

Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos

Molecular Identification of Trichoderma spp. Strains, *in vitro* Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi

César Guigón-López, Víctor Guerrero-Prieto, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Cuauhtémoc. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial. Apdo. Postal 781. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. CP 31570; Francisco Vargas-Albores, Elizabeth Carvajal-Millán, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Hermosillo. Carretera a la Victoria Km. 0.6, Apdo. Postal 1735. Hermosillo, Sonora, México. CP 83304; Graciela Dolores Ávila-Quezada, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Delicias. Ave. Cuarta sur No. 3820, Fracc. Vencedores del Desierto, Delicias, Chihuahua, México. CP 33089 México; Leticia Bravo-Luna, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN. Yautepec, Morelos, México. CP 62731; Michelina Ruocco, Stefania Lanzuise, Sheridan Woo, Matteo Lorito. Dipartimento Ar.Bo.Pa.Ve.-sez. Patologia Vegetale, University of Napoli "Federico II", via Università 100, Portici, Italia. 80055. Correspondencia: vguerrero51@ciad.mx

(Recibido: Febrero 18, 2010 Aceptado: Septiembre 07, 2010)

Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millan, E., Ávila-Quezada, G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28:87-96.

Resumen. Seis cepas nativas de *Trichoderma* spp. se identificaron a especie y se determinó su tasa de crecimiento y antagonismo contra diferentes hongos fitopatógenos. Sus características morfológicas y tasa de crecimiento se determinaron cultivándolas en Papa Dextrosa Agar y mediante un análisis molecular se identificó la especie. El antagonismo fue evaluado mediante confrontación por cultivos duales. Morfológicamente las cepas fueron similares a *T. harzianum* y a *T. viride*; sin embargo, el análisis molecular identificó a TC74, TC74M, T341, T359 y T479, como *T. asperellum* y a T397 como *T. longibrachiatum*. La tasa de crecimiento promedio de las cepas a 25 °C varió de 12 a 17 mm^d⁻¹. La inhibición del crecimiento de *B. cinerea* varió 60% a 75% y el sobrecrecimiento sobre su micelio 25% a 100%. La inhibición de *R. solani* varió 34% a 52% y el sobrecrecimiento 15% a 100%. La actividad antagonica de *T. asperellum* TC74, T341 y T359 fue similar a las cepas de referencia T22 y Th. Estas tres cepas también inhibieron 44% a 64% el crecimiento de *M. phaseolina*, 51% a 59% el de *R. solani*, 28% a 37% el de *P. omnivora* y 5% a 14% el de *Fusarium* sp.

Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millan, E., Ávila-Quezada G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. and Lorito, M. 2010. Molecular Identification of *Trichoderma* spp. Strains, *in vitro* Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi. Revista Mexicana de Fitopatología 28:87-96.

Abstract. Six *Trichoderma* spp. native strains were identified to specie and studied to determine their growth rate and antagonism against plant pathogen fungi. The strains were cultivated on Potato Dextrose Agar to determine their morphological characteristics and growth rate. Molecular analysis was carried out to identify their species. The antagonistic activity was tested by the dual cultures confrontation method. Although morphological characteristics of strains were similar to *T. harzianum* and *T. viride*, the molecular analysis showed that strains TC74, TC74M, T341, T359 and T479, were *T. asperellum* and T397 was *T. longibrachiatum*. *Trichoderma* strains mean growth rate at 25 °C ranged from 12 to 17 mm^d⁻¹. Inhibition of the *B. cinerea* growth ranged from 60% to 75% and mycelium overgrown from 25% to 100%. Inhibition of *R. solani* growth ranged from 34% to 52% and overgrown from 15% to 100%. Antagonistic activity of *T. asperellum* TC74, T341 and T359 was similar to reference strains T22 and Th. The same three strains inhibited the *M. phaseolina* growth from 44% to 64%, *R. solani* from 51% to 59%, *P. omnivora* 28% to 37% and *Fusarium* sp. 5% to 14%.

Palabras clave Adicionales: Biocontrol, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, patógenos de la raíz.

Additional KeyWords: Biocontrol, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, soil borne plant pathogens.

INTRODUCCIÓN

Las pudriciones de raíz se encuentran entre las más importantes enfermedades que mundialmente causan significativas pérdidas económicas en diferentes cultivos agrícolas. Aunque los productos químicos sintéticos son aún la principal herramienta de control para estas enfermedades, los agentes biológicos son una manera efectiva para proporcionar un control más rápido y más seguro, además de que pueden ser incluidos dentro del control integrado de plagas y enfermedades (Verma *et al.*, 2007). El suelo es una importante fuente de microorganismos que han sido ampliamente estudiados para procesos biotecnológicos, contándose entre estos el control biológico de enfermedades en plantas por medio de procesos naturales como la antibiosis y el parasitismo (Fravel, 2005). La principal estrategia para el biocontrol ha sido la identificación de microorganismos del suelo que sean antagonistas efectivos y que su uso biológico sea seguro, estrategia que ya cuenta con resultados exitosos (Alabouvette y Steinberg, 2006; Sánchez *et al.*, 2008). Entre los microorganismos nativos del suelo, *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado y se ha propuesto como agente de control biológico, especialmente contra fitopatógenos nativos del suelo (Howell, 2003; Verma *et al.*, 2007). Los factores clave que contribuyen al efecto antagónico de estos organismos son su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y sus características fisiológicas, sin embargo para una adecuada comprensión de las propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas se requiere de la acertada ubicación taxonómica de estos organismos (Kullnig *et al.*, 2001). La variabilidad de las características morfológicas de las especies de *Trichoderma* hace que su clasificación sea difícil, no obstante con el desarrollo de técnicas moleculares la sistemática de este género ha avanzado sustantivamente en los últimos años y es debido a este avance que la importancia de métodos morfológicos ha disminuido paulatinamente (Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2006). La descripción de las diferencias en las regiones 5.8S del rRNA, ITS1 e ITS2 y otras técnicas han ocasionado que en años recientes, diferentes cepas de *T. harzianum*, se reubicaran en especies como *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. longibrachiatum* (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Kullnig *et al.*, 2001). Del mismo modo, cepas de *T. atroviride* o *T. viride* se han reubicado como *T. asperellum* (Watanabe *et al.*, 2005). El análisis de secuencias genéticas permitió a Tondje *et al.*, (2007) identificar como *T. asperellum* diferentes aislamientos capaces de actuar como micoparasitos. Por otra parte, los modos de acción más comúnmente reportados para *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio, antibiosis por medio de enzimas o la producción de metabolitos secundarios, e inducción de los sistemas de defensa en la planta (Howell, 2003; Harman, 2006). Una herramienta útil y confiable para conocer el potencial como agente de biocontrol de cepas de *Trichoderma* son los ensayos *in vitro* para determinar antagonismo (Larralde *et al.*, 2008),

INTRODUCTION

Root rots are among the most important plant diseases causing world wide important economical losses. Although synthetic chemical products are still the main tool for controlling root rots, biological agents seem to be an effective way to provide faster and safer control, besides that can be included within an integrated pest management (Verma *et al.*, 2007). Soil is an important source of microorganism that has been widely studied as bioresource for biotechnological processes, among which is the biocontrol of plant diseases by natural processes as antibiosis and natural parasitism (Fravel, 2005; Handelsman and Stabb, 1996). The main approach for biocontrol has been to identify effective antagonistic soil microorganisms and their biological safe use. Such strategy already includes a number of successful results (Alabouvette and Steinberg, 2006; Sanchez *et al.*, 2008). Among soil-borne microorganisms, the fungus *Trichoderma* spp. have been widely studied and proposed as biological control agent, mainly against soil-borne plant pathogens (Howell, 2003; Verma *et al.*, 2007). Key factors which contribute to its antagonistic effect are its fast metabolic rate, anti-microbial metabolites production and physiological characteristics. However, to have a thorough knowledge of biochemical, genetic and physiological characteristics of the microorganism, a precise taxonomic classification is required (Kullnig *et al.*, 2001). The variability on morphological characteristics for most *Trichoderma* species, makes their classification difficult to be achieved, never the less, advanced current molecular techniques have made significant advances in systematic characterization, and is due to these advances that the use of morphological methods have been progressively diminishing (Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2006). Description of rRNA 5.8S region, as well as ITS1 and ITS2 and other techniques have recently given as a result that *T. harzianum* strains have been classified on species such as *T. asperellum*, *T. atroviride* and *T. longibrachiatum* (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Kullnig *et al.*, 2001). Likewise, *T. atroviride* or *T. viride* have also been classified as *T. asperellum* (Watanabe *et al.*, 2005). Genetic sequential analysis allowed Tondje *et al.*, (2007) to identify as *T. asperellum* several different isolates which showed micoparasitism activity. Most commonly reported *Trichoderma* spp. biocontrol modes of action are: mycoparasitism, spatial and nutrient competition, enzymatic antibiosis or secondary metabolites production, as well as induction of plant defense systems (Harman, 2006; Howell, 2003). *In vitro* antagonism assays are a useful and reliable method for identifying the biocontrol potential of *Trichoderma* strains (Larralde *et al.*, 2008), mainly as a predictive tool to determine growth inhibition capability before carrying out time-consuming and more expensive studies (Lo, *et al.*, 1998). Under these premises, six wild *Trichoderma* spp. strains were identified to specie and their *in vitro* growth and antagonistic activity against *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich,

los cuales se utilizan principalmente como herramienta predictiva para determinar la capacidad de inhibición del crecimiento, antes de efectuar estudios que requieren más tiempo y costo económico (Lo *et al.*, 1998). Bajo estas premisas, seis cepas nativas de *Trichoderma* spp. fueron identificadas a nivel de especie y caracterizadas en cuanto a su tasa de crecimiento y actividad antagonista *in vitro* contra *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg) Hennebert y *Fusarium* sp. Link.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Las cepas de *Trichoderma* TC74 y TC74M, fueron aisladas de suelo de la rizosfera en un cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivado en Chihuahua, México. Las cepas T341, T359, T397 y T479 fueron aisladas del suelo de huertas comerciales de mango (*Mangifera indica* L.) en los Estados de Colima y Guerrero, México y fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro Michel-Aceves (Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, México). La cepa comercial *Trichoderma harzianum* Rifai (Th) (ProSelective™ 'Naturalmente Pureza', Durango, México), fue utilizada como testigo. La cepa T22 de *T. harzianum* (ATCC 20847) fue utilizada como referencia en las pruebas de antagonismo. Las cepas italianas de *B. cinerea* y *R. solani* se obtuvieron en el cepario del laboratorio de control biológico de la Universidad de Nápoles "Federico II" en Nápoles, Italia. Las cepas de *M. phaseolina* Mp1, Mp2, Mp3 y Mp4, *R. solani* (cepa mexicana) y *Fusarium* sp. fueron aisladas de raíces enfermas de chile en Chihuahua, México. *P. omnivora* fue aislada del suelo de una huerta de nogal pecanero (*Carya illinoensis* Wangenh. (Koch)) y fue proporcionada por el Dr. José Antonio Samaniego-Gaxiola, Campo Experimental La Laguna, del INIFAP, en Coahuila, México.

Identificación morfológica y molecular de las cepas. Los estudios se realizaron durante el año 2009. Las cepas de *Trichoderma* fueron crecidas en cajas petri con PDA para determinar las características de la colonia como; tamaño, morfología y conidiación (cómo se desarrollan y distribuyen las conidias, su maduración y color en el medio de cultivo) (Fig. 1). Adicionalmente, una suspensión de esporas fue inoculada en discos de PDA de 0.5 cm de diámetro, bajo un cubreobjetos, para ser incubada a 25 °C en una cámara húmeda durante 3-5 días. La morfología y patrón de distribución de los conidióforos, forma y color de las conidias, así como también la presencia de clamidosporas, fueron observados bajo el microscopio y comparados con la descripción hecha por Bisset (1991). La extracción de ADN, la PCR y la secuenciación para el análisis molecular fueron desarrollados de acuerdo a Komon-Zelazowska *et al.*, (2007). Conidias de cada cepa (10^6 100 ml⁻¹) fueron inoculadas en papa dextrosa agar y después de 3 días de crecimiento a 25 °C y agitadas a 150 rpm, el micelio fue recuperado, para después liofilizarlo y molerlo hasta obtener un polvo fino para el aislamiento del ADN. El ADN genómico fue aislado utilizando un mini juego (kit) QIAGEN DNeasy Plant. La amplificación de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8 del ARN

Rhizoctonia solani Kuhn, *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg) Hennebert y *Fusarium* sp. Link. were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. *Trichoderma* strains TC74 and TC74M, were isolated from rhizosphere soil of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in Chihuahua, Mexico. Strains, T341, T359, T397 and T479 were isolated from a mango (*Mangifera indica* L.) orchard soil, and were kindly provided by Dr. Alejandro Michel-Aceves (Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, México). A *Trichoderma harzianum* (Th) commercially available strain (ProSelective™ 'Naturalmente Pureza', Durango, México), was used as a control. Strain T22 of *T. harzianum* (ATCC 20847) was used as reference in the antagonism assays. Italian strains of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* Kuhn were obtained from the Biological Control Laboratory of Naples University "Federico II" collection. *M. phaseolina* (Tassi) Goidanich strains Mp1, Mp2, Mp3 and Mp4, *R. solani* Kuhn (Mexican strain) and *Fusarium* sp. Link were isolated from rotten roots of pepper in Chihuahua, Mexico, while *P. omnivora* (Dugg) Hennebert was isolated from soil of a pecan (*Carya illinoensis* Wangenh. (Koch)) orchard and was kindly provided by Dr. Jose Antonio Samaniego-Gaxiola, La Laguna Experimental Station, INIFAP, Coahuila, México.

Morphological and molecular strains characterization. These studies were carried out in 2009. The *Trichoderma* strains were grown in PDA Petri dishes to determine colony characteristics as size, morphology and conidiation (that is; how the conidia develops, matures and develops color). Additionally, a spore suspension was inoculated on 0.5 cm diameter PDA discs, under a cover glass, to be incubated at 25 °C in a humid chamber during 3-5 days. The branching pattern, morphology of conidiophores, conidia color and shape, as well as the presence of chlamydospores were observed under a light microscope and compared to Bisset (1991) descriptions. DNA extraction, PCR and sequencing for molecular analysis were carried out according to Komon-Zelazowska (2007). A brief description of these methodologies follows; conidia of each strain (10^6 100 ml⁻¹) were inoculated on potato dextrose agar and after 3 days of growth at 25 °C and 150 RPM shaking, mycelium was harvested, lyophilized and ground into a fine powder for DNA isolation. Genomic DNA was isolated using a QIAGEN DNeasy Plant mini kit. Amplification of ITS1 and ITS2 regions and the 5.8 rRNA gene was done by means of SR6R (5'-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3') and LR1 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3') primers. The PCR protocol consisted of the following cycles: 1 of 94°C during 2 min, 30 of 94°C during 30 seg, 30 of 50°C during 45 seg, 30 of 72°C for 1 min and 1 of 72 °C for 15 min. The PCR products were run on agarose gel for quantification and measurement specificity. Subsequently the products were sent to be sequenced to the POMOGEN Laboratory of Naples University. Sequences were edited with MEGA 3.1 software and analyzed by Blast.

Growth rate and antagonism characterization. For growth rate (GR) determination, one 8 mm-PDA disc

ribosomal, se realizó utilizando los iniciadores SR6R (5'-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3') y LR1 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3'). El procedimiento para la PCR consistió en los siguientes ciclos: 1 de 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 30 ciclos de 50 °C por 45 seg, 30 ciclos de 72 °C por 1 min y 1 ciclo de 72 °C por 15 min. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para la cuantificación y medida de la especificidad.

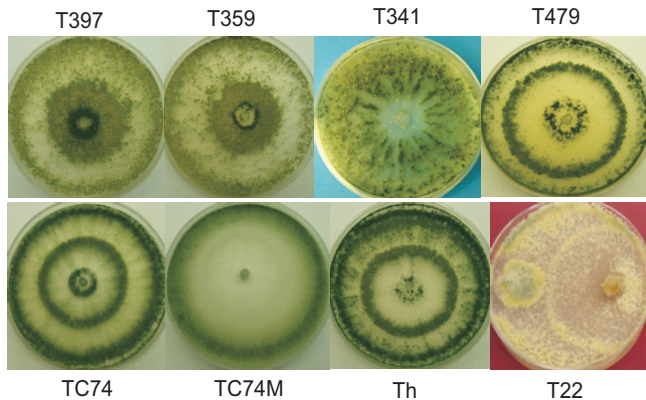


Fig. 1. Crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. en cajas de Petri con PDA. 2009.

Figure 1. Growth pattern of *Trichoderma* spp. strains on PDA Petri dishes. 2009.

Finalmente, los productos fueron enviados a secuenciar al Laboratorio POMOGEN de la Universidad de Nápoles "Federico II" en Nápoles, Italia. Las secuencias fueron alineadas con el software MEGA 3.1 y analizadas por medio del programa Blast.

Caracterización de la tasa de crecimiento y antagonismo.

Para la determinación de la tasa de crecimiento (TC), discos de PDA de 8 mm de diámetro conteniendo micelio de cada cepa fueron inoculados en el centro de cajas petri de 90 mm de diámetro, las cuales fueron incubadas a 25 °C hasta que el micelio de los hongos cubrió completamente la superficie de la caja petri. El crecimiento radial fue medido diariamente para calcular, al final del experimento, la tasa de crecimiento; $TC = (\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}) / \text{tiempo de incubación}$. El efecto antagónico de *Trichoderma* sobre los hongos patógenos fue determinado utilizando el método de cultivos duales (Larralde *et al.*, 2008), para ello en cajas petri con PDA se confrontaron antagonistas contra patógenos colocando frente a frente un disco de 8 mm de diámetro de micelio de cada uno de ellos separados 5 cm aproximadamente e incubándose a 25 ± 1 °C. El crecimiento de ambos hongos fue medido diariamente hasta que la confrontación fue terminada a las 120 h después de la inoculación, entonces la TC y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos (IC) fue calculado, considerando como un 100% de crecimiento el diámetro de la colonia del hongo patógeno cuando creció en ausencia de *Trichoderma*. En un primer ensayo, todas las cepas de *Trichoderma* fueron confrontadas contra las cepas italianas de *B. cinerea* y *R. solani*. Las cepas nativas que mostraron un antagonismo sobresaliente y mayor tasa de crecimiento

containing mycelium of every strain were inoculated in the center of a PDA Petri dishes (90 mm diameter) which were incubated at 25 °C until the fungi mycelium totally covered the dish surface. Radial growth was measured every day to calculate the GR at the end of the experiment according to: $GR = (\text{Final growth} - \text{Initial growth}) / \text{time of incubation}$. The antagonistic effect of *Trichoderma* on fungal pathogens was tested by the dual cultures method (Larralde *et al.*, 2008), to do this, on PDA Petri dishes, 5 cm apart, front to front antagonist and pathogen were confronted, using an 8 mm diameter PDA disc, which contained mycelium of each microorganism, to then be incubated at 25 ± 1 °C. The growth of both fungi was measured daily during 120 h after inoculation, when the confrontation was finished, then the GR and growth inhibition percentage (GI) were estimated, considering as 100% of growth, when the colony diameter of each pathogenic fungus grew in absence of *Trichoderma*. The first assay included all *Trichoderma* strains, which were confronted against Italian strains of *B. cinerea* and *R. solani*. As a result of the first assay, outstanding strains, based on antagonism and growth rate, were selected and in a second assay, their antagonism behavior was confirmed when confronted against the following fungi: *R. solani*, *P. omnivora* and *Fusarium* sp. as well as the strains of *M. phaseolina* Mp1, Mp2, Mp3 and Mp4. In all cases, the experiments were performed twice and the data were analyzed as a completely randomized design, with 3 replications. Percentage values were transformed by arcsine square root transformation before their statistical analysis. For the second antagonism assay, treatments to evaluate antagonism against *M. phaseolina* strains were arranged on a factorial 5 x 4 experimental design. Means were compared by Tukey test ($P=0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Strain identification. Colony characteristics for strains TC74, TC74M and T341, along with the branching pattern, morphology of conidiophores, conidia color and shape, were similar to the characteristics of *T. harzianum*; while the characteristics for strains T359 and T479 were similar to those described for *T. viride*. However, the PCR amplified products, 605 bp (Fig. 1), and the nucleotide sequence analysis done by Blastn, from each *Trichoderma* strain, showed a 99 to 100% with diverse *T. asperellum* sequences; nucleotide sequence analysis from the amplified products for T397 strain had a 99 to 100% with several *T. longibrachiatum* sequences. Table 1 show these results, including reference strains for each case. Due to the high homology obtained, it is considered that *T. asperellum* and *T. longibrachiatum* are the strains used in this work. DNA sequence analysis has resolved some questioning about several *Trichoderma* species and their corresponding biological activity (Druzhinina *et al.*, 2006). Characterization of this genus, traditionally based on morphological aspects, has changed to the use of molecular data, which includes a wide use of ITS 1, ITS 2 and ribosomal RNA 5.8S regions amplification (Maymon *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2005). Taxonomic classification of the strains used in the present work, is a key point, which will allow a better future

fueron seleccionadas para un segundo ensayo en el que su antagonismo fue confirmado confrontándolas contra otros microorganismos: *R. solani* (cepa mexicana), *P. omnivora*, *Fusarium* sp. y cuatro cepas de *M. phaseolina* Mp1, Mp2, Mp3 y Mp4. En todos los casos, los experimentos fueron realizados por duplicado y los datos analizados bajo un diseño completamente al azar, con tres repeticiones. Los porcentajes fueron transformados a arcoseno/raíz cuadrada antes de su análisis estadístico. Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ($P=0.05$). Para el segundo ensayo, los tratamientos para evaluar el antagonismo contra las cepas de *M. phaseolina* fueron analizados bajo un diseño factorial 5X4 y las medias fueron comparadas por Tukey ($P=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las cepas. Las cepas, TC74, TC74M y T341 desarrollaron colonias cuyas características, en conjunto con el patrón de ramificación y morfología de los conidióforos, color y forma de las conidias, fueron similares a las características de *T. harzianum*. Las cepas T359 y T479 mostraron características similares a las descritas para *T. viride*. Sin embargo, para las cepas TC74, TC74M, T341, T359 y T479, se obtuvieron mediante PCR productos amplificados de 605 bp, (Fig. 2), y el análisis de las secuencias de nucleótidos realizado mediante Blastn muestra una homología del 99 a 100% con diversas secuencias correspondientes a cepas de *T. asperellum*; el análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados de la cepa T397 presentó una homología del 99% al 100% con diferentes secuencias reportadas para *T. longibrachiatum*. En el Cuadro 1 se presentan estos resultados, así como cepas de referencia en cada caso. Debido a la alta homología obtenida, 99-100%, con la secuenciación genética, se considera que *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* son las especies utilizadas en este trabajo. El secuenciamiento del ADN ha resuelto diversas interrogantes sobre la identidad de las especies de *Trichoderma* y predecir su actividad biológica

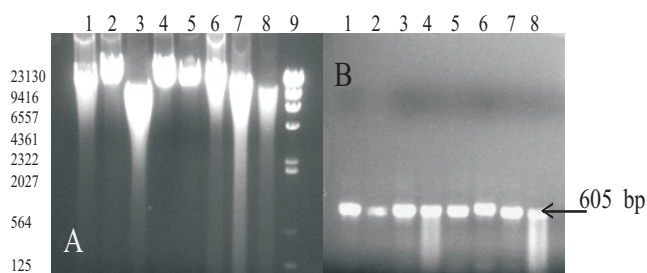


Fig. 2. Análisis del ADN (A) y de los productos amplificados mediante PCR (B) de diferentes *Trichoderma* spp. 1, TC74; 2, Th1; 3, Th; 4, T359; 5, T397; 6, T341; 7, T479; 8, TC74M; 9 Marcador de peso molecular Hind III. La cepa Th1 fue eliminada del estudio por sus características de crecimiento indeseable. Fig. 2. DNA (A) and PCR amplified products analysis (B) of different *Trichoderma* spp. strains. 1, TC74; 2, Th1; 3, Th; 4, T359; 5, T397; 6, T341; 7, T479; 8, TC74M; 9 Molecular weight marker Hind III. Strain Th1 was eliminated from the study due to growth characteristics.

experiment design, to evaluate biological activity under different growing conditions and their mode(s) of action. This information, will allow a better microorganism selection, which could be susceptible of a better use for plant pathogen control. Both, *T. asperellum* and *T. longibrachiatum*, have been reported as biocontrol agents for various plant pathogenic fungi (Howell, 2003; Verma *et al.*, 2007). However, *T. longibrachiatum* has been questioned, since its use could represent a serious danger for human health (Chouaki *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2007). *T. asperellum* was proposed as a new specie by Samuels *et al.*, (1999), and placed in the *T. viride* II subgroup, been confirmed by molecular methods by Lieckfeldt *et al.*, (1999). There are no reports as a phytopathogen for *T. asperellum* and it is considered a versatile antagonist (Watanabe, 2005), recognized for its antagonistic potential against phytopathogens (Sanz *et al.*, 2004; Segarra *et al.*, 2010). *T. asperellum* optimal growth temperature is between 27-30 °C, with a maximum of 35 °C (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2005), results which are in agreement with previous reports which used microcalorimetric methods and determined optimal temperatures for these strains at 30 °C, which also showed the ability to grow at 35 °C (Guigón *et al.*, 2010). *T. asperellum* biological activity has commonly been related to chitinolytic enzyme production (Viterbo *et al.*, 2002), β 1,3-glucanase and β 1,6-glucanase production (Bara *et al.*, 2003; Marcello *et al.*, 2010) celulas and proteases too (Sanz *et al.*, 2004). *T. asperellum* is also able to induce systemic resistance against foliar pathogens (Yeridia *et al.*, 2003) and to endophytically colonize small roots epidermis and exterior cortex (Shoresh *et al.*, 2005) or that of stems and leaves (Samuels, 2006). Future studies should be focused on hydrolytic enzymes produced by these strains and to determine its role on the antagonism against phytopathogen fungi.

Growth rate and antagonism characterization. All assays showed that plant pathogens growth was reduced during confrontation against *Trichoderma* strains. In the first assay the inhibition capacity against *R. solani* y *B. cinerea* growth was bigger for the *T. asperellum* strains than the *T. longibrachiatum* ones (Fig. 2). In several cases, mycelium of *T. longibrachiatum* was overgrown from that of *R. solani*. Pathogen growth is stopped when their mycelium is in contact with the antagonist *Trichoderma* isolate mycelium and was at this point in time when the capacity of the antagonist to overgrown mycelium of the pathogens was variable for each isolate (Fig. 2). *B. cinerea* showed high sensitivity to the antagonistic activity of all *Trichoderma* strains. *B. cinerea* mycelium growth was reduced more than 70%, with T22 and TC74 strains showing the highest mycelia growth inhibition (Tukey $P<0.05$). These same strains completely (100%) overgrown the pathogen mycelium in 96 h. *R. solani* mycelia growth was more resistant to *Trichoderma* strains antagonism, since its mycelia growth was reduced from 34% to 52%. In this case, the inhibitory effect of Th, T341 and TC74 strains was similar to that of T22 (Tukey $P<0.05$), however, overgrowth results showed significant differences (Tukey $P<0.05$). Only strain T22 completely (100%)

Cuadro 1. Identificación de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. por su morfología y por la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 2 y de la región 5.8S del ARN ribosomal. 2009.

Table 1. *Trichoderma* spp. strains identification by morphology and ITS (internal transcripts spacers) 1 and 2 and 5.8 S rRNA region amplification. 2009.

Cepa	Origen geográfico/ cultivo/año de colecta	Identificación		Homología (%)	Cepa de referencia
		Morfología	Amplificación		
Tc74	Chihuahua/ chile/2000	<i>T. harzianum</i>	<i>T. asperellum</i>	99-100	CNRA 361 (GenBank: EU598544.1)
T359	Guerrero/ mango/1998	<i>T. viride</i>	<i>T. asperellum</i>	100	GJS 05-328 (GenBank: GU198318.1)
T397	Colima/ mango/1998	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. longibrachiatum</i>	100	CECT 2412 (GenBank: EU401572.1)
T341	Guerrero/ mango/1998	<i>T. harzianum</i>	<i>T. asperellum</i>	100	DAOM 233975 (GenBank: EU280132.1)
T479	Guerrero/ mango/1998	<i>T. viride</i>	<i>T. asperellum</i>	100	GJS 05-199 (GenBank: GU198303.1)
TC74M	Chihuahua/ chile/2000	<i>T. harzianum</i>	<i>T. asperellum</i>	99-100	GJS 05-328 (GenBank: GU198318.1)

(Druzhinina *et al.*, 2006). La caracterización de este género, tradicionalmente basada en aspectos morfológicos, ha cambiado al uso de datos moleculares, dentro de los cuales la amplificación de las regiones ITS 1, ITS 2 y 5.8S del ARN ribosomal han sido ampliamente utilizados (Maymon *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2005). La ubicación taxonómica de las cepas en estudio es importante ya que representa el punto de partida que permitirá un mejor diseño de experimentos posteriores a fin de evaluar su actividad biológica bajo diferentes condiciones de crecimiento y determinar los mecanismos de acción que desarrollan. Esta información en conjunto permitirá una mejor selección de los organismos que pueden ser susceptibles de un mejor aprovechamiento en el biocontrol de patógenos de las plantas. Tanto *T. asperellum* como *T. longibrachiatum* han sido reportadas como agentes de biocontrol contra diferentes hongos fitopatógenos (Howell, 2003; Verma *et al.*, 2007), sin embargo la importancia de *T. longibrachiatum* ha sido cuestionada ya que su uso puede representar un serio peligro para la salud humana (Chouaki *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007).

overgrown pathogen mycelium at 120 h, followed by TC74, which had a 90% overgrowth. Most outstanding strains were those belonging to *T. asperellum*, TC74, T341 and T359, which grew better at 25 °C, completely covering PDA Petri dish surface. Growth rate results for all strains are shown in Table 2. Growth rate is a useful physiological tool to predict biocontrol ability of *Trichoderma* strains (Uzunovic y Webber, 1998), therefore, it is used as a first reference when characterizing new strains of this fungus (Hermosa *et al.*, 2000). Results for the second assay confirmed the antagonist activity of strains TC74, T341 and T359, which significantly inhibited the plant pathogenic fungi growth ($P < 0.01$), except in the case of *Fusarium* sp. growth ($P > 0.01$) (Table 2). Growth inhibition rates shown by these three strains over the different plant pathogens evaluated, ranged from 44% to 64%, even though there was no statistically significant differences among them (Tukey > 0.05). *Trichoderma* antagonism against *M. phaseolina* has been previously reported as a micoparasitism which reduces phytopathogen survival (Baird *et al.*, 2003).

T. asperellum fue propuesto como nueva especie por Samuels *et al.*, (1999) ubicada en el subgrupo II de *T. viride*, y fue confirmada molecularmente por Lieckfeldt *et al.*, (1999); no tiene reportes como agente fitopatógeno y es un antagonista versátil (Watanabe, 2005), reconocido por su potencial antagonista sobre patógenos de las plantas (Sanz *et al.*, 2004; Segarra *et al.*, 2010). Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 27–30°C con una máxima de 35 °C (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2005), lo cual coincide con estudios previos en que mediante técnicas microcalorimétricas se determinó que la temperatura óptima para estas cepas es 30°C y que también mostraron capacidad de crecer a 35 °C (Guigón *et al.*, 2010). Su actividad comúnmente se ha relacionado con la producción de enzimas quitinolíticas (Viterbo *et al.*, 2002), β 1,3-glucanasa y β 1,6-glucanasa (Bara *et al.*, 2003; Marcello *et al.*, 2010) celulasas y proteasas (Sanz *et al.*, 2004). También puede inducir resistencia sistémica contra patógenos foliares (Yeridia *et al.*, 2003) y colonizar endofíticamente epidermis y corteza exterior de las radículas (Shoresh *et al.*, 2005) o de tallos y hojas (Samuels, 2006). Futuros estudios deberán encaminarse a establecer el perfil de enzimas hidrolíticas que sintetizan estas cepas y determinar su participación en el desarrollo del antagonismo contra hongos fitopatógenos.

Caracterización de la tasa de crecimiento y antagonismo.

El crecimiento de los fitopatógenos se redujo, en todos los ensayos, durante su confrontación contra las cepas de *Trichoderma*. En el primer ensayo, las cepas de *T. asperellum* mostraron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *R. solani* y *B. cinerea* que *T. longibrachiatum* (Fig. 3). En algunos casos, el micelio de *T. longibrachiatum* fue sobrecrecido por el micelio de *R. solani*. El crecimiento del patógeno es detenido cuando el micelio de éste entra en contacto con el micelio de la cepa de *Trichoderma* y es en este punto cuando la capacidad del antagonista para sobrecrecer al patógeno fue variable para cada cepa (Fig. 3). *B. cinerea* mostró una alta sensibilidad al control ejercido por las cepas de *Trichoderma*. El crecimiento del micelio de *B. cinerea* fue reducido en más del 70%, sobresaliendo las cepas T22 y TC74 (Tukey $P < 0.05$). Estas mismas cepas sobrecrecieron al patógeno en un 100% en 96 h. La sensibilidad al control ejercido por las cepas de *Trichoderma* fue menor en *R. solani*, ya que su crecimiento micelial fue reducido en un 34% al 52%. En este caso, el efecto inhibitorio de las cepas Th, T341 y TC74 fue similar al de T22 (Tukey $P > 0.05$); sin embargo el sobrecrecimiento mostró diferencias más notorias (Tukey $P < 0.05$). T22 fue la única cepa capaz de sobrecrecer 100% al patógeno en 120 h, seguida de TC74 con 90%. Las cepas más sobresalientes fueron las pertenecientes a *T. asperellum* TC74, T341 y T359, las cuales crecieron mejor que el resto de las cepas a 25 °C, cubriendo completamente la superficie del PDA en las cajas Petri. La tasa de crecimiento de estas cepas se presenta en el Cuadro 2. La tasa de crecimiento es una herramienta fisiológica útil para predecir la habilidad de biocontrol de las cepas de *Trichoderma* (Uzunovic y Webber, 1998) por lo que es utilizada como una primera referencia al caracterizar cepas nuevas de este antagonista (Hermosa *et al.*,

There are also reports showing *in vitro* growth reduction of *M. phaseolina* ranging from 29 to 90%, when using *Trichoderma* sorghum isolates, and a growth reduction from 17 to 99% when using *Trichoderma* bean isolates (Larralde *et al.*, 2008). Antagonism of *Trichoderma* spp. against *R. solani* had been previously reported (Viterbo *et al.*, 2004; dos Reis *et al.*, 2007; Gallou *et al.*, 2009). Stefanova *et al.*, (1999) also report a 28% colony diameter reduction of this pathogen. *Trichoderma* strains have been reported as showing significant antagonism against *P. omnivora* by Kenerley *et al.* (1987) and Samaniego (2008). Antagonism against *Fusarium* sp. was not statistically significant, since the three strains showed a low growth inhibitory effect.

CONCLUSIONS

From the six *Trichoderma* strains evaluated, five of them belonged to *T. asperellum* and the sixth of them belonged to *T. longibrachiatum*. *T. asperellum* strains, TC74, T341 and T. 359, developed the highest *in vitro* growth rate and also showed the highest antagonistic activity against the plant pathogens *B. cinerea*, *R. solani*, *M. phaseolina* and *P. omnivora*.

LITERATURA CITADA

- Alabouvette, C., and Steinberg, C. 2006. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. pp. 123-144. In: Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T., (eds). An Ecological and Societal Approach to Biological Control, Springer, Netherlands.
- Baird, R. E., Watson, C. E., and Scruggs, M. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease* 87: 563-566.
- Bara, M. T. F., Lima, A. L., and Ulhoa, C. J. 2003. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 219: 81-85.
- Bisset, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* II. Section Pachybasium. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
- Chouaki, T., Lavarde, V., Lachaud, L., Racourt, C. P., and Hennequin, C. 2002. Invasive Infections Due to *Trichoderma* Species: Report of 2 Cases, Findings of *In Vitro* Susceptibility Testing, and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* 35: 1360-1367.
- dos Reis, A. F. B., Menezes, C. F., do Nascimento, S. R., Ulhoa, C. J. and Lopes L. A. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 29: 1189-1193.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., and Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55–64.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Gallou, A., Cranenbrouck, S., Declercq, S. 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato

Cuadro 2. Tasa de crecimiento de tres cepas sobresalientes de *T. asperellum* y su capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos. 2009.

Table 2. *T. asperellum* strains growth rate and their capacity for plant pathogen growth inhibition. 2009.

Cepa	Tasa de crecimiento ^z (mm/d) Media/Max	Crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos (mm)						
		<i>M. phaseolina</i>				<i>R. solani</i>	<i>P. omnivora</i>	<i>Fusarium</i> sp.
		Mp1	Mp2	Mp3	Mp4			
Tc74	17/28	28 a	28 a	30 a	30 a	30 a	37 a	53 a
T341	12/22	30 a	30 a	33 a	33 a	33 a	36 a	50 a
T359	17/25	28 a	29 a	33 a	34 a	36 a	41 a	55 a
Control ^y		78 b	54 b	78 b	78 b	80 b	57 b	58 a

^yTestigo. Crecimiento del fitopatógeno en ausencia del antagonista; por columna valores con diferente literal difieren estadísticamente (Tukey $P < 0.05$). ^zTasa de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en PDA y a 25°C.

2000). Durante el segundo ensayo, fue posible confirmar la actividad antagónica de las cepas TC74, T341 y T359 las cuales inhibieron significativamente el crecimiento de los hongos fitopatógenos ($P < 0.01$), excepto en el caso de *Fusarium* sp. ($P > 0.01$) (Cuadro 2). El grado de inhibición ejercido por las tres cepas sobre el crecimiento de los diferentes hongos fitopatógenos varió de 44% a 64%, aunque las diferencias entre ellas no fueron significativas estadísticamente (Tukey > 0.05). El antagonismo que ejerce *Trichoderma* spp. contra *M. phaseolina* ha sido previamente reportado como micoparasitismo que reduce la supervivencia del fitopatógeno (Baird *et al.*, 2003), del mismo modo se han reportado reducciones en la tasa de crecimiento de *M. phaseolina in vitro* que van de 29 a 90% con aislados provenientes de sorgo y de 17 a 99% con aislados provenientes de frijol (Larralde *et al.*, 2008). Asimismo la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* ha sido reportada (Viterbo *et al.*, 2004; dos Reis *et al.*, 2007; Gallou *et al.*, 2009); Stefanova *et al.*, (1999) reportan reducciones en el diámetro de las colonias de este patógeno del 28%. Contra *P. omnivora*, Kenerley *et al.*, (1987) y Samaniego (2008) han reportado actividad antagónica importante. El antagonismo contra *Fusarium* sp. no fue significativo, ya que las tres cepas mostraron un bajo efecto inhibitorio sobre el crecimiento.

CONCLUSIONES De las seis cepas evaluadas de *Trichoderma* spp., cinco de ellas corresponden a *T. asperellum* y la restante a *T. longibrachiatum*. Las cepas de *T. asperellum*, TC74, T341 y T359, desarrollaron la mayor tasa de crecimiento *in vitro* y mostraron la mayor capacidad antagónica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *R. solani*, *M. phaseolina* y *P. omnivora*.

plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology 124:219–230.

Guigón-López, C., Carvajal-Millán, E., Ponce de León-Renova, N., Vargas-Albores, F., Bravo-Luna, L., and Guerrero-Prieto, V. M. 2010. Microcalorimetric

measurement of *Trichoderma* spp. growth at different temperaturas. Thermochimica Acta 509: 40–45.

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

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied Environmental Microbiology 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 Disease 87: 4-10.

Kenerley, C.M., Jeger, M.J., Zuberer, D.A. and Jones, R.W. 1987. Populations of fungi associated with sclerotia of *Phymatotrichum omnivorum* buried in Houston black clay. Transactions of the British Mycological Society 89: 437-445.

Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P., and Druzhinina, I. S. 2007. Genetically Closely Related but Phenotypically Divergent *Trichoderma* Species Cause Green Mold Disease in Oyster Mushroom. Applied and Environmental Microbiology 73: 7415–7426.

Kullnig, C. M., Krupica, T., Woo, S. L., Mach, R. L., Rey, M., Benitez, T., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycological Research 105: 769-772.

Larralde, C. C., Santiago, M. R., Sifuentes, R.A., Rodríguez, L. I., Rodríguez, P. M., Shirai, K., and Narváez, Z. J. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. Applied Microbiology and Biotechnology 80: 167-177.

Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Nirenberg, H.I., Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? Applied Environmental Microbiology 65:2418–2428.

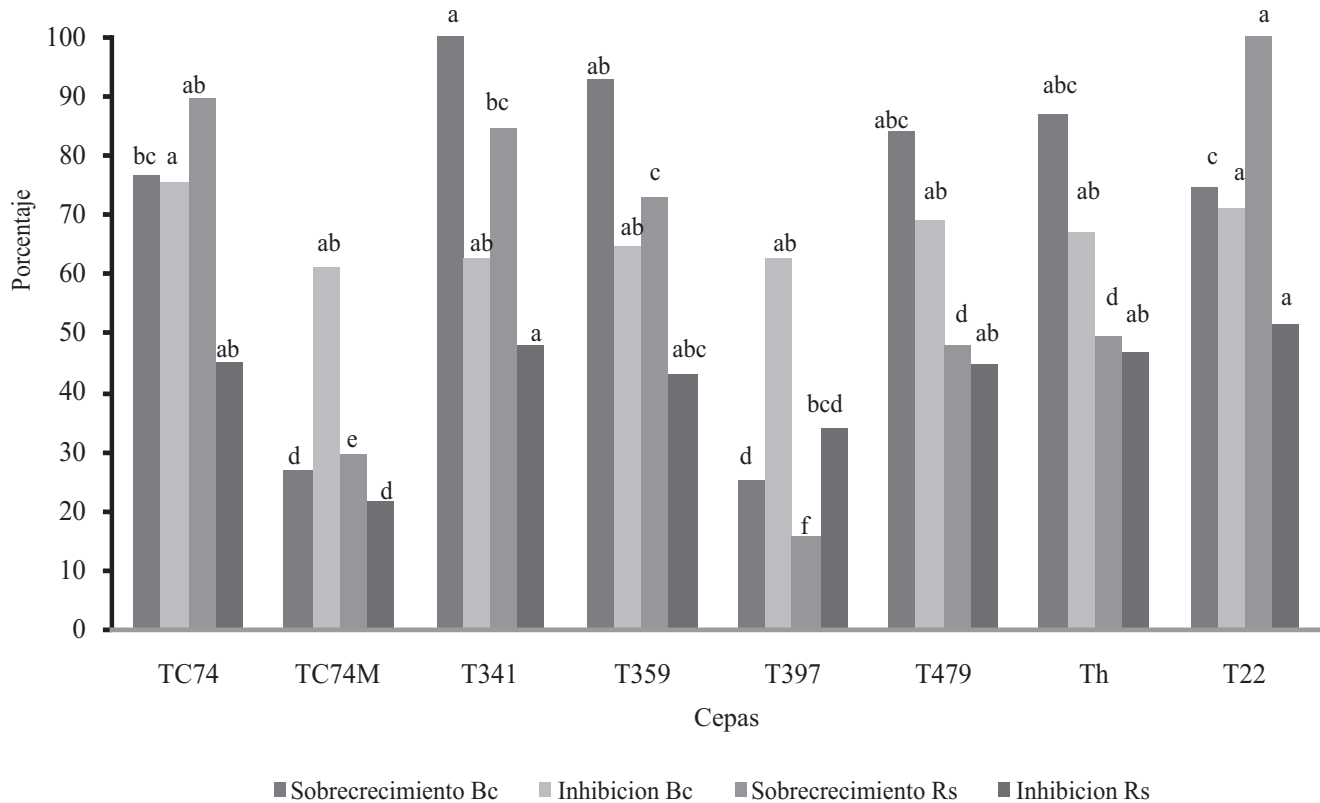


Fig. 3. Sobrecrecimiento e inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* (Bc) y *Rhizoctonia solani* (Rs), por el efecto de cepas de *Trichoderma* spp.

Fig. 3. *Trichoderma* spp. strains inhibition on overgrowth and mycelium growth of *Botrytis cinerea* (Bc) and *Rhizoctonia solani* (Rs).

- Lo, C. T., Nelson, E. B., Hayes, C. K., and Harman, G. E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88: 129-136.
- Marcello, C. M., Steindorff, A. S., Silva, S. P., Silva, R. N., Mendes, B. L. A., Ulhoa, C. J. 2010. Expression analysis of the exo-b-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165: 75-81.
- Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y. and Freeman, S. 2004. Identification of *Trichoderma* Biocontrol Isolates to Clades According to ap-PCR and ITS Sequence Analyses. *Phytoparasitica* 32:370-375.
- Samaniego, G. J. A. 2008. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg) Hennebert expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 32-39.
- Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology* 96: 195-206.
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E., Nirenberg, H. I. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51:71-88.
- Morales, G., and Sanchez-Arizpe, A. 2008. NOTE: *In Vitro* antagonism of actinomycetes isolated from fungus-growing ants against plant pathogenic fungi. *Phytoparasitica* 36: 322-325.
- Sánchez, V., Rebolledo, O., Picaso, R. M., Cárdenas, E., Córdova, J., González, O. and Samuels, G. J. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia* 163: 49-58
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., R. Hermosa, E. Monte. 2004. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics* 46: 277-286.
- Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., Trillas, I. 2010. *Trichoderma asperellum* Strain T34 Controls Fusarium Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron. *Microbial ecology* 59:141-149.
- Shores, M., Yedidia, I., and Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95:76-84.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L. and M. F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista*

- de la Facultad de Agronomía. (LUZ) 16: 509-516.
- Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widmer, T., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D., Hebbar, K.P. 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control* 43: 202–212.
- Uzunovic, A. and Webber, J. F. 1998. Comparison of bluestain fungi grown *in vitro* and in fresh cut pine biiiets. *European Journal of Forestal Pathology*. 28: 323-334.
- Verma M., Brar S. K., Tyag, R.D., Surampalli, R.Y., Valero, J.R. 2007. Review: Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.
- Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. and Chet, I. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). *Current Genetics* 42: 114–122.
- Viterbo, A., Harel, M., Chet, I. 2004. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiology Letters* 238: 151–158.
- Watanabe, S., Kumakura, K., Kato, H., Iyozumi, H., Togawa, M., and Nagayama, K. 2005. Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seedborne pathogens of rice. *Journal of General Plant Pathology* 71: 351–356.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7343–7353.