



Artículo Científico

Inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* causante de antracnosis de café (*Coffea arabica*) por cepas nativas de *Trichoderma*

Abimael Rubio-Sosa, ¹TecNM-Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. ITVO. Ex Hacienda de Nazareno Santa Cruz Xoxocotlán, CP 71230, Oaxaca, México; **Misael Martínez-Bolaños**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km. 18 carretera Tapachula-Cachoatán, Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Tapachula, C.P. 30870, Chiapas, México; **Juan Florencio Gómez-Leyva**, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 carretera a San Miguel Cuyutlán, CP 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México; ¹**Salvador Lozano-Trejo***, ¹**Ernesto Castañeda-Hidalgo**, ¹**Gustavo Omar Díaz-Zorrilla**.

***Autor de Correspondencia:**
Salvador Lozano Trejo
salvador.lt@voaxaca.tecnm.mx

Sección:
Edición periódica

Revisión:
30 Agosto, 2024
Aceptado:
04 Marzo, 2025
Publicado:
26 Marzo, 2025

Cita:
Rubio-Sosa A, Martínez-Bolaños M, Gómez-Leyva JF, Lozano-Trejo S, et al. 2025. Inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* causante de antracnosis de café (*Coffea arabica*) por cepas nativas de *Trichoderma*. Revista Mexicana de Fitopatología 43(2): 58.
<https://doi.org/10.18781/R.ME.X.FIT.2307-1>



RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar cepas nativas de *Trichoderma* provenientes de cultivos orgánicos de café arábica (*Coffea arabica*) en el estado de Oaxaca, así como evaluar su potencial de biocontrol *in vitro* contra *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis.

Materiales y Métodos. Se colectaron muestras de suelo y material vegetativo de parcelas de plantas de café, a partir de las cuales se aislaron cepas de hongos correspondientes al género *Trichoderma* y *Colletotrichum*. Se realizó la caracterización macroscópica, microscópica y se evaluó la tasa de crecimiento de cada uno de los aislamientos. Finalmente se realizó la caracterización molecular mediante secuenciación de la región ITS de RNAr. Para evaluar el potencial de biocontrol se hicieron pruebas de antagonismo entre las cepas de los dos géneros.

Resultados. Se identificaron siete especies diferentes: *T. harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. sulphureum*, *T. tomentosum*, *T. koningii*, *T. spirale* y *T. lentiforme*. Estos últimos fueron los más abundantes. De ellos, se seleccionó y evaluó a *T. lentiforme* en su capacidad de inhibición *in vitro* contra tres especies de *Colletotrichum*. Se observó que es capaz de inhibir entre 20 y 80% el crecimiento del hongo.

Conclusión. Se destaca el potencial de *Trichoderma* como biocontrolador sobre *Colletotrichum* actuando de diferentes maneras ante este fitopatógeno. Esto, aporta al conocimiento sobre la diversidad de *Trichoderma* nativos de la región cafetalera del estado de Oaxaca. Además, esta comprensión más profunda, contribuye a enriquecer el conocimiento y a elegir dichas especies para futuros estudios en el biocontrol de fitopatógenos, con el fin de promover prácticas agrícolas sostenibles.

Palabras clave: Antagonista, antracnosis, control biológico, ITS.

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica*) se cultiva en más de 80 países de América Latina, África y Asia (Coutiño *et al.*, 2017). En México se introdujo alrededor de 1790 (Medina-Meléndez *et al.*, 2016), convirtiéndose en una actividad de gran relevancia en términos de producción, valor comercial, económico y social (Santiago-Santiago, 2020). Oaxaca es uno de los principales estados productores de café y pionero en la producción de café orgánico (Valkila, 2009); por lo que la aplicación de bioinoculantes con propiedades de control biológico es una de las máximas prioridades en la producción agrícola limpia y sostenible (Vu y Tran, 2020).

Trichoderma es un hongo cosmopolita (Herrera-Parra *et al.*, 2017), incluye más de 100 especies (Savín-Molina *et al.*, 2021) y algunas de ellas se han estudiado para su uso como agentes de control biológico (BCA) contra patógenos de plantas (Kannangara y Dharmarathna, 2017), incluyendo contra *Hemileia vastatrix*, causante de la roya del cafeto (Gomez-De La Cruz *et al.*, 2017). La importancia de este género radica en que algunas especies colonizan las raíces (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), donde compiten por espacio y nutrientes (Savín-Molina *et al.*, 2021), promueven el crecimiento de las plantas e inducen resistencia sistémica (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019); además, producen metabolitos secundarios que protegen las plantas contra hongos fitopatógenos a través de mecanismos que incluyen antibiosis y micoparasitismo (Yassin *et al.*, 2022). Por otro lado, la antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es una de las enfermedades más comunes e importantes en el cultivo de café, debido a que causa pérdidas económicas importantes (Luo *et al.*, 2015).

A pesar de que *Trichoderma* se ha evaluado durante más de 70 años como antagonista, su comercialización como biocontrolador agrícola se inició a principios del siglo XXI (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). Existen estudios donde se ha utilizado como antagonista ante *Colletotrichum* en diferentes cultivos de interés económico como maracuyá (*Passiflora edulis*) (Niño y Mogollón, 2018), mango (*Mangifera indica*) (Díaz-Medina *et al.*, 2019), fresa (*Fragaria* × *ananassa*) (Morales-Mora *et al.*, 2020), entre otros. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto antagonista de *Trichoderma* ante *Colletotrichum* en plantaciones de café. Por otro lado, Arias-Mota y Heredia-Abarca (2022), menciona que *Trichoderma* es una opción de control biológico amigable con el ambiente, además de contribuir al mantenimiento de cultivos orgánicos. Por lo que el objetivo del estudio fue caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Oaxaca y evaluar su potencial de biocontrol contra *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en plantas de café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aislamientos de *Colletotrichum* y *Trichoderma*. Muestras de suelo se colectaron de parcelas de café arábico con manejo orgánico en los municipios San Bartolomé Loxicha, San Agustín Loxicha y Aguacate Loxicha del estado de Oaxaca. Los muestreos se realizaron mediante la metodología cinco de oros para completar una muestra compuesta de 100 g de suelo por sitio de estudio (un sitio por municipio). En laboratorio, las muestras se procesaron por el método de dilución de suelo en cajas Petri siguiendo la metodología de Waksman (1927). A partir de una solución madre (10 mL

agua destilada estéril: 1 g suelo) se obtuvo la dilución de 10^{-2} , de la cual se tomó una alícuota de 0.1 mL y se esparció uniformemente sobre cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA). Las placas se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) por 72 h y posteriormente, se cuantificó el número de colonias fúngicas formadas (15). De cada una de las placas se aislaron colonias fúngicas (12) individuales para observar su morfología colonial y formación de estructuras reproductivas, las cuales permitieron identificar a nivel género (Barnett y Hunter, 1998). Los aislamientos con morfología similar a *Trichoderma* se purificaron por punta de hifa en PDA. Finalmente, los aislamientos, se conservaron en glicerol hasta su proceso de reactivación.

En forma paralela, en plantaciones comerciales de café arábico orgánico en Oaxaca (Municipio de San Agustín Loxicha) y Chiapas (Municipio de Unión Juárez), se colectaron frutos y hojas de café arábico variedad Bourbon con síntomas de antracnosis los cuales mostraban necrosis en sus tejidos. En laboratorio se cortaron dos fragmentos (1 cm²) del tejido enfermo de cada muestra, se esterilizaron con NaOCl al 1.5% durante 1 min, posteriormente se hizo triple lavado en agua destilada estéril y finalmente se secó en papel estéril. Los tejidos se incubaron en PDA a 25 °C durante 48 h; las colonias fúngicas desarrolladas se transfirieron a nuevas placas de PDA para generar estructuras de reproducción que permitieron la identificación a género (Cao *et al.*, 2019; Hassan *et al.*, 2018; Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017). Del total de aislamientos obtenidos (11), para fines del presente estudio se seleccionaron (tres) aquellos aislamientos con morfología similar a *Colletotrichum* y que mostraron mayor tasa de crecimiento y mayor producción de conidios producidos por área de crecimiento micelial.

Caracterización macroscópica. Los aislamientos fúngicos seleccionados se reactivaron en PDA; luego de un periodo de incubación (siete días), se utilizaron para describir la morfología colonial externa. Se consideraron características como: textura (algodonoso, plano) y color del micelio (blanco, verde), formación de anillos concéntricos (presencia, ausencia) (Granda-Mora *et al.*, 2020; García-Núñez *et al.*, 2017) y el color al reverso de las colonias (hialino, amarillo, café) (López-Calva *et al.*, 2018).

Caracterización microscópica. A partir de los aislamientos seleccionados tanto de *Trichoderma* como *Colletotrichum*, se realizaron preparaciones temporales con base glicerol y con un microscopio compuesto (Velab, modelo Ve-b2) a 40x y cámara digital (QUASAR) acoplada al microscopio, se fotografiaron esporas de cada uno de los aislamientos.

Para la observación de las fiálides de *Trichoderma*, se realizaron microcultivos de acuerdo con el método de Vu y Tran (2020); para ello, en condiciones asépticas, sobre un portaobjetos estéril se colocó un disco (5 mm de diámetro) de PDA y con una aguja entomológica se tomaron masas de conidias de las colonias purificadas y se depositaron sobre el portaobjetos; posteriormente se colocó un cubreobjetos estéril y la preparación se colocó dentro de una placa Petri que contenía papel estéril húmedo. Las muestras se incubaron durante 4 a 5 días a 25 °C. Posteriormente, se observaron al microscopio y se tomaron fotografías, con el fin de observar la forma de las estructuras. Para determinar el tamaño, con el programa AmScope se tomaron fotografías de grupos de conidias por cada aislamiento y de ellos se midió el largo y ancho de 100 conidias; finalmente se obtuvo el promedio de la población evaluada.

Tasa de crecimiento (TC). De cada aislamiento se tomó un disco de crecimiento micelial (5 mm de diámetro) y se transfirió al centro de una nueva caja Petri con PDA; posteriormente se incubaron a 25 °C y se tomaron medidas diametrales cada 24 h hasta que el micelio cubriera por completo la superficie de la caja. Al finalizar el experimento se calculó la TC utilizando la fórmula de Zadoks y Schein (1979).

Dónde: Cf= Crecimiento diametral final (mm); Ci= Crecimiento diametral inicial (mm); Tf= Tiempo final (días); Ti= Tiempo inicial (día uno).

Identificación molecular. Los aislamientos seleccionados se cultivaron en un medio líquido de papa sacarosa durante 7 días a temperatura ambiente (25 °C) y agitación continua. El ADN se extrajo del micelio de cada uno de los aislamientos, utilizando 1 g de micelio de acuerdo a la metodología modificada de Castle *et al.* (1998). La integridad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, la cual contenía 50 pM del ADN genómico, 10X Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM del mix dNTPs, 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa y 50 pM de los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Aljanabi y Martínez, 1997). El programa de amplificación, consistió en 1 ciclo de 94 °C por 6 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y un ciclo de 72 °C por 7 min y se procedió a visualizarla en un gel de agarosa al 1.2 % en una cámara de electroforesis (Bio-Rad®) a 100 V por 30 min. La purificación de ADN amplificado se llevó a cabo con un kit comercial (Zymoclean™), y la secuenciación se llevó a cabo siguiendo la metodología Sanger con la aplicación del kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, en un secuenciador ABI 3130.

Reconstrucción filogenética. El análisis bioinformático de las secuencias se realizó con el software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021) y se alinearon mediante el algoritmo de agrupación W. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de otras especies de *Trichoderma* incluidas en el GenBank utilizando la herramienta básica de búsqueda BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y las secuencias con mayor similitud se utilizaron para asignar la identificación de especie a cada cepa aislada. El árbol filogenético se ensambló empleando el método Bootstrap (1000 repeticiones), con secuencias obtenidas del GenBank y secuencias de identificación molecular referenciadas en el GeneBank de la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI).

Pruebas de antagonismo. Para determinar la capacidad antagónica de los aislamientos, se realizaron pruebas de confrontamientos duales; para ello, se empleó un diseño completamente aleatorizado. Se utilizaron tres aislamientos de *Trichoderma* (T13, T14 y T15; con mayor TC y conidios observados), y tres aislamientos de *Colletotrichum* (112,108 y Z1), cada confrontamiento se repitió tres veces. En placas Petri de 90 mm de diámetro con PDA, se colocó un disco de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* (previamente crecido en PDA por cinco días) en un extremo de la caja y en el extremo equidistante un disco de micelio (previamente crecido en PDA por cinco días) de 5 mm de diámetro con *Colletotrichum*, para ello se depositaron primero los discos de *Colletotrichum* y cuatro días después los de *Trichoderma*. Las cajas se incubaron a 25 °C y el crecimiento radial

se registró cada 24 h para evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2007).

$$PICR\% = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) 100$$

Dónde: PICR= porcentaje de inhibición de crecimiento radial; R1= crecimiento radial (mm) del patógeno sin *Trichoderma* spp. R2= crecimiento radial (mm) del hongo con *Trichoderma* spp.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad y se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Dichos datos se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.0 para Windows. A excepción de la TC los datos obtenidos se transformaron a raíz cuadrada +1 para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad (Toutenburg y Shalabh, 2009), similar a lo realizado por Savín-Molina *et al.* (2021).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización macroscópica. Se caracterizaron 12 aislamientos de *Trichoderma*, de las cuales el 41.6% presentó una colonia color verde (T2, T6, T13, T14 y T15) y el 58.4% mostró tonalidad blanca (T3, T4, T5, T7, T9, T10 y T12); el 50% desarrolló micelio plano (T2, T5, T6 T13, T14 y T15) y el otro 50% micelio algodonoso (T3, T4, T7, T9, T10 y T12); el 50% no presentó anillos concéntricos (T2, T3, T4, T5, T9 y T10), el 8.4% un anillo concéntrico (T7), el 25% dos anillos concéntricos (T6, T12 y T13) y el 16.6% restante presentaron tres anillos (T14 y T15). Arias-Mota y Heredia-Abarca (2022) mencionan que de 438 especies de *Trichoderma* descritas a nivel mundial, 30 han sido registradas asociadas a plantas de café, todas con heterogeneidad en sus características morfológicas; por ello Hermosa *et al.* (2000) resalta la importancia de realizar estudios moleculares para tener un análisis con mayor certeza taxonómica. Las cepas T2, T4, T5, T6 y T12 presentaron micelio hialino (41.6%); las cepas T3, T7, T9 y T10 mostraron tonos de color amarillo (33.4%) y las cepas T13, T14 y T15 tuvieron tonalidades de color café (25%) (Figura 1). La coloración de los aislamientos puede estar influenciada por antraquinonas, los cuales son los pigmentos fúngicos naturales más abundantes que dan color a las estructuras de desarrollo (Yu y Keller 2005). La cepa T6 presentó aroma intenso a coco (8.4%) y puede estar asociada a la presencia de 6-penta-alfa-pirona, la cual ha sido reportada para *T. harzianum* (Rocha-Valdez *et al.*, 2005). Con respecto a los aislamientos de *Colletotrichum*, los aislamientos Z1 y 112 presentaron colonia color blanco y el aislamiento 108 presentó color gris; todos los aislamientos presentaron forma circular; con respecto al micelio algodonoso se presentó en Z1 y 112; y plano en 108; la coloración del micelio fue blanco en Z1 y 112, y gris en 108 (Figura 2).

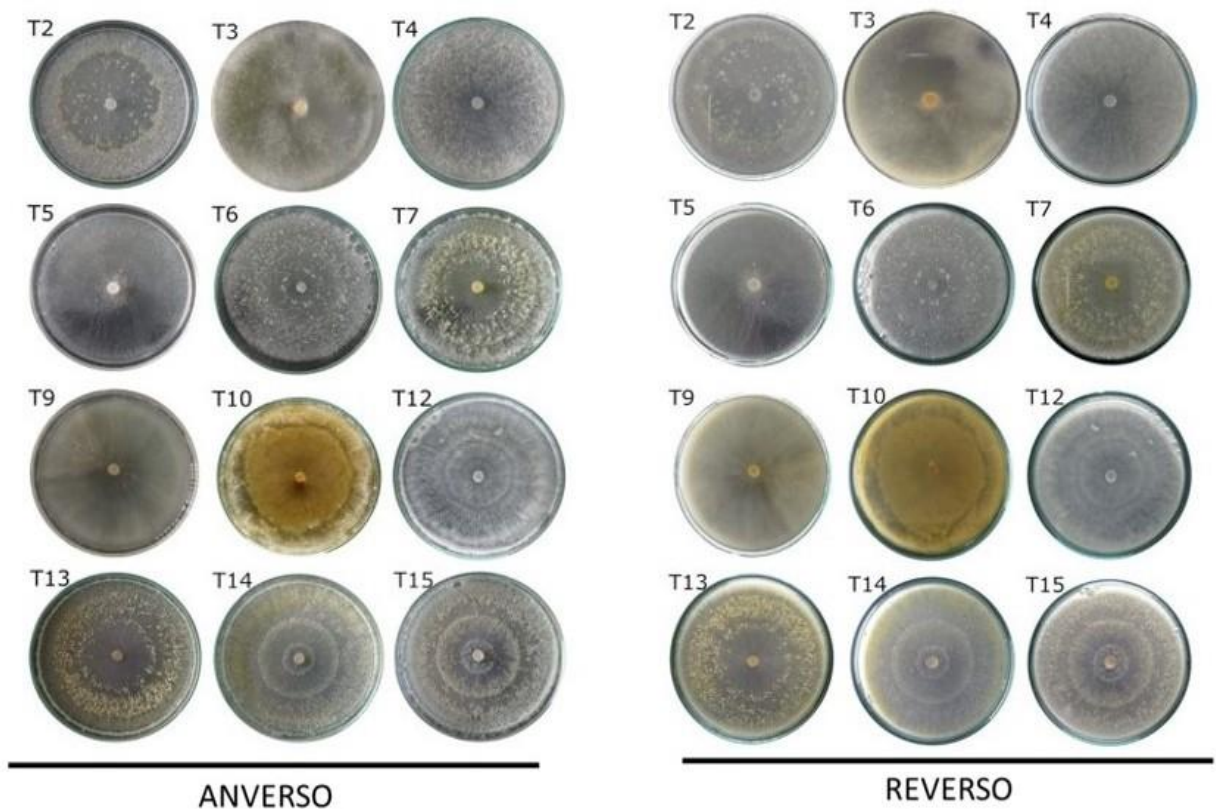


Figura 1. Caracterización macroscópica de 12 aislamientos de *Trichoderma* en PDA.



Figura 2. Caracterización macroscópica de tres aislamientos de *Colletotrichum* en PDA.

Caracterización microscópica. De los 12 aislamientos de *Trichoderma*, el 33.4% presentaron conidios de forma subglobosa (T2, T4, T7 y T12); 25% mostraron forma elipsooidal (T5, T6 y T9) y 25% conidios de forma globosa (T13, T14 y T15). El tamaño de los conidios osciló entre 7.91-10.21 μm de largo y de 6.65-7.83 μm de ancho (Cuadro 1). Todas las cepas produjeron cantidades similares de conidios, lo cual es atribuible a su desarrollo en condiciones ambientales homogéneas (Osorio-Concepción *et al.*, 2013); sin embargo, existieron cepas que no produjeron conidios, esto puede deberse a su condición

genética (Martínez *et al.*, 2013). Harman (1990) menciona que los aislados pertenecientes a la misma especie difieren en la producción de estructuras fúngicas durante la multiplicación, incluso en el mismo medio de cultivo, lo que denotaría la presencia de diferentes subespecies o ecotipos. Los aislamientos obtenidos y seleccionados a partir de tejidos de café con síntomas de antracnosis, presentaron conidios de forma ovoide con un largo entre 10.3 - 13.3 μm y ancho entre 3.3 - 4.5 μm . Estas características, junto con las variables de tasa de crecimiento, color de colonia y forma de los apresorios, se utilizan para diferenciar especies de *Colletotrichum* (Hu *et al.*, 2015; Hyde *et al.*, 2009). Otro criterio utilizado para separar o agrupar posibles especies, se basa principalmente en su planta hospedera (Cano *et al.*, 2004). Sin embargo, de 39 especies reportadas por Sutton (1992) dentro de este género, el autor señala que su separación o reconocimiento entre especies no es del todo claro, pero permite dar un acercamiento a su identificación.

Cuadro 1. Caracterización y tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp.

Cepa ^z	Forma	Conidios		Tasa de crecimiento			
		Largo (μm)	Ancho (μm)				
<i>T. sulphureum</i> (T4)	Subglobosa	9.89	7.14	2.95	±	0.09	a
<i>T. lentiforme</i> (T15)	Globosa	8.64	7.07	2.66	±	0.38	a
<i>T. sulphureum</i> (T5)	Elipsoidal	9.93	7.51	2.60	±	0.30	a
<i>T. spirale</i> (T3)	ND	ND	ND	2.51	±	0.06	ab
<i>T. harzianum</i> (T7)	Subglobosa	8.05	6.69	2.45	±	0.06	abc
<i>T. lentiforme</i> (T13)	Globosa	7.91	6.71	2.31	±	0.01	abcd
<i>T. lentiforme</i> (T14)	Globosa	8.22	6.92	2.30	±	0.01	abcd
<i>T. koningii</i> (T6)	Elipsoidal	9.53	7.83	2.28	±	0.06	abcd
<i>T. spirale</i> (T9)	Elipsoidal	10.22	6.66	2.23	±	0.04	abcd
<i>T. pleuroticola</i> (T2)	Subglobosa	9.06	7.72	1.78	±	0.01	bcd
<i>T. tomentosum</i> (T12)	Subglobosa	9.84	7.5	1.74	±	0.01	dc
<i>T. spirale</i> (T10)	ND	ND	ND	1.69	±	0.02	dc

^zDeterminada por secuenciación de la región ITS del rDNA. ND. No determinada. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

Tasa de crecimiento (TC). Dentro de los aislamientos correspondientes al género *Trichoderma*, los que mostraron mayor velocidad de crecimiento significativa fueron T4, T5 y T15 (Tukey, 0.05). El aislamiento T4 tuvo un mayor crecimiento diametral con 1.3 mm día⁻¹ de diferencia con respecto al aislamiento T10 que tuvo menor crecimiento diametral del total de los aislamientos (Cuadro 1).

El crecimiento acelerado es característico de *Trichoderma* spp. lo que permite competir por espacio y nutrientes (Sánchez *et al.*, 2015). Por lo tanto, la TC es una herramienta fisiológica útil para predecir la habilidad de biocontrol de nuevos aislamientos de *Trichoderma* spp. (Uzunovic y Webber, 1998).

Con respecto a la tasa de crecimiento de *Colletotrichum*, el aislamiento Z1 presentó valores significativamente diferentes (Tukey, 0.05) con respecto al aislamiento 108 y 112, puesto que el aislamiento Z1 cubrió la placa Petri de 9 cm de diámetro en siete días, en comparación con los aislamientos 108 y 112 que alcanzaron su máximo crecimiento hasta los 11 días después de la inoculación.

Identificación molecular. En el presente estudio, los productos obtenidos de la amplificación tuvieron un tamaño promedio de 620 pb (Figura 3A). Al comparar las secuencias con la base de datos del GeneBank, se determinó un porcentaje de identidad que oscilaron entre 98.62 y 99.99 % con las especies identificadas (Cuadro 1) como: *Trichoderma harzianum* (T7), *T. spirale* (T3, T9 y T10), *T. lentiforme* (T13, T14 y T15), *T. pleuroticola* (T2), *T. sulphureum* (T4 y T5), *T. tomentosum* (T12) y *T. koningii* (T6). *T. koningii* y *T. harzianum* se han reportado asociadas a sistemas agroforestales de café (Belayneh-Mulaw *et al.*, 2010). Ahedo-Quero *et al.* (2024) señalan 57 especies de *Trichoderma* reportadas en México, de las cuales 12 corresponden al cultivo de café, siendo el cultivo con mayor diversidad. Sin embargo, en esta investigación *T. lentiforme* y *T. sulphureum* se reportan por primera vez en México en suelos cafetaleros con manejo orgánico.

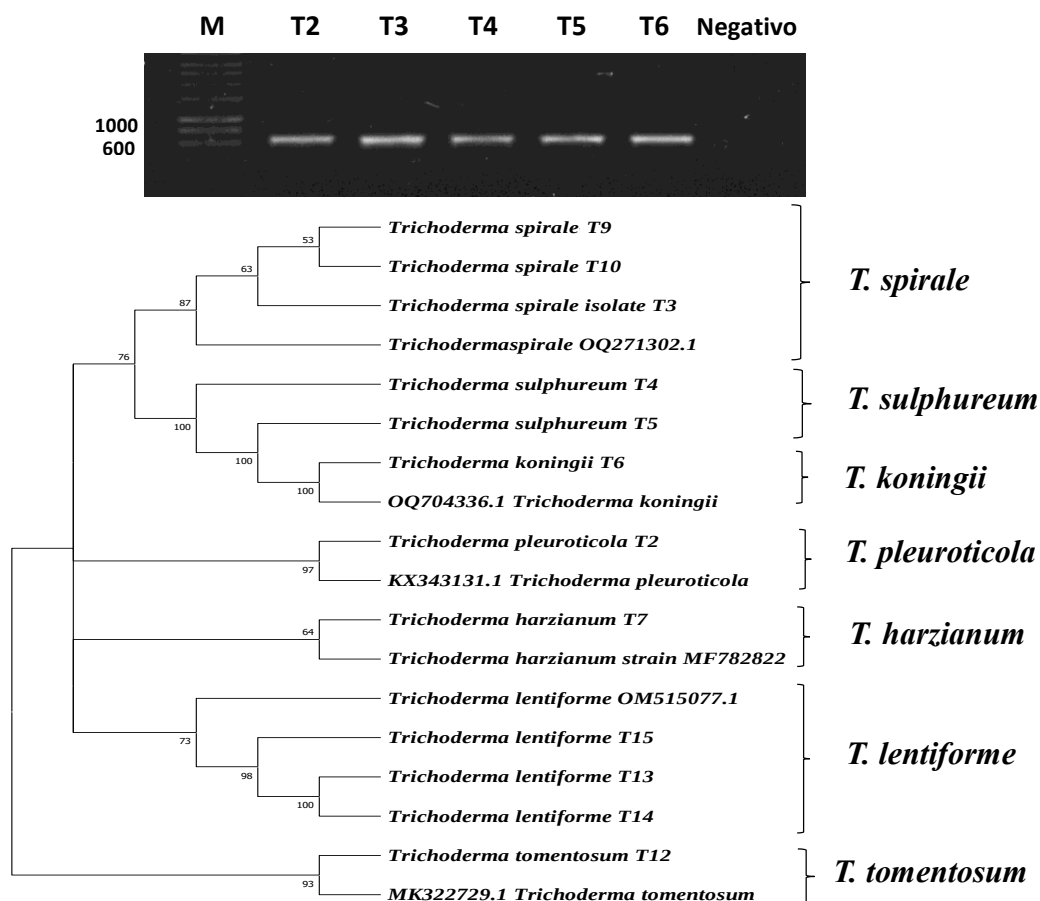


Figura 3. Árbol filogenético. A) Productos de amplificación por PCR de la región ITS del ADNr con los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 de aproximadamente 620 pb. B) Relación filogenética de 12 aislamientos de *Trichoderma* inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 58S y ITS2). Los números en los nodos representan el porcentaje del bootstrapping con 1,000 repeticiones.

Los marcadores moleculares desempeñan un papel crucial en la identificación molecular de *Trichoderma*, en nuestros resultados la secuencia de los espaciadores internos transcritos (ITS) fueron adecuados para diferenciar los diferentes aislados de *Trichoderma* lo que coincide con otros estudios para esta región del rRNA (Islam *et al.*, 2022). La topología del árbol filogenético fue generada empleando el método neighbor-joining con las secuencias de los aislamientos, se incluyó el número de acceso de la secuencia de referencia del GeneBank mayor al 98% de similitud. En el árbol generado se aprecian 7 grupos separados por especie (Figura 3B); además, se observa una relación intra específica en dos grupos predominantes con *T. spirale* (T3, T9 y T10) y *T. lentiforme* (T13, T14 y T15). Adicional al conocimiento de la diversidad de *Trichoderma*, este estudio es de interés por las aplicaciones biotecnológicas que puedan tener las cepas colectadas para el biocontrol de *Colletotrichum* sp.

La importancia del género *Trichoderma* como agente de control biológico implica mecanismos de acción como competencia por sustrato, micoparasitismo y antibiosis (Revilla-Medina *et al.*, 2020; Rolz Asturias *et al.*, 2013). Para la especie *T. spirale*, Baiyee *et al.* (2019) demostraron que su potencial como agente de biocontrol se debe a su competencia por espacio, los antifúngicos volátiles y las actividades enzimáticas. En un estudio reciente, Ye *et al.* (2023) indicaron que un compuesto extraído de *T. spirale*, tiene un fuerte efecto inhibidor sobre *Candida albicans*; por lo que la función de estos microorganismos no se limita al efecto en la salud y desarrollo de las plantas. *Trichoderma koningii* es una especie que gracias a su versatilidad funciona como biocontrol de fitopatógenos de suelos y foliares, obtenido entre un 70-100% de control bajo condiciones de invernadero (Nina *et al.*, 2011).

La caracterización molecular mostró que los tres aislamientos de *Colletotrichum* corresponden a diferentes especies: *C. gloeosporioides* (Z1), *C. siamense* (108) y *C. aenigma* (112) (Figura 4). Dos (*C. gloeosporioides* y *C. siamense*) de estas tres especies identificadas en el presente estudio fueron previamente reportadas en el cultivo de café arábico como patógenas y afectando hojas y/o frutos (Cristobal-Martínez *et al.*, 2016) en México; así como en Asia (Damm *et al.*, 2012) y Brasil (Prihastuti *et al.*, 2009). Mientras que *C. aenigma*, especie agrupada dentro del complejo *C. gloeosporioides*, no ha sido reportada en el cultivo de café arábico, por lo que podría considerarse el primer reporte de esta especie; sin embargo, debido a la complejidad para la identificación de especies de *Colletotrichum*, consideramos necesario realizar la caracterización molecular con el uso de secuencias multilocus adicionales a ITS (Cristobal-Martínez *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2023) para aseverar la identificación de esta especie.

Pruebas de antagonismo. La inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp., se observó en su mayoría al cuarto día de incubación; corroborando el rápido crecimiento de *Trichoderma* y su potencial para inhibir el crecimiento micelial del fitopatógeno (Fernández y Suárez, 2009). El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *C. siamense* (108) se observó al interaccionar con el aislamiento T15 de *Trichoderma* (Tukey, 0.05). En la interacción de las cepas de *Trichoderma* (T13, T14 y T15) con los aislamientos de *C. gloeosporioides* (Z1), *C. siamense* (108) y *C. aenigma* (112), se observó un cambio de color del medio de cultivo en la zona de interacción de los micelios de ambos microorganismos. Posteriormente las cepas de *Trichoderma* crecieron sobre el micelio de *Colletotrichum*; esta respuesta es un primer indicativo de su potencial como microorganismos hiperparásitos (Hernández-Mendoza *et al.*, 2011).

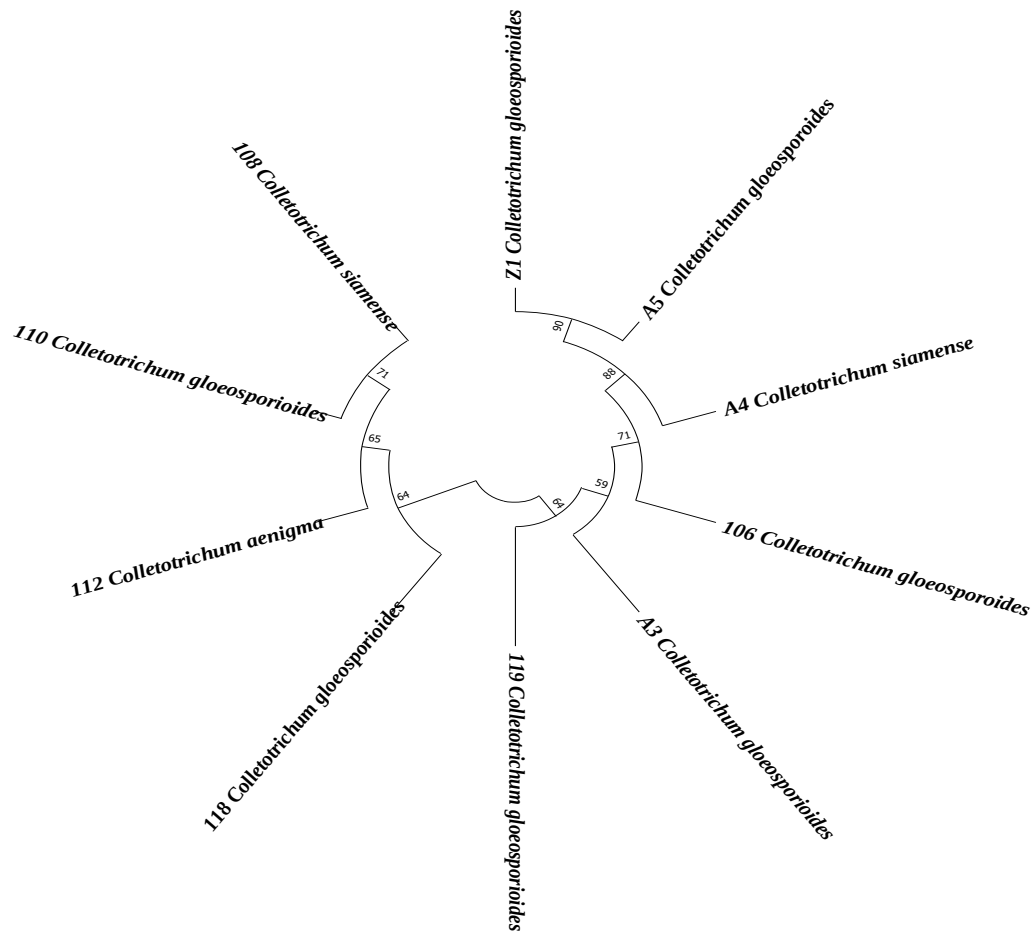


Figura 4. Dendrograma de relación filogenética de 10 aislamientos de *Colletotrichum*.

La esporulación de *Trichoderma* sobre el micelio de *Colletotrichum* se observó solamente en la interacción *T. lentiforme* (T14) - *C. siamense* (108). La capacidad antagonista de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum* ha sido reportada de manera previa (Morales-Mora *et al.*, 2020). En la Figura 5 se muestran las diferentes respuestas de inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos de *Colletotrichum* al evaluar nuestros aislamientos de *Trichoderma*. Esta inhibición del crecimiento se atribuye a la producción de metabolitos como quitinasas, glucanasas (Sánchez-García *et al.*, 2017) y a la secreción de antibióticos u otras sustancias inhibitoras que producen las cepas antagonicas (Al-Mekhlafi *et al.*, 2019).

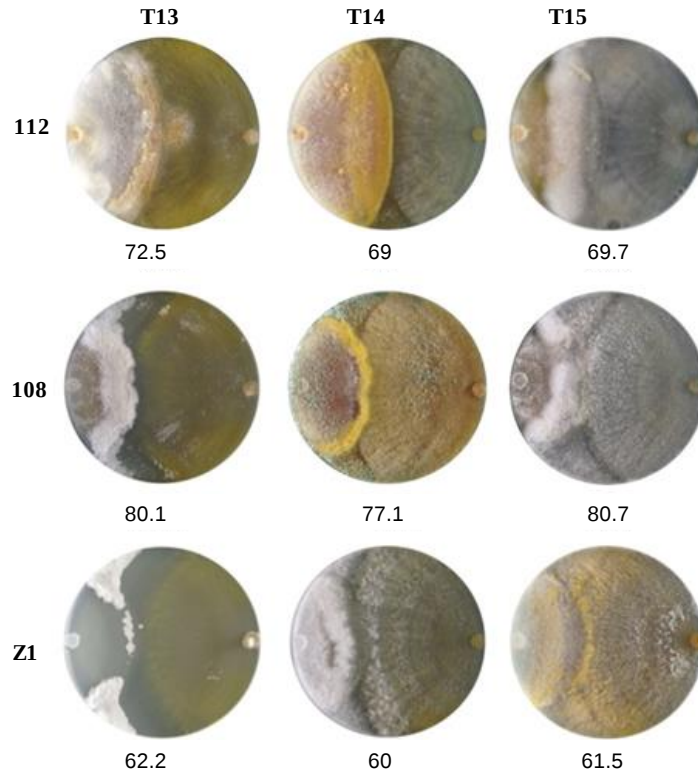


Figura 5. Confrontación dual entre cepas de *Trichoderma* spp. (T13, T14 y T15) y cepas de *Colletotrichum* spp. (Z1, 108 y 112). Números debajo de los aislamientos representa el PICR (porcentaje de inhibición de crecimiento radial).

CONCLUSIONES

Se identificaron siete especies de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. lentiforme*, *T. pleuroticola*, *T. sulphureum*, *T. tomentosum*, y *T. koningii*, las cuales se distinguieron por su rápido desarrollo mostrando el característico color verde del género y presentando anillos concéntricos en algunos aislamientos. Cabe destacar el potencial de *Trichoderma* como biocontrolador sobre *Colletotrichum* actuando de diferentes maneras ante este fitopatógeno. Esto, aporta al conocimiento sobre la diversidad de *Trichoderma* nativos de la región cafetalera del estado de Oaxaca. Además, esta comprensión más profunda, contribuye a enriquecer el conocimiento y a elegir dichas especies para futuros estudios en el biocontrol de fitopatógenos, con el fin de promover prácticas agrícolas sostenibles.

Conflictos de interés

No existen conflictos de interés.

Financiación

Para el desarrollo de este proyecto no hubo financiación externa, se realizó con los esfuerzos institucionales de investigación conjunta en acuerdos de colaboración académico científica.

Agradecimientos

Agradecemos a CONAHCYT por la beca otorgada para el investigador estudiante del posgrado. Igualmente, a los doctores involucrados en el estado de Oaxaca (ITVO/TECNM), Chiapas (INIFAP) y Jalisco (ITT/TECNM).

Contribución de los autores

Concepción, Abimael Rubio Sosa.; conceptualización, Misael Martínez Bolaños.; metodología, Abimael Rubio Sosa, Misael Martínez Bolaños; Validación, Misael Martínez Bolaños, Salvador Lozano Trejo, Ernesto Castañeda Hidalgo y Gustavo Omar Díaz Zorrilla.; análisis formal, Abimael Rubio Sosa, Misael Martínez Bolaños; investigación, Abimael Rubio Sosa.; curación de datos, Juan Florencio Gómez Leyva; redacción: preparación del borrador original, Abimael Rubio Sosa.; redacción: revisión y edición, Misael Martínez Bolaños. Salvador Lozano Trejo, Ernesto Castañeda Hidalgo; visualización, Misael Martínez Bolaños, Salvador Lozano Trejo; supervisión, Misael Martínez Bolaños, Salvador Lozano Trejo. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

REFERENCIAS

- Aljanabi SM and Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22):4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Al-Mekhlafi NA, Y-Abdullah Q, Al-Helali MF and Alghalibi SM. 2019. Antagonistic potential of native *Trichoderma* species against tomato fungal pathogens in Yemen. *International Journal of Molecular Microbiology* 2(1): 1-10. <https://psmjournals.org/index.php/ijmm/article/view/296/232>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Osorio-Hernández E, Molina-Gayosso E, Landero-Valenzuela N y Barrales-Cureño HJ. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Arias-Mota RM y Heredia-Abarca G. 2022. El género *Trichoderma* en fincas de café con diferente tipo de manejo y estructura vegetal en el centro del estado de Veracruz, México. *Revista Alianzas y Tendencias BUAP* 7(25):1-20. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/15597>
- Baiyee B, Pornsuriya C, Ito SI and Sunpapao A. 2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. *Biological control* 129:195-200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.018>
- Barnett, HL and Hunter, BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA.
- Belayneh-Mulaw T, Kubicek CP and Druzhinina IS. 2010. The Rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. *Diver* 2: 527–549. <https://doi.org/10.3390/d2040527>
- Cano J, Guarro J and Gené J. 2004. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum* Species of Clinical Interest. *Journal of clinical microbiology* 42(6). DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.6.2450-2454.2004>
- Cao XR, Xu XM, Che HY, West JS and Luo DQ. 2019. Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology* 68(6): 1146–1156. <https://doi.org/10.1111/ppa.13028>
- Castle A, Speranzini D, Rghei N, Alm G, Rinker D and Bissett J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 133-137. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.133-137.1998>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C. and López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant physiology* 149(3): 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Coutiño PV, Santoyo CVH, Flores VJJ y Muñoz RM. 2017. Análisis comparativo de dos organizaciones de pequeños productores de café de Oaxaca, México. *Turismo, Economía y Negocios* 3(2):41-57. <http://transitare.anahuacoaxaca.edu.mx/index.php/Transitare/article/view/55>

- Cristóbal-Martínez AL, Yáñez-Morales M de J, Solano-Vidal R, Segura-León O and Hernández-Anguiano AM. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 147(3): 605-614. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC and Crous PW. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–114.
- Díaz-Medina AR, Arboleda-Zapata T y Ríos-Orsorio LA. 2019. Estrategias de control biológico utilizadas para el manejo de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango: una revisión sistemática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 22: 595-611. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/29529/1/DiazAna_2019_ControlBiologico.pdf
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilbert C and Candela ME. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology* 155(6): 342-349. 10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x
- Fernández R y Suárez. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. passiflorae en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa) del municipio zona bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62(1): 4743-4748. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a01v62n1.pdf>
- García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR, Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ y González-Esquivel CE. 2017. Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología* 35(1): 58-79. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>
- Granda-Mora KI, Araujo-Abad S, Collahuazo-Reinoso Y, López-Salas Y, Jaen-Rigaud X, Robles-Carrión A y Urgiles-Gómez N. 2020. Caracterización morfológica y fisiológica de microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. *Bosques Latitud Cero* 10(2):124-136. <https://orcid.org/0000-0001-5220-373X>.
- Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villamovo GLL, Hernández-Leal TI. 2017. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). *Journal of Mexicana Phytopathology* 36(1) 172-183. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1708-1
- Harman GE. 1990. Deployment tactics for biocontrol agents in plant pathology. pp. 779–792. In Baker RR and Dunn PE, (eds.), *New Directions in Biocontrol: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Disease*, New York.
- Hassan O, Jeon JY, Chang T, Shin JS, Oh NK and Lee YS. 2018. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. *Plant disease* 102(5): 1015-1024. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE>
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E and Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 1890-1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>
- Hernández-Mendoza JL, Sánchez-Pérez MI, García-Olivares JG, Mayek-Pérez N and González-Prieto JM. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. *Revista colombiana de Biotecnología* 13(2): 176-185. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a17.pdf>
- Herrera-Parra EJ, Cristóbal-Alejo J and Ramos-Zapata JA. 2017. *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. *Chilean journal of agricultural research* 77(4): 318-324. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000400318>
- Hu MJ, Grabke A and Schnabel G. 2015. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. *Plant Disease* 99: 797.805.
- Hyde KD, Cai L, Mckenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ and Prihastuti H. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal diversity* 39: 1-17.
- Islam MS, Subbiah VK and Siddiquee S. 2022. Efficacy of Entomopathogenic *Trichoderma* Isolates against SugarcaneWoolly Aphid, *Ceratovacuna lanigera* Zehntner (Hemiptera: Aphididae). *Horticulturae*, 8 (2):1-21. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010002>
- Kannangara S and Dharmarathna RMGCS. 2017. Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences* 12 (1): 51-62. <http://repo.lib.sab.ac.lk:8080/xmlui/handle/123456789/987>
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek C and Druzhinina I. 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*. 109: 657-660. <https://doi.org/10.1017/S0953756205233397>
- López-Calva VL, Villa-García M, Quezada-Salinas A, Mendoza-Mendoza A and Anducho-Reyes MA. 2018. El género *Trichoderma* una herramienta agrobiotecnológica. *Ciencias Biológicas y de la Salud* 2(1): 1-11. https://www.ecorfan.org/proceedings/PCBS_TII/Ciencias_Biologicas_y_de_la_Salud_TII_1.pdf

- Luo Y, Wattanachai P and Soyong K. 2015. Effect of different factors on sporulation of *Colletotrichum coffeanum*. Journal of Agricultural Technology 11(4): 997-1012
- Martínez B, Infante D y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal 28(1): 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
- Medina-Meléndez JA, Ruiz-Nájera RE, Gómez-Castañeda JC, Sánchez-Yáñez JM, Gómez-Alfaro G y Pinto-Molina O. 2016. Estudio del sistema de producción de café (*Coffea arabica* L.) en la región Frailesca, Chiapas. Ciencia UAT 10(2): 33-43. <https://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v10n2/2007-7858-cuat-10-02-00033.pdf>
- Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2020. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. Revista mexicana de fitopatología 38(3): 434-449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Nina R, Smeltekop H, Almanza JC and Loza-Murguía M. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. Journal of the Selva Andina Research Society 2(1): 43-52. <http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v2n1/a06.pdf>
- Niño F y Mogollón Á. 2018. Alternativas para el control de antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en maracuyá (*Passiflora edulis*). Revista Sistemas de Producción Agroecológicos 9(2): 2-17. <https://doi.org/10.22579/22484817.714>
- Osorio-Concepción M, Casas-Flores S y Cortés-Penagos C. 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. Revista Mexicana de Micología 37:41-50. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a6.pdf>
- Pineda-Insuasti JA, Benavides-Sotelo EN, Duarte-Trujillo AS, Burgos-Rada CA, Soto-Arroyave CP, Burgos-Rada CA, Pineda-Soto CA, Fierro-Ramos FJ, Mora-Muñoz ES y Álvarez-Ramos SE. 2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar 51(1): 47-52. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223153894008.pdf>
- Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie EHC and Hyde KD. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Diversity, 39, 89–109.
- Revilla-Medina R, Vuelta-Lorenzo DR y Guerrero-Barriel D. 2020. Efecto *in vitro* de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium oxysporum* aislado de vivero de café (*Coffea arabica*). Ciencia en su PC 1(2):48-65. <https://www.redalyc.org/journal/1813/181363909004/181363909004.pdf>
- Rocha-Valdez J, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E and Serrano-Carreón L. 2005. 6 pentyl α pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. Biotechnology and Bioengineering 91(1):54–61. <https://doi.org/10.1002/bit.20489>
- Rolz-Asturias CE, De León Fajardo LR and Paniagua O. 2013. Evidencia de un antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones. Universidad del Valle de Guatemala. Revista, 25, 61-5.
- Sánchez A, Barrera V, Reybet G y Sosa MC. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Revista de la Facultad de Agronomía. 114 (1): 61-70. <http://revista.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/396>
- Sánchez-García BM, Espinosa-Huerta E, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R, Mora-Avilés MA. 2017. Identificación molecular y evaluación antagonica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. montcalm. Agrociencia 51: 63-79. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063.pdf>
- Santiago-Santiago AK, Arana-Coronado OA, Brambila-Paz, JJ, Matus-Gardea JA y Sosa-Montes M. 2020. Evaluación financiera con metodología de opciones reales de inversión para producción y venta de café orgánico. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(3): 493-505. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.1877>
- Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, Ávila-Quezada GD, Palacios-Espinosa A, Ruiz-Espinoza FH y Romero-Bastidas M. 2021. Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. Revista Mexicana de Fitopatología 39(3): 435-451. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, p. 1-26. In J. A. Bailey and M. J. Jeger (ed.), *Colletotrichum* biology, pathology and control. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Tamura K, Stecher G and Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular biology and evolution 38(7):3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Toutenburg H. and Shalabh 2009. Statistical Analysis of Designed Experiments. Third Edition Springer New York Dordrecht Heidelberg London. DOI10.1007/978-1-4419-1148-3. e-ISBN978-1-4419-1148-3.

- Uzunovic A and Webber JF. 1998. Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in freshly cut pine billets. *European Journal of Forest Pathology* 28: 323–334. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1998.tb01187.x>
- Valkila J. 2009. Fair Trade organic coffee production in Nicaragua-Sustainable development or a poverty trap? *Ecological Economics* 68(12): 3018-3025. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2009.07.002>
- Vu XT and Tran VT. 2020. Isolation and Characterization of *Trichoderma* Strains Antagonistic Against Pathogenic Fungi on Orange Crops. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* 36(3): <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5086>
- Waksman SA. 1927. Principles of soil microbiology. Baltimore MD, USA: The Williams and Wilkins Company. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19321101008>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ., New York: Academic Press Inc, 315-322.
- Yassin MT, Mostafa AA and Al-Askar AA. 2022. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat. *Journal of Taibah University for Science* 16(1):57-65. <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2029327>
- Ye W, Chen Y, Zhang W, Liu T, Liu Y, Li M, Li S, Xu L and Liu H. 2023. Potential Anti-*Candida albicans* Mechanism of *Trichoderma* Acid from *Trichoderma spirale*. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(6):5445. <https://doi.org/10.3390/ijms24065445>
- Yu JH. and Keller N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 43: 437–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>
- Zadoks JC and Schein RD. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. New York, United States. Oxford University Press. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801361394>
- Zhu ZX, Dong ZX, Mo RL, Zhang C, Zuo YY and Hu XM. 2023. First report of *Colletotrichum aenigma* causing anthracnose on mulberry leaves in China. *Plant disease*, 571.