cajas Petri, sin papel Whatman®) llenó la caja. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *Fusarium* y *R. solani* se calculó según la fórmula: $PICR = [(D1 - D2) / D1] \times 100$ (Worasatit *et al.*, 1994); donde D1: diámetro de la colonia del patógeno en PDA sin *Trichoderma* y D2: diámetro de la colonia del patógeno en la caja donde antes creció *Trichoderma* sobre papel Whatman®. Los aislados con porcentajes mayores a 55 % se seleccionaron para la prueba de confrontaciones *in vitro* (Michel-Aceves *et al.*, 2005) y definir su potencial antagonístico.

El micoparasitismo que ejercen las cepas de *Trichoderma* se determinó con la superficie que colonizó en la caja Petri, en presencia del fitopatógeno, según la escala de Bell *et al.* (1982), donde: 1) *Trichoderma* coloniza el 100 % de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno; 2) *Trichoderma* coloniza dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno; 3) *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie, ningún hongo domina; 4) el fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de *Trichoderma*; y 5) el fitopatógeno coloniza el 100 % de la superficie del medio y crece sobre *Trichoderma*.

Potencial antagonístico de los aislamientos preseleccionados de *Trichoderma*

Las confrontaciones de las siete cepas de *Trichoderma* con las seis cepas de los patógenos se hicieron por triplicado, con la técnica de cultivos apareados en cajas Petri con PDA. Un disco colonia de 7 mm de diámetro de cada cepa de *Trichoderma* y otro disco colonia de los hongos fitopatógenos se colocaron equidistantes a ± 6.0 cm entre microorganismo.

El crecimiento radial de ambas colonias se cuantificó cada 24 h para determinar el número de días necesarios para que se realizara el primer contacto entre las hifas del antagonista y el patógeno. El nivel de antagonismo se clasificó con la escala de Bell *et al.* (1982).

Análisis estadístico

Los datos de cada bioensayo se analizaron con ANDEVA y prueba de comparación de medias de Duncan ($p \leq 0.05$); los tratamientos no relacionados se compararon para establecer un orden de méritos, con el paquete estadístico SAS, versión 9.1 (SAS Institute Inc., 2009).

Análisis filogenético

Las secuencias de los ITS se analizaron con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Morgulis *et al.*, 2008) en el

The *Trichoderma* strain mycoparasitism was determined by the colonized Petri dish surface (in dishes with prior phytopathogen presence), according to the Bell *et al.* scale (1982), where: 1) *Trichoderma* colonizes 100% of the medium surface and grows over the phytopathogen; 2) *Trichoderma* colonizes two thirds of the culture medium surface and restricts the phytopathogen growth; 3) *Trichoderma* and phytopathogen colonize half of the surface each (neither fungi dominates); 4) phytopathogen colonizes two-thirds of the medium surface and restricts the growth of *Trichoderma*; and 5) phytopathogen colonizes 100 % of the medium surface and grows over *Trichoderma*.

Antagonistic potential of pre-selected *Trichoderma* isolates

Comparisons between the seven *Trichoderma* strains and the six pathogen strains were performed in triplicate, pairing cultures in Petri dishes with PDA. A 7-mm diameter colony disc of each *Trichoderma* strain and another phytopathogenic fungus colony disc were placed equidistant from each other's microorganisms (at ± 6.0 cm).

The radial growth of both colonies was measured every 24 h, in order to determine the number of days required for the first contact between the antagonist's and the pathogen's hyphae. The antagonism level was classified using the Bell *et al.* scale (1982).

Statistical analysis

The data from each bioassay were analyzed with ANOVA and Duncan's new multiple range test (MRT) that compares differences between means ($p \leq 0.05$). Unrelated treatments were compared in order to establish a merit order, using the SAS statistical software, version 9.1 (SAS Institute Inc., 2009).

Phylogenetic analysis

ITS sequences were analyzed using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Morgulis *et al.*, 2008) at the NCBI (National Center for Biotechnology Information). The *Trichoderma* phylogenetic trees were developed using the Neighbor-Joining statistical method and the Kimura-2-parameter model; bootstrap values were calculated from 1000 replications (Chaverri *et al.*, 2003). Multiple sequence alignment was performed with Clustal W of the MEGA 7.0 software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2016).

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los árboles filogenéticos de *Trichoderma* se realizaron por el método estadístico Neighbor-Joining, con el modelo de Kimura-2-parameter; los valores bootstrap se calcularon a partir de 1000 repeticiones (Chaverri *et al.*, 2003). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con Clustal W del programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 90 muestras de suelo se identificó la especie de 42 aislamientos, de los géneros *Fusarium* spp., *R. solani* y *Trichoderma* spp.

Identificación de patógenos y antagonistas

Identificación de *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*

Seis cepas de hongos fitopatógenos, *F. solani* (Fsol-1 y Fsol-9), *F. oxysporum* (Foxy 23 y Foxy-43), *F. verticillioides* (Fvert-4), se analizaron con las claves de Nelson *et al.* (1983) y *R. solani*, según las claves dicotómicas de Barnett y Hunter (1988) (Figura 1).

Identificación morfológica de *Trichoderma*

De las siete cepas se identificaron por su morfología cinco de *T. harzianum* y dos a *T. asperellum*. Las características fenotípicas en todas las cepas fueron color de los conidióforos hialino, conidios unicelulares ovoides, formando racimos terminales pequeños de color hialino o verde amarillento, y coloración de

RESULTS AND DISCUSSION

Out of the 90 soil samples, we were able to identify the species of 42 isolates of the *Fusarium* spp., *R. solani*, and *Trichoderma* spp. genera.

Pathogens and antagonists identification

Fusarium and *Rhizoctonia solani* identification

Six phytopathogenic fungus strains: *F. solani* (Fsol-1 and Fsol-9), *F. oxysporum* (Foxy 23 and Foxy-43), and *F. verticillioides* (Fvert-4), were analyzed using the keys of Nelson *et al.* (1983) and *R. solani* was analyzed according to Barnett and Hunter's dichotomous keys (1988) (Figure 1).

Trichoderma's morphological identification

Out of the seven strains, five were identified as *T. harzianum* and two as *T. asperellum*, according to their morphology. The following phenotypic traits were found in all strains: hyaline colored conidiophores, ovoid unicellular conidia, small hyaline or yellowish green terminal clusters, and colouring of the colony at the core of the PDA culture medium. The strains were designated Tri-1 to Tri-7.

The Tri-1 and Tri-2 strains colonies showed a yellowish-white color and cottony appearance; in contrast, the Tri-3 and Tri-4 strains were white. Only Tri-3 formed cottony-looking mycelium. Tri-5 was the only one that showed a yellowish-green color, while Tri-6 and Tri-7 showed a yellow color and

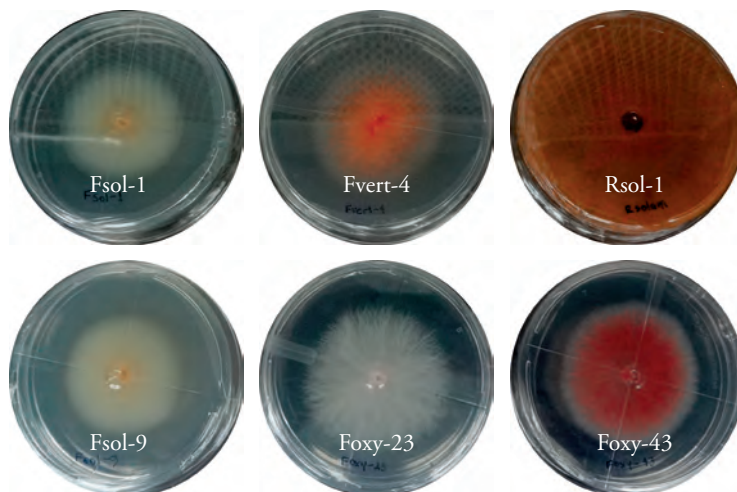


Figura 1. Fenotipo de especies de hongos patógenos identificados 10 días después de la inoculación en medio PDA. Fsol-1 y Fsol-9: *Fusarium solani*, Fvert-4: *F. verticillioides*, Foxy-23 y Foxy-43: *F. oxysporum* y Rsol-1: *Rhizoctonia solani*.

Figure 1. Phenotype of pathogenic fungus species identified 10 days after inoculation in a PDA medium. Fsol-1 and Fsol-9: *Fusarium solani*, Fvert-4: *F. verticillioides*, Foxy-23 and Foxy-43: *F. oxysporum* and Rsol-1: *Rhizoctonia solani*.

la colonia en medio de cultivo PDA. Las cepas fueron denominadas Tri-1 al Tri-7.

La colonia de las cepas Tri-1 y Tri-2 mostraron coloración blanco-amarillenta y aspecto algodonoso; en contraste, la de Tri-3 y Tri-4 fue blanca. Solo Tri-3 formó micelio con aspecto algodonoso. Tri-5 fue la única que mostró coloración verde-amarillento y Tri-6 y Tri-7 amarilla y crecimiento de micelio plano (Figura 2). Lo anterior concuerda con lo descrito por Infante *et al.* (2009), de que la mayoría de las colonias de *Trichoderma* fueron blancas, algunas se tornaron verde oscuro, verde amarillento o amarillo, el crecimiento del micelio de algunas cepas es ralo y muy fino, por lo que su apariencia fue de colonia plana (la versión impresa muestra las figuras en escala de grises y la versión electrónica a color).

Identificación molecular de *Trichoderma*

Los análisis de las secuencias de ADN para la identificación molecular de las especies de *Trichoderma* mostraron porcentaje alto de identidad con varias muestras de *T. asperellum* y *T. harzianum*. La de Tri-3 y Tri-5 coincidió 100 % con *T. asperellum*; el resto de las cepas mostró 95 y 100 % de identidad con *T. harzianum* (Cuadro 1).

La identificación y caracterización antes se basaban en rasgos morfológicos. Ahora, el análisis molecular, como la secuenciación del rRNA, permite mayor precisión en la identificación de especies (Martin y Rygiewicz, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Guigón-López *et al.*, 2010). La ubicación taxonómica de las cepas es fundamental porque es el inicio para mejorar

flat mycelium growth (Figure 2). This agrees with the results described by Infante *et al.* (2009), who indicated that most *Trichoderma* colonies were white, some turned dark green, yellowish green or yellow; the mycelium growth of some strains was sparse and very thin, and its appearance was that of a flat colony. (the printed version shows figures in gray shades and the electronic version shows in color).

Trichoderma molecular identification

DNA sequence analysis for the molecular identification of *Trichoderma* species showed a high percentage of identity with several *T. asperellum* and *T. harzianum* samples. Tri-3 and Tri-5 had a 100 % match with *T. asperellum*; the rest of the strains showed 95 and 100 % identity with *T. harzianum* (Table 1).

In the past, identification and description were based on morphological features. Now, molecular analysis (such as rRNA sequencing) enables greater accuracy in species identification (Martin and Rygiewicz, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Guigón-López *et al.*, 2010). The taxonomic location of the strains is fundamental because it is the first step towards the improvement of the evaluation design of their biological activity and the determination of the development of their action mechanisms. As a whole, this information enables an efficient selection of the organisms that could be used for the biocontrol of plant pathogens, due to their antagonistic function.

The dendrogram grouped the seven *Trichoderma* strains in two clusters: 1) *T. asperellum* (Tri-3 and Tri-

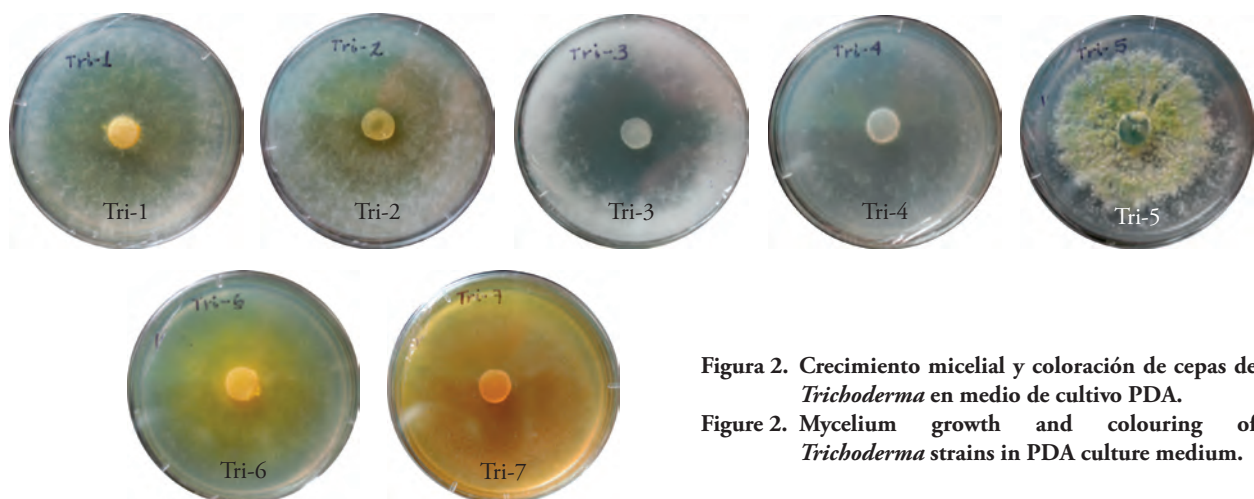


Figura 2. Crecimiento micelial y coloración de cepas de *Trichoderma* en medio de cultivo PDA.

Figure 2. Mycelium growth and colouring of *Trichoderma* strains in PDA culture medium.

Cuadro 1. Identificación morfológica y molecular de las regiones ITS1 e ITS2 en siete cepas de *Trichoderma*. Todas las cepas con E-value=0.0.
Table 1. Morphological and molecular identification of the ITS1 and ITS2 regions in seven *Trichoderma* strains. E-value for all strains=0.0.

Cepa (pb)	Accesión*	Identificación		BLAST
		Morfología	Secuencia ITS	% de Identidad
Tri-1 (580)	KF624792	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	95
Tri-2 (602)	KJ767087	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	99
Tri-3 (569)	KP639196	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	100
Tri-4 (588)	KP263724	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	99
Tri-5 (586)	KM268676	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	100
Tri-6 (602)	KP263604	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	99
Tri-7 (585)	KP418577	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	100

*National Center for Biotechnology Information.

el diseño de evaluaciones de su actividad biológica y determinar el desarrollo de sus mecanismos de acción. Esta información en conjunto permite una selección eficiente de los organismos que podrían utilizarse en el biocontrol de patógenos de plantas, por su función antagonista.

El dendrograma agrupó las siete cepas de *Trichoderma* en dos clusters: 1) *T. asperellum* (Tri-3 y Tri-5), y 2) *T. harzianum* (Tri-1, Tri-2, Tri-4, Tri-6 y Tri-7) (Figura 3). La presencia de *T. harzianum* fue predominante (71.42 %) respecto a *T. asperellum* (28.57 %). Esto podría esperarse ya que *T. harzianum* es la especie aislada con frecuencia mayor en el mundo, por su adaptación y distribución cosmopolita (Chaverri y Samuels, 2003; Sosa *et al.*, 2014).

Pruebas de patogenicidad de *Fusarium* y *R. solani*

Las plantas de frijol inoculadas con los patógenos *Fusarium* spp. y *R. solani* mostraron patogenicidad

5), and 2) *T. harzianum* (Tri-1, Tri-2, Tri-4 and Tri-7) (Figure 3). The presence of *T. harzianum* (71.42 %) prevailed over *T. asperellum* (28.57 %). This may be expected, since *T. harzianum* is the most frequently isolated species in the world, due to its cosmopolitan adaptation and distribution (Chaverri and Samuels 2003; Sosa *et al.*, 2014).

Pathogenicity tests with *Fusarium* and *R. solani*

Bean plants inoculated with *Fusarium* spp. and *R. solani* pathogens showed different pathogenicity, according to the CIAT visual scale (CIAT, 1987). The plants reaction to Rsol-1 was "susceptibility" (average: 7): the plants inoculated with Foxy-23, Foxy-43, and Fsol-1 were moderately susceptible (average: 6); meanwhile, those inoculated with Fsol-9 and Fvert-4 were moderately susceptible (4 and 6, respectively). Control plants showed no root or hypocotyl damage (Figure 4).

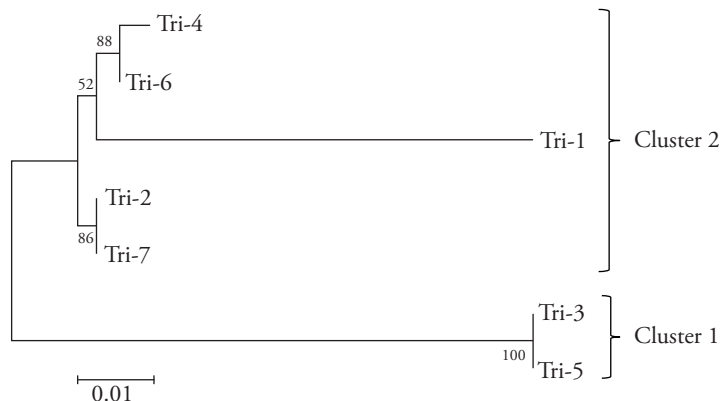


Figura 3. Dendrograma de siete cepas de *Trichoderma* spp. a partir de secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 por el método estadístico de Neighbor-Joining.

Figure 3. Dendrogram of seven *Trichoderma* spp. strains, based on the sequencing of the ITS1 and ITS2 regions, using the Neighbor-Joining statistical method.

diferente, según la escala visual del CIAT (CIAT, 1987). La reacción de las plantas a Rsol-1 fue “susceptibilidad”, con promedio de 7; las plantas inoculadas con Foxy-23, Foxy-43 y Fsol-1 fueron moderadamente susceptibles, con promedio de 6 y las inoculadas con Fsol-9 y Fvert-4 moderadamente susceptibles con valor de 4 y 6, respectivamente. Las plantas testigo no mostraron daño tanto en la raíz como en el hipocotilo (Figura 4).

Preselección de cepas antagonistas: Antibiosis

Los metabolitos, como quitinasas, glucanasas y otras proteínas de resistencia que producen las cepas antagónicas de *Trichoderma* en el medio de cultivo inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos (Elad *et al.*, 1982; Baker y Griffin, 1995; Elad, 2000; El-Katatny *et al.*, 2001). Ese crecimiento se evalúa como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los patógenos *Fusarium* y *R. solani* por *Trichoderma* demuestra la presencia del mecanismo. En el presente ensayo la inhibición promedio del crecimiento micelial fue entre 72.3 y 87.5 %, y el antagonismo fue tipo 2 (Cuadro 2).

Trichoderma asperellum (Tri-5) inhibió más a todos los patógenos ($p \leq 0.0001$), con promedio de

Pre-selection of antagonistic strains: antibiosis

Metabolites —such as chitinases, glucanases, and other resistance proteins— produced by antagonistic *Trichoderma* strains in the culture medium inhibit the growth of phytopathogenic fungi (Elad *et al.*, 1982; Baker and Griffin, 1995; Elad, 2000; El-Katatny *et al.*, 2001). That growth is evaluated as an inhibition percentage with regard to mycelium growth. The presence of the mechanism is demonstrated by the inhibition percentage of the *Fusarium* and *R. solani* pathogens' mycelium growth caused by *Trichoderma*. In this study, the average inhibition of mycelium growth varied between 72.3 and 87.5%, and antagonism was identified as type 2 (Table 2).

Trichoderma asperellum (Tri-5) had a higher inhibition effect over all pathogens ($p \leq 0.0001$), with an 85.39 % average; the remaining *Trichoderma* strains showed no significant difference and the PRGI interval for phytopathogens varied between 72.37 and 78.02 % (Figure 5, Table 2). The pathogen with the highest PRGI in relation to the seven *Trichoderma* strains was *F. oxysporum* (Foxy-23) with an 87.5 % average; the pathogen less inhibited by *Trichoderma* strains was *F. solani* (Fsol-1) with 72.37 % (Table 2).

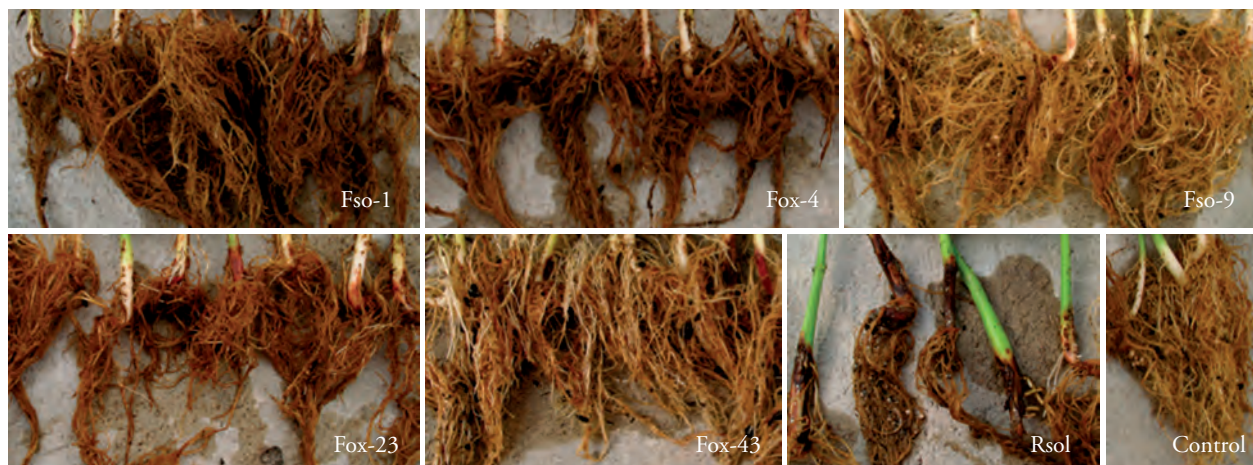


Figura 4. Patogenicidad de *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* en frijol cv. Montcalm. Fso-1 y Fso-9: *F. solani*, Fox-4: *F. verticillioides*, Fox-23 y Fox-43: *F. oxysporum*, Rsol: *R. solani* y testigo: sin inóculo. Las plantas muestran niveles de daño basado en la pudrición y densidad de raíz e hipocótilo, 28 días después de la inoculación. Las plantas testigo sin daño en hipocótilo y raíz mostraron densidad radicular normal.

Figure 4. *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia solani* pathogenicity in cv. Montcalm bean. Fso-1 and Fso-9: *F. solani*, Fox-4: *F. verticillioides*, Fox-23 and Fox-43: *F. oxysporum*, Rsol: *R. solani* and control: no inoculum. The plants show damage levels based on root and hypocotyl rot and density, 28 days after inoculation. Control plants with no hypocotyl and root damage showed normal root density.

Cuadro 2. Inhibición (%) del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma*.**Table 2. Inhibition (%) of the radial growth of *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, and *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma*.**

Antagonista (cepa)	Patógenos [†]						Promedio (%)
	Fsol-1	Fvert-4	Fsol-9	Foxy-23	Foxy-43	Rsol	
<i>T. harzianum</i> (Tri-1)	75.83	77.20	71.90	88.90	75.90	69.40	76.52 b [‡]
<i>T. harzianum</i> (Tri-2)	79.55	81.50	75.40	84.76	74.07	69.40	77.45 ab
<i>T. asperellum</i> (Tri-3)	70.26	75.80	77.20	87.53	77.77	81.20	78.29 ab
<i>T. harzianum</i> (Tri-4)	59.10	75.80	68.40	84.80	79.60	66.30	72.33 b
<i>T. asperellum</i> (Tri-5)	79.50	87.20	77.20	93.12	88.80	86.50	85.39 a
<i>T. harzianum</i> (Tri-6)	66.54	80.18	77.20	90.30	74.10	70.60	76.49 ab
<i>T. harzianum</i> (Tri-7)	75.80	85.77	73.68	83.37	75.90	65.90	76.74 ab
Promedio	72.37	80.49	74.43	87.54	78.02	72.76	77.60

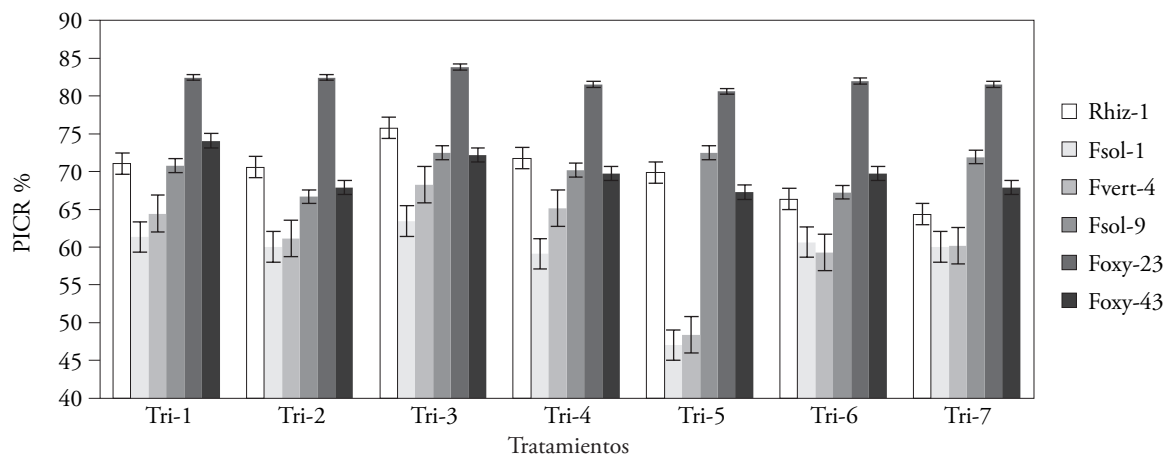
[†]Fsol: *F. solani*, Fvert: *F. verticillium*, Foxy: *F. oxysporum*, Rsol: *R. solani*, [‡]Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Duncan $p \leq 0.05$) ♦ [†]Fsol: *F. solani*, Fvert: *F. verticillium*, Foxy: *F. oxysporum*, Rsol: *R. solani*, [‡]Means with different letter are statistically different (Duncan; $p \leq 0.05$).

85.39 %; las cepas restantes de *Trichoderma* no mostraron diferencia significativa y el intervalo PICR sobre los fitopatógenos fue 72.37 a 78.02 % (Figura 5, Cuadro 2). El patógeno que presentó PICR mayor por las siete cepas de *Trichoderma* fue *F. oxysporum* (Foxy-23) con promedio de 87.5 %; el patógeno que presentó menor inhibición por las cepas de *Trichoderma* fue *F. solani* (Fsol-1) con 72.37 % (Cuadro 2).

Ya que las siete cepas en el presente estudio inhibieron más de 70 % el crecimiento micelial de *Fusarium* spp. y *R. solani*, es probable que haya participación de enzimas hidrolíticas en la reacción

Given that the seven strains in the present study inhibited more than 70 % of *Fusarium* spp. and *R. solani*'s mycelium growth, hydrolytic enzymes are likely to participate in the inhibitory reaction (Yedidia *et al.*, 2000; Reis-Almeida *et al.*, 2007). Therefore, we can propose these strains as potential inhibitors of phytopathogenic soil fungi. Other field and greenhouses studies will validate their antagonistic effect in other agriculturally important crops.

In the pre-selection test, the pathogens' PRGI of antagonists native strains was greater than 70 %; this showed its potential to confront pathogens, as they inhibited radial growth; this potential may be due to

**Figura 5. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp. en prueba de cultivos apareados.****Figure 5. Percentage of radial growth inhibition (PRGI %) in *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma* spp., in a matched culture test.**

inhibitoria (Yedidia *et al.*, 2000; dos Reis-Almeida *et al.*, 2007) por lo que puede postularse a estas cepas como inhibidoras potenciales de hongos fitopatógenos de suelo. Otros estudios en campo e invernadero permitirán validar su efecto antagónico en otros cultivos de importancia agrícola.

El PICR de los patógenos de las cepas nativas de antagonistas, en la prueba de preselección, fue superior a 70 %; esto mostró su potencial para confrontar los patógenos al inhibir el crecimiento radial y puede deberse a que las cepas nativas de *Trichoderma* compiten con los patógenos en el mismo nicho ecológico (Andrews, 1992).

Confrontaciones entre *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y *R. solani*

El PICR de las siete cepas de *Trichoderma* sobre los hongos patógenos fue variable y dependió de los organismos involucrados en la confrontación ($p \leq 0.0001$). Los valores medios fueron 69.84 a 82.05 % (Figura 5). Las cepas de *Trichoderma* en conjunto inhibieron de 74.1 % sobre los patógenos (Figura 5). Destacó PICR de Rsol-1, que se obtuvo de la acción de las cepas de *Trichoderma*, con 69.84 %. Esto pudo deberse a la velocidad de crecimiento micelial de Rsol-1 similar a *Trichoderma*. En todas las confrontaciones ambos hongos compitieron por espacio y nutrientes y fue notable el contacto del antagonista con el patógeno, donde *Trichoderma* colonizó los patógenos *F. solani* y *R. solani*. *T. asperellum* (Tri-5) inhibió el crecimiento vegetativo de *F. solani* (Fsol-1) (Figura 6A) y *R. solani* (Figura 6B) mostró hiperparasitismo ya que invadió prácticamente todas las colonias de ambos patógenos y esporuló sobre ellas. *Trichoderma harzianum* (Tri-6) también colonizó a *R. solani* (Rsol-1) (Figura 6C) y *F. solani* (Fsol-1) (Figura 6D); pero, la invasión fue menor que en *T. asperellum*, y sólo inhibió el crecimiento del fitopatógeno.

Los resultados de las siete cepas de *Trichoderma*, confrontadas contra *Fusarium*, se ubicaron en el grado 1 de antagonismo de la escala de Bell *et al.* (1982). Todas las cepas de *Trichoderma* colonizaron 100 % de la superficie del medio creciendo sobre los fitopatógenos *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* 10 días después de la inoculación. Esto evidenció la capacidad antagónica alta de los aislamientos. El antagonismo entre *Trichoderma* y *R. solani* se ubicó también

native *Trichoderma* strains competing with pathogens in the same ecological niche (Andrews, 1992).

Confrontation between *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., and *R. solani*

The PRGI of the seven *Trichoderma* strains on pathogenic fungi was variable and depended on the organisms compared ($p \leq 0.0001$). The mean values varied between 69.84 and 82.05% (Figure 5). Overall, *Trichoderma* strains inhibited 74.1 % of pathogens (Figure 5). Rsol-1's PRGI stood out; it was obtained from the action of *Trichoderma* strains (69.84 %). This may be because Rsol-1's mycelium growth rate is similar to *Trichoderma*'s. In all confrontations, both fungi competed for space and nutrients; the contact of the antagonist with the pathogen was remarkable—in those cases where *Trichoderma* colonized the *F. solani* and *R. solani* pathogens. *T. asperellum* (Tri-5) inhibited the vegetative growth of *F. solani* (Fsol-1) (Figure 6A); meanwhile, *R. solani* (Figure 6B) showed hyperparasitism, because it practically invaded all colonies of both pathogens and cast its spores over them. *Trichoderma harzianum* (Tri-6) also colonized *R. solani* (Rsol-1) (Figure 6C) and *F. solani* (Fsol-1) (Figure 6D); however, the level of invasion was lower than in *T. asperellum*, and it only inhibited the phytopathogen's growth.

When confronted with *Fusarium*, the results of the seven *Trichoderma* strains occupied the 1st level of the Bell *et al.* antagonism scale (1982). Ten days after inoculation, all *Trichoderma* strains had colonized 100 % of the medium surface, growing over the *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F. verticillioides* phytopathogens. This demonstrated the isolations' high antagonistic capacity. Seven days after inoculation, the antagonism between *Trichoderma* and *R. solani* had also reached level 1. Inhibition of the latter exceeded 90 %, with spore masses on the pathogenic fungi, beyond the line between *Trichoderma* and *R. solani* (Figure 6B). This indicated that all *Trichoderma* strains are able to grow fast, even in the presence of highly aggressive pathogens (such as *R. solani*). This characteristic demonstrated the antagonistic potential and showed that if the surface colonized by the antagonist is great, its domain over the pathogen will be greater as well. It will also give a competitive advantage in the struggle for space, before showing its toxic and mycoparasitic potential in *in vitro* conditions (Küçük and Kivanç,

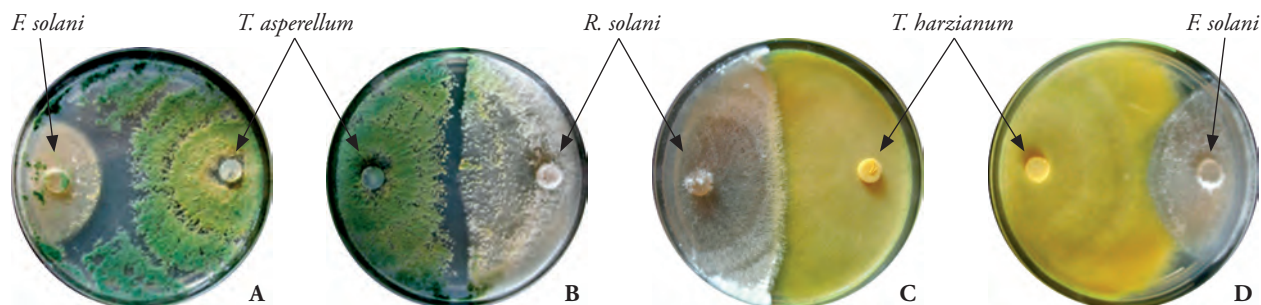


Figura 6. Confrontación de *T. asperellum* (Tri-5) y *T. harzianum* (Tri-6) sobre *Fusarium solani* (Fsol-1) y *R. solani*. Donde A: *T. asperellum* sobre *F. solani*, mostró un micoparasitismo total a los 9 días después de la inoculación; B: mostró micoparasitismo casi total de *T. asperellum* sobre *R. solani* a los 7 días de la inoculación; C: micoparasitismo de *T. harzianum* sobre *R. solani* a los 7 días de la inoculación; D: Colonización de *T. harzianum* sobre *F. solani* a los 10 días de la inoculación. Las flechas en color rojo indican el límite de micoparasitismo de *Trichoderma* spp. en los hongos patógenos.

Figure 6. Confrontation between *T. asperellum* (Tri-5) and *T. harzianum* (Tri-6) with *Fusarium solani* (Fsol-1) and *R. solani*. Where A: *T. asperellum* on *F. solani* showed a total mycoparasitism (9 days after inoculation). B: showed almost total mycoparasitism of *T. asperellum* on *R. solani* (7 days after inoculation). C: mycoparasitism of *T. harzianum* on *R. solani* (7 days after inoculation). D: colonization of *T. harzianum* on *F. solani* (10 days after inoculation). Red arrows indicate the limit of *Trichoderma* spp. mycoparasitism in pathogenic fungi.

en el grado 1, 7 días después de la inoculación. La inhibición de este último fue mayor a 90 %, con masas de esporas sobre el hongo patógeno, más allá de la línea divisoria entre *Trichoderma* y *R. solani* (Figura 6B). Esto indicó que todas las cepas de *Trichoderma* pueden crecer rápido aún en presencia de patógenos con alta agresividad, como *R. solani*. Esta característica evidenció el potencial antagónico y mostró que a mayor superficie colonizada por el antagonista mayor será el dominio sobre el patógeno. También, conferirá ventaja competitiva por el espacio antes de mostrar su potencial tóxico y micoparasítico en condiciones *in vitro* (Küçük, y Kivanç, 2004). Lo anterior permite plantear que el antagonismo entre microorganismos dependerá de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista, producción de enzimas extracelulares, correspondientes a la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados y virulencia del patógeno (Infante *et al.*, 2009).

La actividad para el antagonismo de *Trichoderma* no fue estadísticamente diferente (medias PICR de 73.1 a 76.4 %). La coincidencia en el intervalo de medias de PICR, entre las siete cepas nativas de *Trichoderma*, puede deberse a la coadaptación de los antagonistas con los hongos patógenos, pues todos los microorganismos en este estudio provenían de climas y hábitat similares (Andrews, 1992). La capacidad alta de inhibición del crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* permite destacar su eficiencia sobre los hongos causantes de enfermedades

(2004). Therefore, we are able to state that the antagonism between microorganisms will depend on the antagonist's biotrophic or necrotrophic action, the extracellular enzymes production, corresponding to the composition and structure of the cell walls of parasitic fungi, and the pathogen's virulence (Infante *et al.*, 2009).

Trichoderma's antagonistic activity was not statistically different (mean PRGI: 73.1 to 76.4 %). The coincidence in the range of PRGI means among the seven native *Trichoderma* strains may be the result of the coadaptation of the antagonists with the pathogenic fungi, since all the microorganisms in this study came from similar weathers and habitats (Andrews, 1992). The high capacity of *Trichoderma* strains to inhibit mycelium growth allows us to emphasize their efficiency over the fungi that cause root diseases and confirms that the coadaptation of antagonistic and pathogenic fungi is required for this to be accomplished (Baker and Cook, 1974).

The confrontations that involved interaction took place quickly (3 to 4 days after the first contact). *Trichoderma* strains invaded pathogens' (Figure 7). These results are similar to those observed by Ezziyyani *et al.* (2004b), who found out that the *T. harzianum*-*P. capsici* intersection zone eventually increased, and this event was accompanied by the destruction of *P. capsici's* mycelium. Kexiang *et al.* (2002) indicated that the intersection zone between the antagonists (*T. harzianum* and *T. atroviride*) and

radiculares y confirma que la coadaptación de hongos antagonistas y hongos patógenos se requiere para que lo anterior se cumpla (Baker y Cook, 1974).

Las confrontaciones que tuvieron interacción ocurrieron rápido (3 a 4 días después del primer contacto). Las cepas de *Trichoderma* invadieron a las de los patógenos (Figura 7). Estos resultados son similares a los observados por Ezziyyani *et al.* (2004b), quienes encontraron que la zona de intersección de *T. harzianum* frente a *P. capsici* aumentó con el tiempo, y este evento lo acompañó la destrucción de micelio de *P. capsici*. Kexiang *et al.* (2002) indicaron que la zona de intersección por los antagonistas (*T. harzianum* y *T. atroviride*) y la inhibición de crecimiento micelial del patógeno (*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*) aumentó con el tiempo, y el crecimiento del micelio del patógeno se suprimió por micoparasitismo.

El nivel de antagonismo está dado principalmente por el mecanismo de micoparasitismo. Los resultados de nuestro estudio fueron similares a los de Michel-Aceves *et al.* (2013), quienes documentaron que la inhibición de 6 de 12 aislados de *Trichoderma* fue de 10 a 94.4 % del crecimiento radial de *Sclerotium rolfsii*. El micoparasitismo de *Trichoderma* sobre los patógenos fue notable; en general, las siete cepas de *Trichoderma* parasitaron a los cinco patógenos; pero las cepas de *T. asperellum* (Tri-3 y Tri-5) mostraron formación mayor de haustorios sobre las hifas de *Fusarium* spp. y *R. solani*. Las formas de parasitar de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos se observó con microscopio. Las hifas de *T. harzianum* (Tri-1) se adhirieron a las hifas y fiálides de *F. solani* (Fsol-1) (Figura 7A), formaron haustorios y penetraron la

the mycelium growth inhibition of the pathogen (*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*) increased over time, and that mycoparasitism suppressed the pathogen's mycelium growth.

The antagonism level is mainly the result of the mycoparasitism mechanism. The results of our study were similar to those of Michel-Aceves *et al.* (2013), who documented that the inhibition of 6 out of 12 *Trichoderma* isolates was 10-94.4 % of the *Sclerotium rolfsii*'s radial growth. *Trichoderma*'s mycoparasitism over pathogens was remarkable. In general, the *Trichoderma* seven strains parasitized the five pathogens; however, *T. asperellum* (Tri-3 and Tri-5) strains showed greater formation of haustoria over the *Fusarium* spp. and *R. solani* hyphae. The ways in which *Trichoderma* spp. parasitized pathogens were observed under a microscope: *T. harzianum* (Tri-1) hyphae adhered to *F. solani* (Fsol-1) hyphae and phialide (Figure 7A), they formed haustoria, and penetrated the hypha; meanwhile, *T. asperellum* (Tri-3) formed large numbers of haustoria in Fsol-9 hyphae, and parasitized and compressed (Figure 7B); *T. asperellum* hyphae (Tri-3) penetrated, forming haustoria on *R. solani* hyphae (Figure 7C); *T. harzianum* (Tri-4) formed haustoria, penetrated, and grew as a parasite within *R. solani* hyphae (10 to 12 days after the confrontation started) (Figure 7D). Michel-Aceves *et al.* (2005) mentioned a positive correlation between the number of enzymes and the antagonist's mycoparasitism percentage, and the disease reduction in affected plants. This coincides with our observations of the *T. asperellum* and *T. harzianum* strains: *T. asperellum* formed

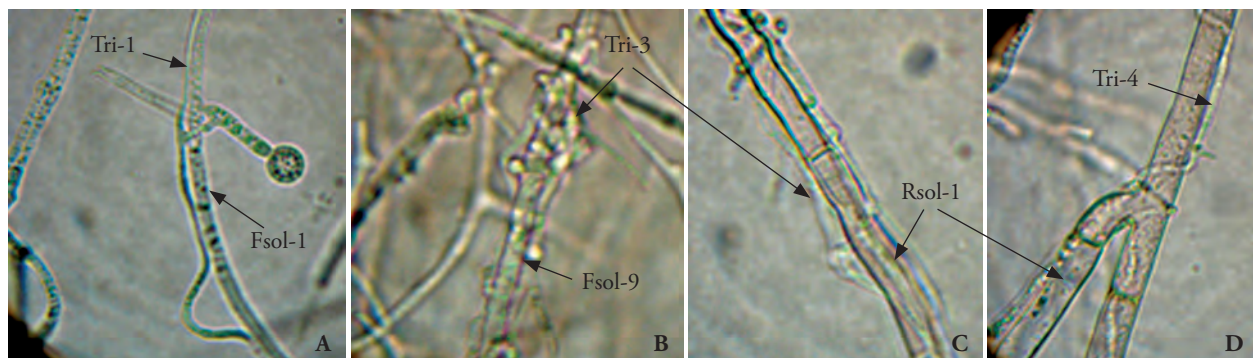


Figura 7. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. en pruebas de cultivos duales. A) Tri-1 vs. Fsol-1 (100X); B) Tri-3 vs. Fsol-9 (100X); C) Tri-3 vs. *R. solani* (400X); D) Tri-4 vs. *R. solani* (400X).

Figure 7. *Trichoderma* spp. mycoparasitism in dual culture tests. A) Tri-1 vs. Fsol-1 (100X); B) Tri-3 vs. Fsol-9 (100X); C) Tri-3 vs. *R. solani* (400X); D) Tri-4 vs. *R. solani* (400X).

hifa; mientras que *T. asperellum* (Tri-3) formó gran cantidad de haustorios en hifas de Fsol-9 y parasitó y comprimió (Figura 7B). Las hifas de *T. asperellum* (Tri-3) penetraron, formando haustorios sobre hifas de *R. solani* (Figura 7C); *T. harzianum* (Tri-4) formó haustorios, penetró y creció como parásito dentro de hifas de *R. solani* 10 a 12 días después del inicio de la confrontación (Figura 7D). Michel-Aceves *et al.* (2005) mencionaron que existe una correlación positiva entre la cantidad de enzimas y el porcentaje de micoparasitismo por el antagonista, y la reducción de la enfermedad en plantas afectadas. Esto coincide con lo que se observó con las cepas de *T. asperellum* y *T. harzianum*; *T. asperellum* formó más haustorios, con lo que facilitó la entrada y el micoparasitismo de las hifas del patógeno; para *T. harzianum* se especula que no hubo reconocimiento suficiente entre *Trichoderma* y el patógeno, mediante la interacción de lectinas-carbohidratos, las cuales aglutinan células que interaccionan con la superficie celular del patógeno y propician micoparasitismo (Infante *et al.*, 2009); por tanto, no existió el mismo nivel de micoparasitismo que con *T. asperellum*.

Los resultados de patogenicidad y antagonismo mostraron significancia ($r=0.41$, $p=0.05$); *R. solani* mostró patogenicidad mayor en planta y fue el patógeno con menor inhibición *in vitro* por las cepas de *Trichoderma*. Los antagonistas y patógenos inoculados en las plantas de frijol tendrían comportamiento similar al que se presentó en las confrontaciones *in vitro*; por lo que, estas confrontaciones son una herramienta de aproximación para definir el nivel de control biológico de las especies de *Trichoderma* ante la presencia de hongos patógenos del suelo.

CONCLUSIONES

Las siete cepas de *T. harzianum* y *T. asperellum* identificadas morfológicamente y molecularmente mostraron niveles diferentes micoparasitismo en confrontaciones con los patógenos de raíz de frijol *Fusarium* spp. y *R. solani*. La cepa Tri-5 *T. asperellum* destacó por la inhibición mayor de crecimiento micelial y radial. El PICR promedio de la acción de todas las cepas de *Trichoderma* sobre Rsol-1 fue inferior al promedio general, pero *T. asperellum* por su capacidad antagónica fue capaz de invadir al patógeno en 90 %. Esta característica se corroboró por la formación de más haustorios por *T. asperellum*, que facilitó

more haustoria, which facilitated the entry and mycoparasitism of the pathogen's hyphae. In the case of *T. harzianum*, we speculate that there was not enough recognition between *Trichoderma* and the pathogen, through the interaction of lectins-carbohydrates, which agglutinate the cells that interact with the pathogen's cell surface and favor mycoparasitism (Infante *et al.*, 2009), therefore, the mycoparasitism level is not the same than with *T. asperellum*.

Pathogenicity and antagonism results were significant ($r=0.41$, $p=0.05$). *R. solani* showed greater pathogenicity in the plant and it was the pathogen with less *in vitro* inhibition by *Trichoderma* strains. The antagonists and pathogens inoculated in bean plants would behave similar to those found in *in vitro* confrontations. Therefore, these confrontations are a tool that can help us to define the biological control level of *Trichoderma* species faced with soil pathogenic fungi.

CONCLUSIONS

The seven *T. harzianum* and *T. asperellum* strains, that were morphologically and molecularly identified, showed different mycoparasitism levels in confrontations with the *Fusarium* spp. and *R. solani* bean root pathogens. The *T. asperellum* Tri-5 strain was remarkable for the greater inhibition of mycelial and radial growth. The average PRGI of the action of all *Trichoderma* strains over Rsol-1 was lower than the general average; however, due to its antagonistic capacity, *T. asperellum* was able to invade 90 % of the pathogen. The formation of more haustoria by *T. asperellum* —which facilitated the entry and mycoparasitism of the pathogen hyphae— confirmed this characteristic.

—End of the English version—



taron la entrada y el micoparasitismo de las hifas del patógeno.

LITERATURA CITADA

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 603-635.

- Baker, K. F., and J. R. Cook. 1974. Biological control of plants pathogens. Fifth edition. CRS Press. Freeman, San Francisco, CA. USA. 157 p.
- Baker, R., and G. J. Griffin. 1995. Novel approaches to integrated pest management. In: Reuveni, R. (ed). Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Plant Pathogens. CRS Press, Boca Raton, Florida. pp: 153-182.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1988. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota. 218 p.
- Bell, D. K., H. D. Wells, and C. R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.
- Bellemain, E., T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet, and H. Kausarud. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An *in silico* approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiol. 10: 189.
- Bolkan, H. A. 1980. Las pudriciones radicales. In: Schwartz, H. F., y G. E. Gálvez (eds). Problemas de Producción del Frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. pp: 65-99.
- CIAT. 1987. Standard System for the evaluation of bean germplasm. A. Van Schoonoven, and M. A. Pastor-Corrales. (comps). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 54 p.
- Cichy, K. A., S. S. Snapp, and W.W. Kirk. 2007. *Fusarium* root rot incidence and root system architecture in grafted common bean lines. Plant Soil. 300: 233-244.
- Chaverri, P., G. J. Samuels. 2003. *Hypocreal Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. Stud. Mycol. 48: 1-116.
- Chaverri, P., L. A. Castlebury, B. E. Overton, and G. J. Samuels. 2003. *Hypocreal Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia 95: 1100-1140.
- Dennis, C., and J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Hyphal interactions. Trans. Brit. Mycol. Soc. 57: 363-369.
- dos Reis-Almeida, F. B., F. Menezes-Cerqueira, R. do Nascimento-Silva, C. J. Ulhoa, and A. Lopes-Lima. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. Biotechnol Lett. 29: 1189-1193.
- Druzhinina, I. S., A. G. Kopchinskiy, and C. P. Kubicek. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience 47: 55-64.
- Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Prot. 19: 709-714.
- Elad, Y., I. Chet, and Y. Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28: 719-725.
- Ezziyyani, M., M. C. Pérez S., A. Sid A., M.A. Requena, y M. E. Candela. 2004a. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anal. Biol. 26: 35-45.
- Ezziyyani, M., S. C. Pérez, M. E. Requena, L. Rubio, y M. E. Candela. 2004b. Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Annal. Biol. 26: 69-78.
- González, I., D. Infante, B. Martínez, Y. Arias, N. González, I. Miranda, y P. Peteira. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. Biotechnol. Appl. 29: 7-11.
- Guigón-López, C., V. Guerrero-Prieto, F. Vargas-Albores, E. Carvajal-Millan, G. D. Ávila-Quezada, L. Bravo-Luna, M. Ruocco, S. Lanzuise, S. Woo, y M. Lorito. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Rev. Mex. Fitopatol. 28: 87-96.
- Harman, G. E. 2004. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Dis. 84: 377-393.
- Hermosa, M. R., I. Grondona, E. A. Iturriaga, J. M. Diaz-Minguez, C. Castro, E. Monte, and I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1890-1898.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4-10.
- Infante, D., B. Martínez, N. González, y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protec. Veg. 24: 14-21.
- Kexiang, G., L. Xiaoguang, L. Yonghong, Z. Tianbo, and W. Shuliang. 2002. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. J. Phytopathol. 150: 271-276.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. Publicado en línea. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Küçük, Ç., and M. Kivanç. 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turk J. Biol. 28: 111-115.
- Kullnig, C. M., T. Krupica, L. Woo, L. Mach, M. Rey, T. Benitez, M. Lorito, and P. Kubicek. 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycol. Res. 105: 769-772.
- Lieckfeldt, E., G. J. Samuels, H. I. Nirenberg, and O. Petrini. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? Appl. Environ. Microbiol. 65: 2418-2428.
- Martin, K. J., and T. Rygielwicz. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC microbiology. p. 28.
- Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero-Sánchez, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, y N. Alarcón-Cruz. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. Avanc. Investig. Agrop. 17: 89-107.
- Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero S., O. Rebolledo D., R. Lezama G., R. Ariza F., y A. Barrios A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Rev. Chapingo Serie Hortic. 11: 273-278.
- Michcrop.com. 2016. The Michigan Crop Improvement association website. <http://www.michcrop.com> (Consulta: octubre 2016).
- Mitra, A., and V. C. Lele. 1981. Morphological and nutritional studies on mango malformation fungus, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Indian Phytopathol. 34: 475-483.

- Mora, F. 1996. Combate biológico de *Rhizoctonia solani* mediante el empleo de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en el campo. Agron. Mesoam. 7: 23-30.
- Morgulis, A., G. Coulouris, Y. Raytselis, T. L. Madden, R. Agarwala, and A. A. Schäffer. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. Bioinformatics 15: 1757-1764.
- Nashwa, M. A., A. M. Sallam, K. Albo-Elyousr, and A. E. Hassan. 2008. Evaluation of *Trichoderma* species as biocontrol agents for Damping-Off and wilt diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. Egypt. J. Phytopathol. 36: 81-93.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University, University Park. Pennsylvania, USA. 193 p.
- Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-sektion Liseola. Mitt. Biol. Bundesanstalt. Land-Forst. Berlin-Dahlem 169: 1-117.
- Samuels, G. J., A. Ismaiel, M. C. Bon, S. De Respinis, and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycol. 102: 944-966.
- SAS, Institute. Inc. 9.1. 2009. SAS user guide. Statistics.
- Schneider, K. A., and J. D. Kelly. 2000. A greenhouse screening protocol for *Fusarium* root rot in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). HortSci. 35: 1095-1098.
- Schuster, A., and M. Schmoll. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 787-799.
- Sosa, D., M. S. Pérez, S. Molina, J. Demey, K. Gómez, D. Domínguez, M. Istúriz, R. Rumbos, y D. Parra. 2014. Diversidad genética de *Trichoderma* spp. en Venezuela, determinada mediante análisis combinado ITS-ALFP. Rev. Protec. Veg. 29: 42-51.
- Watanabe, S., K. Kumakura, H. Kato, H. Iyozumi, M. Togawa, and K. Nagayama. 2005. Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seed borne pathogens of rice. J. Gen. Plant Pathol. 71: 351-356.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York. pp: 315-322.
- Worasatit, N., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, and C. Rowland. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. Mycol. Res. 98: 1357-1363.
- Yedidia, I., N. Benhamou, Y. Kapulnik, and I. Chet. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem. 38: 863-873.