



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Centro Multidisciplinario de Estudios de Biotecnología

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. ASOCIADAS A UN CULTIVO DE SORGO

Tesis

Para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias Biológicas  
Área temática: Biotecnología Pecuaria

Presenta

Q.F.B. PABLO FLORES CERVANTES

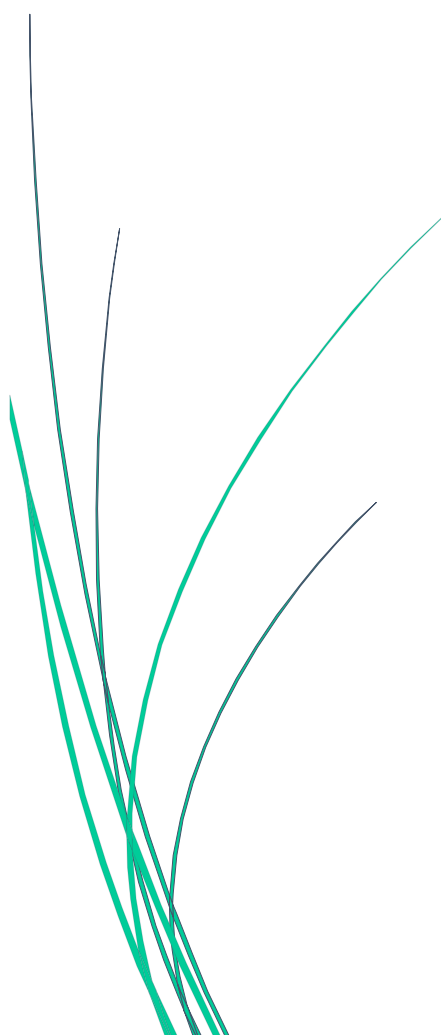
Asesor

D.C. VIRGINIA A. ROBINSON FUENTES

Co-asesor

D. C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO, 2019



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Laboratorio de Desarrollo Analítico de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez, ambos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. C. Virginia A. Robinson Fuentes y en co-asesoría el D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo. El presente trabajo recibió apoyo otorgado por CONACyT mediante la beca con registro No. 618654 para la realización de estudios de posgrado.

## DEDICATORIAS

**A DIOS** que me dio la vida y una vida plena y llena de amor y felicidad.

Es para mí una gran satisfacción poder dedicarles esta tesis a mis seres queridos, quienes han sido mis pilares para seguir adelante.

### **A mis padres**

**Hilda e Ignacio** por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional y ser el principal cimiento en mi vida, por formarme con buenos sentimientos hábitos y valores los cuales me han ayudado a salir adelante en todo momento.

### **A mis hermanos**

Porque son la razón de sentirme tan orgulloso de culminar mi meta, por alentarme apoyarme y tenderme su mano durante esta etapa de mi vida, gracias a ellos por confiar siempre en mí.

**PABLO FLORES CERVANTES**

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**.

A la **D.C. Virginia A. Robinson Fuentes** por sus consejos, su paciencia, su apoyo y por su constante asesoramiento en el desarrollo del presente trabajo.

Al **D.C. Gerardo Vázquez Marrufo** por compartir su conocimiento, su apoyo y paciencia en la realización de este estudio.

A mi comité sinodal: **D. C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas, D. C. Sylvia Patricia Fernández Pavía** y el **D.C. Joel Edmundo López Meza**, por tomarse el tiempo de revisar este proyecto y por sus valiosas aportaciones.

A **Doña Mari, Don Jesús y Don José** por su gran apoyo, brindarme consejos, convivencia, alimento, alojamiento, por considerarme unos más de la familia, por haberme arropado y brindado un hogar, hicieron que me sintiera en casa (300). Gracias.

A **Gaby, Gele, Tere y Chave** por brindarme su valiosa amistad en cada momento, apoyo y compañía a lo largo de esta etapa, por ser comprensivas, por compartir tantas sonrisas juntos, momentos y alegrías. Por compartir conmigo lo grandes seres humanos que son (otros 300). Gracias

A **Wilmer** por brindarme su amistad desde un principio, por compartir aventuras juntos, por su apoyo y manera de desestresarnos juntos, por compartir tantas alegrías juntos. Gracias

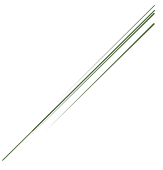
A mis **compañeros de generación** por todos los momentos que compartidos, los consejos, orientaciones y sufrimientos en clases. Gracias

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Lilly, Will, Karlita, Xio, Dany, Daysi** y demás. De todos me llevo grandes momentos, recuerdos, consejos y lágrimas compartidas, extrañare la comedera, el café, el ambiente y las risas juntos. Gracias

A **Ti**, por la gran persona que eres, por ser siempre mi **gran motivación**, me alentaste, siempre me decías que lo lograría, por siempre **apoyarme**, tu apoyo único e incondicional, por siempre preocuparte por mi salud **bienestar**, tu compañía en este camino lleno de obstáculos, me ha hecho todo más fácil **y llevadero**. **Gaby** Gracias. Te amo.

Al **Parna**.

**PABLO FLORES CERVANTES**



**“El aprendizaje es experiencia  
todo lo demás es información”**

*Albert Einstein*

## ABREVIATURAS

% p/v	Porcentaje peso a volumen
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
G	Gramos
g/L	Gramos por litro
IIAF	Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales
lbf/in <sup>2</sup>	Libra fuerza por pulgada cuadrada
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
Mm	milímetros
mM	Milimoles
MMV	Medio Mínimo Vogel
MSS	Metabolitos secundarios solubles
MSV	Metabolitos secundarios volátiles
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar extracto de papa
pH	Potencial de hidrogeno

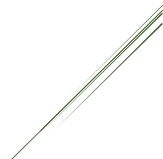
## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 El sorgo y su relevancia socioeconómica .....	3
1.2 Sorgo y usos biotecnológicos .....	3
1.3 Hongos asociados a sorgo .....	5
1.4 <i>Trichoderma</i> spp. y sus mecanismos de acción contra fitopatógenos .....	7
1.5 Selección y utilización de cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. para procesos de biocontrol .....	12
1.6 Comunidades de <i>Trichoderma</i> spp. en agroecosistemas .....	15
1.7 Caracterización de especies de <i>Trichoderma</i> .....	16
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 Objetivo General .....	19
4.2 Objetivos Específicos .....	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 Descripción del área de estudio y muestreo .....	21
5.2 Medios de cultivo .....	22
5.3 Aislamiento de hongos en cultivo axénico .....	23
5.4 Nomenclatura utilizada .....	23
5.5 Cepas de organismos fitopatógenos de prueba .....	24
5.6 Análisis genético molecular .....	24
5.7 Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. obtenidos .....	26
5.8 Ensayos de antagonismo .....	27
5.9 Ensayos de inhibición .....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
6.1 AISLADOS FÚNGICOS ASOCIADOS EN DIFERENTES COMPARTIMENTOS DEL SORGO .....	30
6.2 <i>Trichoderma</i> spp. AISLADOS DE LOS TRES COMPARTIMENTOS DE SORGO .....	33
6.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma</i> spp. AISLADOS DE SORGO .....	40

6.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Trichoderma</i> spp. AISLADAS .....	41
6.5 ANTAGONISMO DE LAS CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp. HACIA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS: Ensayos de confrontación en cultivo dual	44
6.6 ANTAGONISMO DE LAS CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp. HACIA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS: Inhibición del crecimiento por metabolitos secundarios solubles (MSS).....	49
6.7 ANTAGONISMO DE LAS CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp. HACIA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS: Inhibición del crecimiento por metabolitos secundarios volátiles (MSV).....	52
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>8. RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Página
1	Estrategia general.....	20
2	Área de muestreo con el diseño de los transectos.....	21
3	Aislados fúngicos de tejido foliar.....	31
4	Aislados fúngicos de raíz.....	32
5	Aislados fúngicos de suelo.....	33
6	<i>Trichoderma</i> spp. aislados del tejido foliar del sorgo.....	35
7	<i>Trichoderma</i> spp. aislados de la raíz del sorgo.....	36
8	<i>Trichoderma</i> spp. aislados del suelo.....	39
9	Cinéticas de crecimiento.....	40
10	Electroferogramas de la secuencias del gen <i>tef 1-α</i> .....	42
11	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Fusarium</i> spp. ....	44
12	Micoparasitismo frente al género <i>Fusarium</i> .....	46
13	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Colletotrichum</i> spp. ....	47
14	Micoparasitismo frente al género <i>Colletotrichum</i> .....	47
15	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. hacia <i>Phytophthora</i> spp. ....	48
16	Micoparasitismo frente al género <i>Phytophthora</i> .....	49
17	Inhibición por MSS de <i>Trichoderma</i> spp. frente al género <i>Fusarium</i> .....	50
18	Inhibición por MSS de <i>Trichoderma</i> spp. frente al género <i>Colletotrichum</i>	51
19	Inhibición por MSS de <i>Trichoderma</i> spp. frente al género <i>Phytophthora</i> ..	52
20	Inhibición por MSV de <i>Trichoderma</i> spp. frente al género <i>Fusarium</i> .....	53
21	Inhibición por MSV de <i>Trichoderma</i> spp. frente al género <i>Colletotrichum</i>	54
22	Inhibición por MSV de <i>Trichoderma</i> spp. frente al género <i>Phytophthora</i> ..	55



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>No.</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Microorganismos fitopatógenos de prueba.....	24
2	Temperatura de alineamiento para el primer tef 1- $\alpha$ .....	26
3	Aislados de hongos obtenidos en cada compartimento del agroecosistema de sorgo.....	30
4	Tiempo de conidiación.....	38
5	Resultados del análisis Blastn de las secuencias de tef 1- $\alpha$ .....	43

## RESUMEN

En este trabajo se aislaron especies fúngicas de tres compartimentos diferentes de un agroecosistema de sorgo. Se aislaron *Trichoderma* spp: tres de tejido foliar, dos de raíz y siete en suelo. Se identificaron por PCR, tejido foliar se identificó a *T. lixii*/*H. lixii*; en raíz a *T. lixii* y *T. atroviride* y en suelo a *T. harzianum* y *T. virens*. Se seleccionó al azar, una cepa de cada compartimento para evaluar su potencial antagonico frente a fitopatógenos de relevancia: *Fusarium mexicanum* (FM), *F. pseudocircinatum* (FP), *Fusarium* sp. (FU), *Colletotrichum acutatum* (CA), *C. coccodes* (CC), *C. gloesporoides* de Morelia (CG1), *C. gloesporoides* de Uruapan (CG2), *Phytophthora capsici* (PCA), *P. cinnamomi* de Atécuaro (PC1) y *P. cinnamomi* de Uruapan (PC2). Se clasificó el nivel de antagonismo según Bell et al. (1982). Resultados de los ensayos de cultivo dual: las cepas T5HD (tejido foliar) y T4RB (raíz) clase 1 frente a FM. T5HD, T4RB y 2T22G (suelo) frente a CC y CG2, clase 1; las cepas T5HD y 2T22G clase 1 frente a CA y T4RB clase 1 frente a CG1, T5HD, T4RB Y 2T22G clase 1 frente a PCA, PC1 y PC2. En los ensayos de Inhibición por metabolitos secundarios solubles (MSS) y por volátiles (MSV), se clasificaron según Worasatit et al. (1994). Los resultados de inhibición por MSS son: 2T22G clase 1 frente a FM, T5HD Y 2T22G clase 1 frente a FU. T5HD y 2T22G clase 1 frente a CA, 2T22G clase 1 frente a CC. Las tres cepas evaluadas frente a PCA, PC1 y PC2, clase 1. Inhibición por MSV son: clase 2 T4RB y 2T22G frente a FM y FP. T4RB clase 2 contra las especies de *Colletotrichum* probadas. T4RB clase 1 frente a PC1 y PC2. La cepa aislada de suelo 2T22G, presentó el mejor potencial antagonico.

Biocontrol, antagonismo, inhibición, *Fusarium* y *Colletotrichum*

## ABSTRACT

In this work, fungal species were isolated from three different compartments of a sorghum agroecosystem. *Trichoderma* spp were isolated: three from leaf tissue, two from root and seven in soil. They were identified by PCR, foliar tissue was identified at *T. lixii*/*H. lixii*; in root to *T. lixii* and *T. atroviride* and in soil to *T. harzianum* and *T. virens*. A strain from each compartment was randomly selected to assess its antagonistic potential against relevant phytopathogens: *Fusarium mexicanum* (FM), *F. pseudocircinatum* (FP), *Fusarium* sp. (FU), *Colletotrichum acutatum* (CA), *C. coccodes* (CC), *C. gloesporoides* de Morelia (CG1), *C. gloesporoides* de Uruapan (CG2), *Phytophthora capsici* (PCA), *P. cinnamomi* de Atécuaro (PC1) and *P. cinnamomi* de Uruapan (PC2). The level of antagonism was classified according to Bell et al. (1982). Results of the dual culture trials: strains T5HD (leaf tissue) and T4RB (root) class 1 versus FM. T5HD, T4RB and 2T22G (ground) versus CC and CG2, class 1; strains T5HD and 2T22G class 1 against CA and T4RB class 1 against CG1, T5HD, T4RB and 2T22G class 1 against PCA, PC1 and PC2. In the Inhibition assays by soluble secondary metabolites (MSS) and by volatile (MSV), they were classified according to Worasatit et al. (1994). The results of MSS inhibition are: 2T22G class 1 against FM, T5HD and 2T22G class 1 against FU. T5HD and 2T22G class 1 against AC, 2T22G class 1 against CC. The three strains evaluated against PCA, PC1 and PC2, class 1. Inhibition by MSV are: class 2 T4RB and 2T22G against FM and FP. T4RB class 2 against tested *Colletotrichum* species. T4RB class 1 vs. PC1 and PC2. The isolated 2T22G soil strain presented the best antagonistic potential.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El sorgo y su relevancia socioeconómica

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es un cereal originario de África miembro de la familia de las gramíneas. Es el cuarto cereal más importante en siembra a nivel mundial después del maíz, arroz y trigo, además de ser un cultivo multipropósito ya que se utiliza en la producción de grano, forraje, jarabe y bioetanol (Ezzat et al., 2010; Mareque et al., 2018). Esta variedad de usos ocasiona que el sorgo sea ampliamente cultivado alrededor del mundo, produciéndose alrededor de 60 millones de toneladas anuales promedio en los últimos 10 años, hasta el 2016 (SAGARPA, 2016). La producción mundial de sorgo se concentra principalmente en ocho países, siendo Estados Unidos el principal productor con una participación del 18% del total, seguido de Nigeria y México, que participan con alrededor del 10% cada uno. En tercer lugar, se encuentran Sudán e India, cada uno con una participación cercana al 9% y con menores participaciones se encuentran Etiopía, Argentina y China (SAGARPA, 2016). El segundo lugar que ocupa México como productor global de sorgo, junto con Nigeria, lo debe a una producción anual de 6 millones de toneladas promedio; además, México es el segundo consumidor mundial de este grano, destinándose el 95% a consumo forrajero y el resto a consumo humano y usos en la industria. La producción nacional se concentra principalmente en Tamaulipas, Guanajuato, Sinaloa, Michoacán y Nayarit; siendo Michoacán el 4º productor nacional de dicho cereal, produciendo 600 mil toneladas anuales promedio (SAGARPA, 2016).

### 1.2 Sorgo y usos biotecnológicos

Además de su uso como forraje y alimento humano, existen otras características y aplicaciones del sorgo que justifican el estudio de dicha planta y sus relaciones con microorganismos, particularmente hongos. El sorgo se ha propuesto como una importante planta para la obtención de biocombustibles, debido al alto contenido de almidón y azúcares; así, se considera un cultivo relevante para la producción de biocombustible de segunda generación debido al alto contenido celulósico y no es considerado un cultivo alimenticio importante. Además, el sorgo tiene una gran

adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, mayor a la de otros cultivos utilizados para la obtención de biocombustibles, y es un cultivo con múltiples usos, por lo que es el más adecuado para la producción sostenible de biocombustibles (Wang et al., 2008; Calviño y Messing, 2012; Malobane et al., 2018). Por otra parte, el bagazo de sorgo es un buen material como sustrato para la producción de enzimas ligninolíticas por parte de algunos basidiomicetes (Mishra et al., 2017), y para la producción de hongos comestibles (Rani et al., 2008). Los granos de la planta son un buen material para la preservación a largo plazo del germoplasma de hongos comestibles como *Agaricus subrufescens* (Mata y Savoie, 2013). De la planta de sorgo se han obtenido metabolitos o compuestos con actividad farmacológica, como polisacáridos con actividad antioxidante (Slima et al., 2017), así como antocianidinas (3-desoxiantocianinas) con actividad antiinflamatoria y anticarcinogénica (Vanamala et al., 2017). Se sabe que la 3-desoxiantocianina, presente en el sorgo, es capaz de reducir la esteatosis hepática (De Sousa et al., 2018). Por otro lado, el sorgo se ha considerado para procesos de fitorremediación de suelos, particularmente de aquellos contaminados con sustancias orgánicas como el fenantreno y el pireno (Baneshi et al., 2014) y metales pesados como el estroncio (Wang et al., 2017). En algunos casos la microbiota asociada a esta gramínea es fundamental en el proceso de detoxificación de metales pesados (Phieler et al., 2015). Un último aspecto que es relevante de considerar para estudiar el sorgo y su microbiota asociada, es el hecho de que éste sirve como reservorio de especies microbianas patógenas de maíz, como es el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Ikley et al., 2015).

La caracterización de la comunidad microbiana asociada a cultivos de relevancia agrícola e industrial es importante ya que ésta influye de manera directa en la producción del cultivo y ayuda a las plantas a resistir el estrés biótico y abiótico (Kapanigowda et al., 2013). Adicionalmente, la microbiota asociada a plantas de relevancia agrícola es fuente de herramientas para la obtención de metabolitos con actividad biológica o de cepas para el biocontrol de enfermedades de plantas (Ryan et al., 2007; Andrews et al., 2010; Busby et al., 2016). No obstante, los estudios sobre la microbiota asociada a cultivos de sorgo son escasos, aunque

recientemente, empleando pirosecuenciación, se ha documentado que la comunidad endófito bacteriana es distinta en las diferentes estructuras de la planta (Maropola et al., 2015). Dicho análisis documentó entre las principales especies bacterianas asociadas a sorgo a *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Sphingobium*, *Lactococcus* y *Herbaspirillum*. Los estudios relacionados con la comunidad fúngica y su relevancia se describen a continuación.

### 1.3 Hongos asociados a sorgo

Los hongos ocasionan grandes pérdidas económicas y aumentan los costos de producción en los cultivos, al tener que establecer medidas para su control (García, 2004). Los patógenos de las plantas son de importancia por su impacto en el rendimiento de los cultivos, sobre la sostenibilidad del sistema y en la ecología. Además, los hongos fitopatógenos representan una seria amenaza a la seguridad alimentaria debido a su capacidad para producir micotoxinas (Savary et al., 2017).

Una amplia variedad de hongos ha sido documentada como fitopatógenos productores de micotoxinas o simplemente asociados a cultivos de sorgo, siendo las especies más comunes de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Chaetomium* y *Curvularia*. En la primera y quizá única descripción sobre la sucesión de colonización fúngica en tallo y raíces de plantas de sorgo en crecimiento mostró que especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum* y *Trichoderma* eran los más frecuentemente aisladas en los distintos estados de desarrollo de la planta (Reed et al., 1983; Partridge et al., 1984). Dicho estudio mostró que los hongos se volvían más abundantes conforme en estados más avanzados del desarrollo de la planta. Alves dos Reis et al. (2010) reportan la siguiente abundancia de hongos en distintos estados de desarrollo de la planta de sorgo: *Cladosporium* spp. (61.8%), *Helminthosporium* spp. (33.4%), *Fusarium* spp. (25.1%), levaduras (17.5%), *Epicoccum* spp. (11.0%), *Mucor* spp. (6.1%), *Alternaria* spp. (4.2%), *Nigrospora* spp. (4.7%), *Aspergillus parasiticus* (4.0%), *Aspergillus flavus* (3.0%), *Acremonium* spp. (2.2%) y *Penicillium* spp. (1.4%). Otros géneros de importancia son *Colletotrichum*, *Periconia*, *Rhizopus*,

*Trichotecium*, *Trichoderma* y *Cephalosporium*. Todos ellos se pueden encontrar como endófitos de raíz, de tejido foliar, así como en suelo (FAO, 2012).

Recientemente, empleando una combinación de pirosecuenciación y secuenciación de Sanger de las regiones ITS y 18S de rDNA, así como el aislamiento en cultivo axénico, se identificaron 33 especies de ascomicetes asociados a semillas y plántulas de sorgo crecidas *in vitro*, entre ellas especies de los géneros *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, entre otras. Dicho estudio tenía por finalidad evaluar la transferencia de hongos de la semilla a la planta, encontrando en mayor proporción especies de los géneros *Curvularia*, *Fusarium* y *Aspergillus*, en ese orden. La baja diversidad de hongos encontrada puede atribuirse al desarrollo de las plántulas en tubos de ensaye, sin contacto con el ambiente (Stokholm et al., 2016).

En otro estudio basado únicamente en el aislamiento en cultivo axénico identificó aislados de *Aspergillus* (28.7%), *Alternaria* (22.9%) y *Penicillium* (13.4%) como los más abundantes en tejidos de plantas de sorgo. De manera interesante, mientras que el aislamiento de cepas de los primeros dos géneros tiende a disminuir significativamente a medida que aumenta el tiempo de ensilado de la planta, las de *Penicillium* se incrementan hasta el punto en que prácticamente de cualquier muestra analizada a los 180 días se obtiene un aislado de dicho género. En este mismo tiempo de ensilado, cepas de los géneros *Paecilomyces* (35.3%) y *Trichoderma* (11.1%) incrementan su incidencia de manera significativa, desde cero en material fresco (Del Palacio et al., 2016).

Los hongos fitopatógenos asociados al cultivo de sorgo descritos en México son *Fusarium moniliforme* (Martínez-Ramírez et al., 2005; Ramírez-Rojas et al., 2013), *Macrophomina phaseolina* (Díaz-Franco y Montes-García, 2008; Ramírez-Rojas et al., 2013), *Sporisorium reilianum*, *Peronosclerospora sorghi*, *Claviceps africana* (Díaz-Franco y Montes-García, 2008) y *Sclerotium rolfsii* (Hernández-Jiménez et al., 2004). En el caso particular de Michoacán, los fitopatógenos asociados a sorgo, incluidas plantas de *Sorghum* sp., *S. bicolor* y *S. vulgare*, son *Peronosclerospora sorghi*, *C. africana*, *F. moniliforme*, *Cercospora sorghi* y *Sporisorium reilianum* (Fernández-Pavía et al., 2012).

En México se han obtenido aislados de *Trichoderma* spp. a partir de suelo en donde se ha cultivado sorgo. Las especies identificadas mediante criterios morfológicos en combinación con el análisis de la secuencia ITS fueron *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. koningiopsis* y *T. citrinoviride* (Larralde-Corona et al., 2008). Dos de las cepas identificadas como *T. harzianum* y *T. koningiopsis* resultaron eficientes antagonistas contra cepas del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* aisladas de plantas de sorgo y frijol infectadas. El aislamiento y tipificación de aislados del género *Trichoderma* es importante ya que puede contribuir a encontrar cepas con potencial para el biocontrol y la bioestimulación de cultivos de relevancia agrícola, además de que este género produce una gran diversidad de metabolitos secundarios con distintos tipos de actividad biológica (Zeilinger et al., 2016), lo que incrementa significativamente su potencial biotecnológico. Por otra parte, estudios recientes en diversos ecosistemas y distintas regiones geográficas han confirmado la existencia de una gran variación fisiológica, bioquímica y genética intra e interespecífica en la efectividad de cepas de *Trichoderma* spp. para antagonizar contra diferentes microorganismos fitopatógenos. Esto muestra la necesidad de seguir aislando y caracterizando cepas antagonistas de distintas regiones, particularmente cercanas geográfica y ecológicamente a las cepas de fitopatógenos que se desean controlar. Además, cabe hacer énfasis en la creciente resistencia a los fungicidas por parte de los hongos fitopatógenos, debido al uso excesivo e inadecuado de los mismos (Heydari y Pessarakli, 2010). Por lo anterior, es importante encontrar alternativas eficaces frente a los fitopatógenos, amables con el medio ambiente y que no provoquen riesgos a la salud.

#### **1.4 *Trichoderma* spp. y sus mecanismos de acción contra fitopatógenos**

*Trichoderma* (Telomorfo: *Hypocrea*, *Hypocreales*, *Ascomycota*, *Dikarya*) es un género de hongos cosmopolita, que habita usualmente en suelos y rizósfera, aunque también se ha documentado como endófito de plantas (Kredics et al., 2014). Las especies del género se han reportado en una gran variedad de sustratos naturales y artificiales, lo que muestra su potencial como un microorganismo

oportunista y su adaptabilidad a diferentes condiciones ecológicas (Fried y Druzhinina, 2012). El principal mecanismo de reproducción asexual de *Trichoderma* spp. es mediante la producción de conidios que se da en respuesta a señales de estrés para permitir al hongo sobrevivir y dispersarse. La inducción de la conidiogénesis es afectada por las condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes, luz y pH bajo, entre otros factores (Carreras-Villaseñor et al., 2012).

### *Biocontrol*

El “control biológico” o “biocontrol” puede referirse al control de un organismo por medio de otro, siendo en un sentido más amplio el uso de espécimen naturales para reducir los efectos de individuos no deseados, considerados patógenos y favorecer a los organismos deseables como cultivos, insectos, árboles, y microorganismos benéficos (Narayanasamy, 2013). La capacidad de un microorganismo que controla a otro depende de diversos factores que favorecen una actividad antagónica, como se describe más adelante; además de que algunos microorganismos como las especies del género en cuestión, proporcionan protección a la planta asociada tanto de manera directa inhibiendo al patógeno por micoparasitismo, antibiosis y por competencia; como de manera indirecta aumentando la resistencia vegetal frente a los patógenos y mediante la estimulación del crecimiento (Narayanasamy, 2013). Es importante mencionar que el biocontrol puede presentar costos económicos menores y ser más eficiente respecto al uso de otras prácticas de control tradicionales, como el uso de fungicidas que se utilizan de manera indiscriminada. Esto es debido a que los antagonistas actúan en forma más lenta, pero su acción puede ser más estable y duradera en el tiempo que la del control químico con fungicidas, en donde la mayoría de los casos el efecto suele ser temporal y se requieren una serie de aplicaciones para lograr una protección adecuada de las plantas (Heydari y Pessarakli, 2010).

Las especies del género *Trichoderma* destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo (Schuster & Schmoll, 2010; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014), debido a una eficiente colonización de la rizósfera, estableciéndose rápidamente en las comunidades microbianas de la misma. Esto

les permite ejercer un control sobre la micoflora patogénica y favorecer la salud de la planta mediante la estimulación del crecimiento y la induciendo la resistencia, tanto sistémica como localmente, contra un amplio número de enfermedades que son causadas por diferentes microorganismos (Vinale et al., 2008; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

Se han descrito diversos mecanismos por medio de los cuales las especies del género *Trichoderma* antagonizan a los microorganismos fitopatógenos, los cuales incluyen la liberación de metabolitos con actividad antifúngica, la competencia directa por los nutrientes y el espacio disponibles, y el micoparasitismo, que se describen a continuación.

## I. Mecanismos directos

### a) Antibiosis

Entre los mecanismos de acción de los agentes biocontroladores está la antibiosis, que consiste en la síntesis de inhibidores del crecimiento o de agentes que causan la muerte de un organismo cuando el mismo se expone a los productos del metabolismo del antagonista. Como se ha descrito con anterioridad, las especies del género *Trichoderma* son capaces de secretar una gran diversidad de metabolitos que pueden ser tanto volátiles como no volátiles, que impiden el desarrollo de microorganismos fitopatógenos. Dependiendo de la estructura del metabolito, se pueden distinguir dos tipos: los de peso molecular alto, denominados peptaiboles, con características anfipáticas que actúan alterando la permeabilidad de la membrana de las células del patógeno, y los de bajo peso molecular, no polares, como compuestos aromáticos, pironas y derivados de isocianato que pueden difundir en el agua y actuar a distancia (Vinale et al., 2008; Zeilinger et al., 2016; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). Los compuestos volátiles pueden ser alcoholes, cetonas, alcanos, furanos, mono- y sesquiterpenos, así como pironas. Además, hay que considerar en este apartado también la producción de péptidos no ribosomales (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). La secreción de estos metabolitos está claramente correlacionada con la capacidad de biocontrol, ya que

al ser purificadas y aplicadas estas sustancias se obtienen resultados muy similares sobre el fitopatógeno que al aplicar todo el hongo.

### *b) Competencia*

Las especies de *Trichoderma* se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, que le brinda mayor capacidad a la hora de colonizar un espacio, pudiendo así competir eficientemente por los mismos nichos y nutrientes que otros hongos, incluyendo a fitopatógenos. Este es un mecanismo de alta eficacia debido a que la falta de nutrientes es la causa más común de muerte para los microorganismos fitopatógenos. Por ejemplo, el hierro que es uno de los principales nutrientes debido a que delimita la colonización y el desarrollo de hongos, siendo esencial para la supervivencia de estos organismos; sin embargo, dicho nutriente es escaso y su disponibilidad en el suelo es muy baja. Las especies de *Trichoderma* son capaces de producir sideróforos que son altamente eficientes para quelar hierro, los cuales permiten movilizar al metal evitando que sea absorbido por otros microorganismos, deteniendo de ésta forma el crecimiento de otros hongos (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014; Zeilinger et al., 2016). La interacción entre *Trichoderma* spp. y especies de hongos fitopatógenos también está asociada a la fase saprofítica que muchas especies de fitopatógenos presentan, compitiendo por las fuentes de carbono y afectando así su supervivencia. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características intrínsecas del agente de control biológico, incluyendo su plasticidad ecológica, así como su velocidad de crecimiento y desarrollo. Las especies de *Trichoderma* se encuentran bien adaptadas a suelos ácidos y son capaces de controlar el pH externo para asegurar que los valores sean los óptimos para el funcionamiento de las enzimas hidrolíticas que secreta (Carreras-Villaseñor, 2012; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

### *c) Micoparasitismo*

El micoparasitismo es definido como un tipo de interacción en la cual los microorganismos se benefician a expensas de hongos. Es una de las interacciones

mejor desarrolladas en la familia Hypocreaceae (Atanasova et al., 2013). Las relaciones antagónicas entre microorganismos se han clasificado en dos principales grupos de acuerdo al nivel de agresividad hacia el hospedero. En el primer grupo se encuentran las interacciones de tipo biotrófico, en donde el micoparásito se alimenta del hongo blanco sin matarlo. En el segundo grupo se encuentran las interacciones necrotóficas, en las cuales el hongo micoparasítico ataca a su presa, primero detectándola y después orientando el crecimiento en dicha dirección. Una vez producido el contacto, *Trichoderma* spp. se adhiere a su huésped enrollándose alrededor de éste y formando apresorios, culminando la interacción con la lisis de la pared celular y la digestión de los contenidos celulares del hospedero, causando su muerte (Leeder et al., 2011). Durante esta interacción, diversas actividades enzimáticas tienen un papel relevante, tales como quitinasas, proteasas y glucanasas las cuales participan en la hidrólisis de las paredes fúngicas de sus huéspedes, facilitando el acceso al interior celular. *Trichoderma* spp. detecta la presencia de otros hongos aún antes del contacto, activando la expresión de genes específicos y produciendo diferentes tipos de enzimas antes y después del contacto (Seidl et al., 2009; Mukherjee et al., 2012 Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

## II. Mecanismos indirectos

### a) *Inducción de resistencia en plantas*

Se ha comprobado que la asociación directa de *Trichoderma* spp. con las plantas estimula los mecanismos de defensa de las mismas, generando su resistencia a una gran variedad de microorganismos fitopatógenos. El primer mecanismo es denominado resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés). Se ha documentado que la inducción de resistencia sistémica en plantas por parte de *Trichoderma* spp. está mediada por las fitohormonas ácido jasmónico y etileno (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). En el segundo mecanismo es denominado resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) y es mediado por el ácido salicílico. *Trichoderma* spp. induce en la planta la expresión de genes relacionados con patogénesis. La inducción de resistencia contra fitopatógenos ha sido probada experimentalmente en diversos sistemas planta-patógeno que

incluyen *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol, *Alternaria solani* en tomate, *Phytophthora parasitica* en tabaco, tanto mediante la aplicación de inóculos como de extractos de *Trichoderma* spp. (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

#### *b) Estimulación del crecimiento*

Otro de los mecanismos antagonistas producidos por *Trichoderma* spp. se basa en la promoción del crecimiento de la planta hospedante. Diversas especies del género *Trichoderma* estimulan el crecimiento vegetal potenciándolo hasta un 300%, debido a que son capaces de sintetizar determinados compuestos con carácter hormonal. Además, se ha propuesto que *Trichoderma* spp. mejoran el crecimiento de las plantas a través de la solubilización de nutrientes y por lo que muestra mejores efectos en plantas que están bajo condiciones de estrés nutricional (Shoresh et al., 2010; Narayanasamy, 2013). Este género fúngico produce diferentes ácidos orgánicos que disminuyen el pH, solubilizando el fósforo del medio, así como otros nutrientes, mejorando el desarrollo de la planta. Por último, se propone que las enzimas hidrolíticas producidas movilizan la materia orgánica del medio mejorando la absorción de compuestos más simples y por consecuencia el estado nutricional de la planta (Shoresh et al., 2010; Zeilinger et al., 2016).

### **1.5 Selección y utilización de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. para procesos de biocontrol**

La selección de cepas silvestres del género *Trichoderma* con fines biotecnológicos y particularmente para encontrar candidatos para el desarrollo de productos de biocontrol es un proceso que ha mantenido la búsqueda en distintas regiones del mundo. Algunos de dichos trabajos de selección han mostrado una gran variabilidad intra e interespecífica en la capacidad para antagonizar a especies de hongos y oomicetes fitopatógenos (El-Komy et al., 2015; Hirpara et al., 2016). La capacidad antagonica de las especies de *Trichoderma* es muy variable y en algunos estudios se ha demostrado que las cepas nativas de un lugar son más efectivas que las

importadas (Belayneh-Mulaw et al., 2010; Gal-Hemed et al., 2011). Debido a esto, la aplicación de productos de biocontrol con cepas provenientes de regiones geográficas distantes, o de ecosistemas o incluso de cultivos diferentes al origen de estas cepas, no suelen ser tan efectivos. Esto resalta la importancia de continuar aislando y caracterizando cepas del género *Trichoderma* para su aplicación con determinados cultivos y/o condiciones ecológicas. Así, la evidencia muestra que no es posible basarse en estudios previos para predecir qué especie del género *Trichoderma* de una colección en particular resultará mejor antagonista contra determinadas especies/cepas de microorganismos fitopatógenos. En algunos de los trabajos realizados para la selección de cepas de *Trichoderma* spp. con fines de biocontrol, se ha intentado establecer una correlación entre la capacidad antagónica *in vitro* y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares o de metabolitos hidrosolubles, encontrando resultados contrastantes dependiendo de la referencia consultada (El-Komy et al., 2015; Nath et al., 2014).

No existe un único proceso en la estrategia empleada para la selección de cepas, aunque en la mayoría de los casos la confrontación en cultivos duales entre cepas de *Trichoderma* spp. de interés y los fitopatógenos de prueba prevalece como el ensayo inicial importante. A partir de ahí algunos análisis consideran complementar con los ensayos de inhibición de crecimiento por metabolitos hidrosolubles y/o ensayos de inhibición de crecimiento por compuestos volátiles (Nath et al., 2014). En otros casos, se analiza la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de manera cualitativa o cuantitativa (Atanasova et al., 2013), mientras que en otros estudios se realizan ensayos de biocontrol *in planta* (López-Bucio et al., 2015) y en campo (Fiorentino et al., 2018). Sin embargo, han sido pocos los estudios que combinan el análisis de antagonismo con pruebas bioquímicas, metabólicas y genéticas (Nath et al., 2014; Hirpara et al., 2016).

En México los estudios de biocontrol de especies del género *Trichoderma* se ha incrementado en los últimos años; sin embargo, es necesario intensificar la evaluación de compatibilidad de cada nueva cepa promisoría con los agroquímicos empleados en los escenarios comunes de aplicación y que en un futuro quizás sea

posible desplazarlos (Martínez et al., 2013). Así, en el estado de Guerrero se evaluó el efecto antagonista de especies nativas de *Trichoderma* spp. en condiciones *in vitro* y de invernadero, encontrando que una cepa nativa de *T. harzianum* es más eficiente que el fungicida pentacloro nitrobenzeno frente al fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*, el cual afecta a la planta de cacahuete (Michel-Aceves et al., 2009). Al evaluarse el efecto antagónico *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre *Fusarium subglutinans* (Fs) y *Fusarium oxysporum* (Fo), fitopatógenos del mango, se encontró que una cepa nativa de *T. harzianum* presentó los mayores porcentajes de antagonismo contra ambos fitopatógenos al inhibir el crecimiento micelial en 62.9% (Fo) y 42.0% (Fs) (Michel-Aceves et al., 2009). Santos-Villalobos et al. (2012) en los estados de Chiapas, Michoacán y Oaxaca aislaron 20 cepas de *Trichoderma* spp. de huertos de mango (*Mangifera indica* L.). y al fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos que presentaban lesiones de antracnosis. El análisis filogenético de los aislados obtenidos se basó en la región ITS1 de rDNA, lo que permitió identificar a las especies *Hypocrea lixii*, *Hypocrea jecorina*, *T. asperellum*, *T. spirale* y *T. brevicompactum*. Los ensayos de confrontación mostraron que 17 de los aislados presentaban un antagonismo clase dos y las cepas restantes se asignaron a la clase uno, demostrando que las cepas evaluadas tienen una gran capacidad para controlar la antracnosis en plantaciones de mango en México. Cuervo-Parra et al. (2014) aislaron cepas de *Trichoderma* de vainas de cacao de una plantación en Huimanguillo, Tabasco, México. Dichas cepas fueron identificadas como *T. viridescens* en base al análisis de la secuencia ITS. Por otra parte, de los frutos que presentaban síntomas de la vaina negra se aislaron los fitopatógenos *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora capsici* y *Moniliophthora roreri*. Las cepas de *Trichoderma* fueron sometidas a ensayos de confrontación y al cabo de siete días de incubación contra *M. roreri*, *P. megasperma* y *P. capsici*, los intervalos de los porcentajes de inhibición fueron de 78.28% - 81.63%, 63.04% - 69.95% y 69.77% - 76.31%, respectivamente. Después de 31 días de incubación, los valores de ICB (Índice de biocontrol) aumentaron entre 81.52% y 86.50% por *M. roreri* y 100% para las cepas de *Phytophthora*.

En el país existe sólo un trabajo de cepas de *Trichoderma* spp. relacionadas con sorgo, en el cual Larralde et al. (2008) aislaron e identificaron seis especies de *Trichoderma* de sorgo al noreste de México. Del mismo cultivo de sorgo y de plantas de frijol infectadas con la podredumbre del tallo, aislaron al fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* y realizaron ensayos de confrontación *in vitro*. Las nueve especies de *Trichoderma* utilizadas en las pruebas mostraron capacidades antagónicas diferentes; las cepas TCBG-2 (*Trichoderma* sp.), TCBG-3 (*T. atroviride*) y TCBG-8 (*T. koningiopsis*) antagonizaron eficientemente a ambos aislamientos de *M. phaseolina*, mientras que el aislado más débil fue TCBG-6 (*T. longibrachiatum*), incluso estimuló el crecimiento radial de *M. phaseolina* aislado del frijol, pero no el de *M. phaseolina* aislado del sorgo enfermo.

Por todo lo anterior la selección de cepas del género *Trichoderma* con fines de biocontrol no puede considerarse terminada, particularmente en regiones en las no se han colectado cepas y que tienen relevancia agronómica, con cultivos que son atacados por especies o variedades de microorganismos fitopatógenos de difícil contención y que causan pérdidas económicas.

### **1.6 Comunidades de *Trichoderma* spp. en agroecosistemas**

La diversidad de la comunidad de especies de *Trichoderma* en distintos estudios muestra resultados contrastantes, dependientes de la escala del muestreo y el tipo de nicho/compartimento del agroecosistema analizado. Así, al analizar la rizósfera de áreas con distinto tipo de vegetación a lo largo de la isla de Tenerife (España), se encontraron solo a las especies *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. cf. tomentosum*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. viride* Ve (Zachow et al., 2009). En relación a las áreas agrícolas, el análisis de rizosfera de plantaciones de café en Etiopía mostró la presencia de las especies *T. harzianum sensu lato*, *T. hamatum*, *T. asperelloides*, *T. spirale*, *H. atroviridis/T. atroviride*, *H. koningiopsis/T. koningiopsis*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* (Belayneh-Mulaw et al., 2010). A nivel de planta, se ha encontrado que en hojas de cacao de distintas regiones prácticamente la única especie presente es *T. asperellum* (Rosmana et al., 2015). Como se mencionó anteriormente, Larralde y colaboradores (2008), encontraron a nueve cepas de

*Trichoderma* de las cuales solo fueron 6 especies distintas: *T. atroviride*, *T. citriniviride*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum* y *T. reesei*. Por otra parte, existe evidencia filogenética y ecológica que indica que, dentro de un mismo ecosistema, a nivel global, existen especies de *Trichoderma* específicas de tejido foliar de las plantas, así como aquellas que son específicas de suelo, es decir, habrá algunas especies exclusivas por cada nicho o compartimento (Chaverri y Samuels, 2013).

La evidencia anterior indica que al analizar los compartimentos de un agroecosistema, se encontrará baja diversidad de especies de *Trichoderma* en cada compartimento analizado, pero las especies serán distintas entre éstos. Adicionalmente, los estudios previos muestran que en general, cuando se realizan análisis para evaluar la comunidad de *Trichoderma* spp. en agroecosistemas, se estudia de manera independiente a las especies endófitas de raíz de las de tejido foliar y las de suelo, por lo que a la fecha no existe ningún estudio en el que de manera simultánea se estudie la diversidad de especies en los tres tipos de muestras. Dado lo anterior, no existen comparaciones de la eficiencia antagónica *in vitro* contra hongos fitopatógenos entre especies/cepas de *Trichoderma* provenientes de los tres compartimentos mencionados de un agroecosistema, evidencia que puede revelar diferencias ecofisiológicas inter-específicas en especies/cepas de un mismo ambiente.

## **1.7 Caracterización de especies de *Trichoderma***

### Identificación genético-molecular

A la fecha se han identificado y clasificado 254 especies de *Trichoderma* (Bissett et al. 2015). Para una adecuada comprensión de las propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas de una cepa de aislamiento reciente, se requiere de la acertada ubicación taxonómica. 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. En la actualidad se considera una identificación integral incluir aspectos fisiológicos, morfológicos y genéticos en la

asignación taxonómica de una cepa, a lo cual se le denomina identificación polifásica (Das et al., 2014), estrategia aplicada en la identificación de especies de *Trichoderma* spp. en distintos trabajos (Kubicek et al., 2003; Hoyos-Carbajal et al., 2009; Larralde-Corona et al., 2008). En esta aproximación polifásica el uso de más de una región genética para la identificación de cepas fúngicas mediante el análisis filogenético es lo más adecuado. En el caso de *Trichoderma* spp. es necesario incluir, además de la región ITS, los genes de TEF,  $\beta$ - tubulina, Topoisomerasa II, Cadmodulina, entre otros (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Samuels, 2006).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El sorgo tiene una gran relevancia no solo por su papel en la alimentación y como forraje, sino también desde un punto de vista socioeconómico y biotecnológico. Debido a la gran diversidad de aplicaciones de dicha planta y a que es el tercer cultivo en área cultivada en México, el estudio de los factores que afectan su productividad es de relevancia para el país. Uno de estos factores asociados a la productividad del sorgo, es la microbiota asociada a dicho cultivo, particularmente las especies fúngicas con potencial para inhibir a los fitopatógenos de la misma planta. Uno de los géneros de hongos de particular relevancia asociado al cultivo del sorgo y poco estudiado en dicha planta es *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* tienen una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas, incluida la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, la producción de enzimas hidrolíticas y en formulaciones para el control de microorganismos fitopatógenos. No obstante dicha relevancia, el estudio de especies de *Trichoderma* asociadas al cultivo de sorgo es escaso, y en México solo existe un reporte al respecto. Además, no existe un estudio que compare las especies de *Trichoderma* spp. en distintos compartimentos del agroecosistema de sorgo. Esto es importante para encontrar un buen agente biocontrolador hacia fitopatógenos que atacan tejido foliar o penetran por la raíz. Por lo anterior, en este trabajo se planteó el aislamiento e identificación de especies de *Trichoderma* en tejido foliar, raíz y rizósfera de sorgo. Es de esperar que los resultados obtenidos, además de generar información básica sobre las comunidades de *Trichoderma* spp. presentes en sorgo, contribuyan a encontrar cepas del género con potencial para su uso en productos de biocontrol.



### 3. HIPÓTESIS

La comunidad de *Trichoderma* spp. en un cultivar de sorgo de Tarímbaro, Michoacán presenta una composición de especies distinta entre el tejido foliar, la raíz y el suelo, con baja diversidad de especies en cada uno de estos compartimentos.

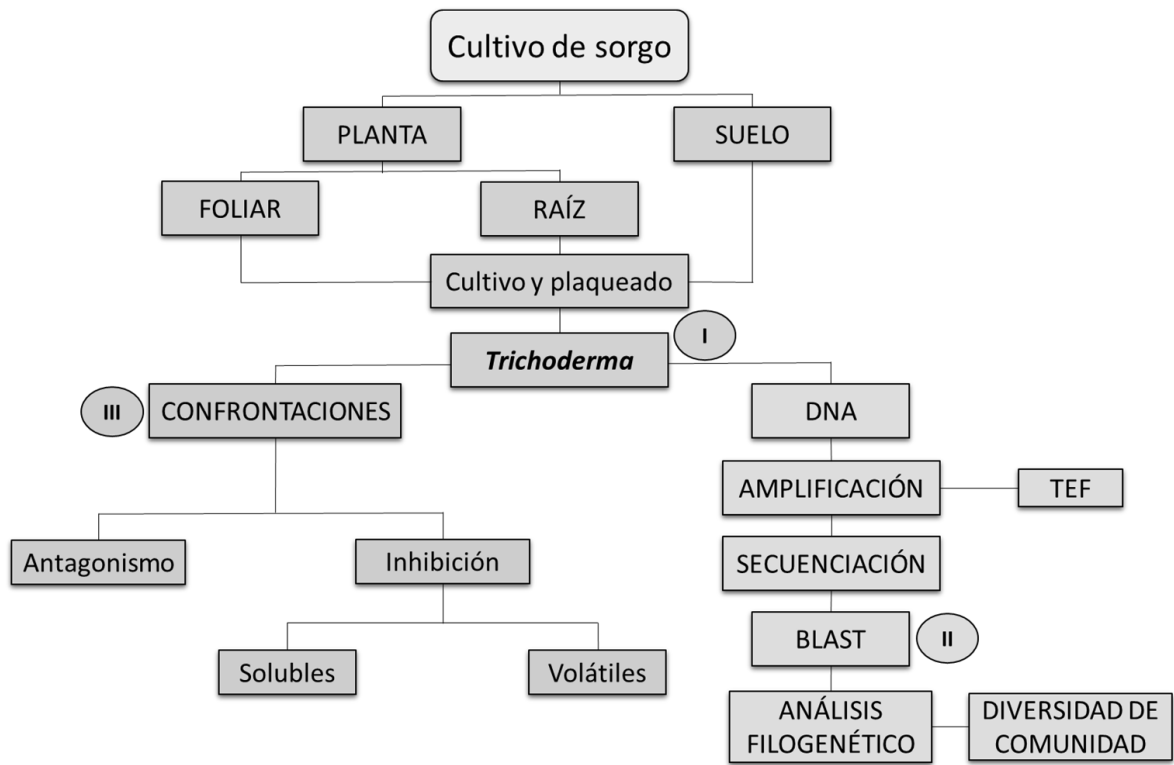
### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General

Describir y analizar la comunidad de *Trichoderma* spp. en tres compartimentos del agroecosistema de sorgo.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- i. Obtener aislados de *Trichoderma* spp. de suelo, endófitos de raíz y tejido foliar de sorgo.
- ii. Identificar las especies de *Trichoderma* de los aislados obtenidos.
- iii. Analizar la capacidad antagónica *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* aisladas contra hongos y oomycetes fitopatógenos.

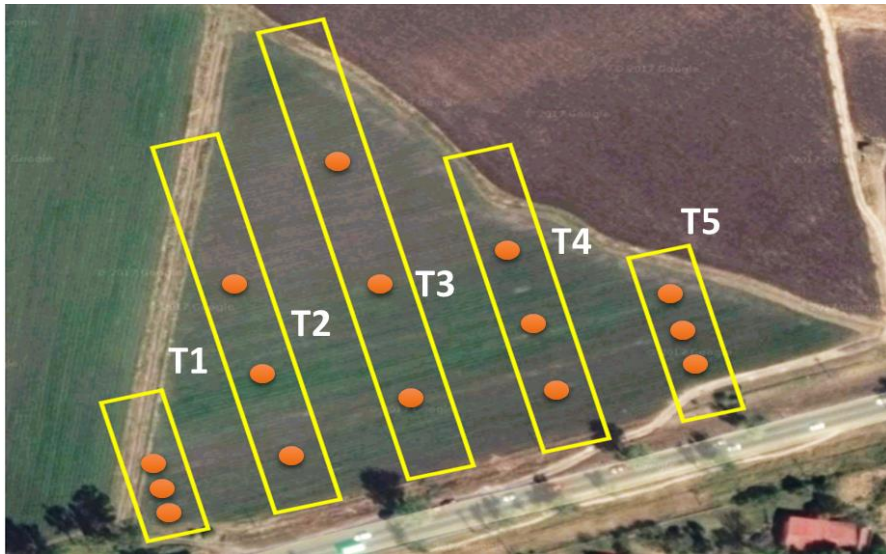


**Figura 1. Estrategia general**

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Descripción del área de estudio y muestreo

El área de estudio se encuentra en el municipio de Tarímbaro del estado de Michoacán, ubicado en las coordenadas 19°48' de latitud norte y 101°10' de longitud oeste, a una altura de 1,860 metros sobre el nivel del mar. Se presenta un clima templado con lluvias en verano. El área de cultivo es de 25,000 m<sup>2</sup> y la región dentro de la cual se encuentra, tiene una precipitación pluvial anual de 609.0 mm y temperatura promedio de 25°C (INAFED, 2017). La producción de sorgo en el municipio de Tarímbaro para el año 2015 fue de 4,770 toneladas (Infosiap, 2017).



**Figura 2.** Área de muestreo con el diseño de los transectos.

El muestreo se realizó durante el ciclo correspondiente al año 2017, en octubre. En el área se establecieron cinco transectos de 13 m de ancho sobre los cuales se caminó en zigzag tomando tres muestras de suelo y tres plantas por transecto (Figura 2). El muestreo de suelo se realizó con un muestreador de 50 cm de longitud y 20 cm de diámetro. Las muestras de plantas y suelo se colocaron en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio. El suelo se secó y se procesó para hacer diluciones en la misma semana de colecta de las muestras. Las plantas se lavaron y para el aislamiento de hongos se procesaron como se describe más adelante, en la misma semana de colecta.

## 5.2 Medios de cultivo

Medio agar papa dextrosa (PDA, Bioxon USA)

Se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se re- suspendieron 39 g de medio en un litro de agua destilada y se esterizaron en autoclave a 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 min. Para el aislamiento de cepas fúngicas del tejido foliar y de raíz, el medio se suplementó con rosa de bengala (0.02 g/L), cloranfenicol (0.3 g/L) y sulfato de estreptomicina (0.02 g/L), ajustando a un pH de 5.0. Este medio también se empleó para el mantenimiento y resiembra de las cepas de hongos y oomicetes fitopatógenos de prueba.

Medio selectivo de *Trichoderma* (TSM)

Se empleó para aislar cepas del género *Trichoderma* de muestras de tejido foliar, de raíz y suelo, preparándose de acuerdo a la modificación de Elad et al (1981). Este medio contiene por litro: 0.2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.9 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.15 g de KCl, 0.15 g de rosa bengala, 3 g de glucosa, y 20 g de agar. El medio se esterilizó en autoclave de la manera previamente descrita, y una vez que se enfrió se agregaron por litro los siguientes ingredientes antimicrobianos: 0.25 g de cloranfenicol, 9.0 mL de solución stock de estreptomicina (1% p/v), 0.2 g de quintozeno y 1.2 mL de clorhidrato de propamocarb (772 g de ingrediente activo por litro).

Medio mínimo de Vogel (MMV)

Se preparó a partir de una solución stock (50X) compuesta por (g/L): Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O, 150; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5; biotina (5 mg/100 mL etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de oligoelementos contiene (g/L): ácido cítrico·2H<sub>2</sub>O, 5; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 5; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.072; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.05. El stock se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionaron 1.5 g/L de dextrosa y 15 g/L agar bacteriológico. El medio así preparado, se esterilizó de la manera previamente descrita. Este medio se utilizó para evaluar la actividad antagónica *in vitro* de las

cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas en contra de los fitopatógenos de prueba, así como para el mantenimiento del micelio vegetativo de los aislados de *Trichoderma* spp. y la generación de inóculos.

### **5.3 Aislamiento de hongos en cultivo axénico**

#### *Aislamiento de hongos de muestras de tejido foliar y de raíz*

Para el aislamiento de hongos de tejido foliar y de raíz se cortaron segmentos de 5 mm de ambos tejidos sin signos de infección y sin daño aparente. Estos fragmentos se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 5% (p/v) y posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Las muestras se secaron con papel absorbente esterilizado y se colocaron en el medio PDA suplementado anteriormente descritos, incubando de 2 a 7 días a 28 °C.

#### *Aislamiento de hongos de muestras de suelo*

Para el aislamiento de hongos de suelo del área de estudio se empleó 1 g de muestra que se suspendió agitando vigorosamente en 10 mL de agua destilada estéril. De la suspensión original, se realizaron diluciones seriales hasta obtener una dilución  $10^{-4}$ , de la cual se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L que se distribuyó homogéneamente en el medio PDA suplementado, incubando de 2 a 7 días a 28 °C.

### **5.4 Nomenclatura utilizada**

La nomenclatura utilizada para los aislados endófitos fue la siguiente, la “T” representa transecto que con el número siguiente representa al número de transecto de donde se obtuvo el aislado (T1), seguido de la letra que representa al compartimento que para el caso de los aislados del tejido foliar se representó con la letra H (hoja) para diferenciarlos de los obtenidos en la raíz que se representaron con la letra R, y por último una letra asignada para diferenciar entre los aislados por transecto (A). En el caso de los aislados del suelo la nomenclatura fue distinta iniciando con el número de transecto seguido de la letra T que representa al

transecto (1T), seguido de un número de asignación y la una letra G al final para diferenciarlos de los otros compartimentos.

### 5.5 Cepas de organismos fitopatógenos de prueba

Las pruebas de confrontación se realizaron con los microorganismos fitopatógenos que se muestran en la Tabla 1, los cuales fueron proporcionados por la Dra. Sylvia Fernández Pavía y el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales (IIAF), así como por el Dr. Salvador Ochoa de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan Michoacán.

<b>Tabla 1. Microorganismos fitopatógenos de prueba.</b>			
Clave	Especie	Cultivo/planta que infecta	Localidad de Procedencia
<b>Género <i>Fusarium</i></b>			
FM	<i>Fusarium mexicanum</i>	Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	Buenavista Tomatlán, Mich.
FP	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	Caoba ( <i>Swietenia</i> sp.)	Tecomán, Col.
FU	<i>Fusarium</i> spp.	Zarzamora ( <i>Rubus ulmifolius</i> )	Los Reyes, Mich.
<b>Género <i>Colletotrichum</i></b>			
CA	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Aguacate ( <i>Persea americana</i> )	Uruapan, Mich.
CC	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Morelia, Mich.
CG1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Formio ( <i>Phormium tenax</i> )	Morelia, Mich.
CG2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Aguacate ( <i>Persea americana</i> )	Uruapan, Mich.
<b>Oomycetes del género <i>Phytophthora</i></b>			
PCA	<i>Phytophthora capsici</i>	Chile ( <i>Capsicum annum</i> )	Cuitzillo, Mich.
PC1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Aguacate ( <i>Persea americana</i> )	Atécuaro, Mich.
PC2	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Aguacate ( <i>Persea americana</i> )	Uruapan, Mich.

### 5.6 Análisis genético molecular

#### *Extracción de ADN*

El ADN genómico se extrajo de muestras de micelio recuperado de cultivos en medio PDA con 72 h de crecimiento. El micelio se congeló con N<sub>2</sub> líquido, se pulverizó en un mortero y se transfirió a un microtubotubo de centrifuga de 1.5 mL al cual se le adicionaron 400 µL de regulador de lisis (SDS 0.5% p/v, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.5) y 150 µL de acetato de sodio 3M, pH 5.2, incubando a -20°C por 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se aplicó un shock térmico a una temperatura de 75°C. Se centrifugó a 11,300 x g por 10 min, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregó 1 µL de RNasa (0.5 U/ µL) incubando a 37°C por 30 min. Posteriormente, se agregó un volumen de

isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, centrifugando de la manera previamente descrita. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 300  $\mu$ L de etanol al 70%. Después de que se evaporara por completo el etanol residual, la pastilla de ADN se disolvió en 50  $\mu$ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso. La calidad del ADN obtenido se comprobó en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con Syber Safe (Invitrogen, USA) a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sambrook y Russel, 2001).

### *Ensayos de PCR*

El ensayo de la amplificación de la región ITS (*ITS1-5.8-ITS2*) de la Unidad Ribosomal Nuclear de los hongos aislados se llevó a cabo utilizando el par de oligonucleótidos ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC -3') (White et al., 1990). Para la amplificación del gen del factor de elongación de la traducción  $1\alpha$  (*tef1*), se utilizaron los primers específicos para *Trichoderma* spp.: *tef1fw* (5'-GTGAGCGTGGTATCACCATCG-3 ') y *tef1rev* (5'-GCCATCCTTGAGACCAGC-3') (Kullnig-Gradinger et al., 2002). La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: Buffer Tris-HCl (10 mM, pH 8.0),  $\text{MgCl}_2$  (1.5 mM), dNTP's (0.25 mM de cada uno), 0.5 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, USA) y 2.5 ng totales de ADN. El volumen final se ajustó a 25  $\mu$ L con agua desionizada esterilizada. El protocolo de amplificación fue el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos seguido de 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, en la tabla 2 se muestran las temperaturas de alineamiento de cada muestra, por 30 segundos y  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, con una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa 1% teñidos con Syber Safe (Invitrogen, USA), y fueron secuenciados por Elim Biopharmaceuticals, Inc. (Hayward, CA, USA).

<b>Tabla 2: Temperatura de alineamiento de los aislados del estudio para el primer (tef 1- <math>\alpha</math>)</b>		
<b>Compartimento</b>	<b>Aislado</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>Tejido foliar</b>	T2HF	68
	T4HD	66
	T5HD	66
<b>Raíz</b>	T3RC	55
	T4RB	55
<b>Suelo</b>	2T6G	55
	2T7G	55
	2T8G	55
	2T21G	55
	2T22G	55
	3T9G	55
	3T17G	55

### *Análisis filogenético*

Las secuencias se editaron de manera manual para remover los extremos en los cuales no se podía asignar los nucleótidos correspondientes. Las secuencias se compararon con las ya existentes registradas en las bases de datos de GenBank por medio del algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997). Las secuencias con mayor porcentaje de similitud con respecto a las obtenidas en este trabajo se seleccionaron para realizar un alineamiento múltiple mediante el programa MEGA X (Kumar et al., 2018). En este mismo paquete, se determinó el mejor modelo evolutivo con el cual se calcularon las distancias genéticas entre las secuencias analizadas. Con las distancias genéticas así calculadas se construyeron árboles filogenéticos mediante el criterio de Máxima Similitud (ML) con 1000 iteraciones bootstrap.

### **5.7 Cinéticas de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos.**

Fueron necesarias cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio MMV las cuales se inocularon colocando un cilindro de 6 mm de diámetro, en el centro de la placa, obtenido del borde de una colonia en crecimiento de cada aislado evaluada, una vez inoculado se incubaron a 25 °C en obscuridad. El diámetro colonial se midió cada 12 h hasta que el micelio cubrió la caja. Cada ensayo se realizó por triplicado.



## 5.8 Ensayos de antagonismo

Para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990), la cual se describe brevemente a continuación. Para cada experimento se inoculó en un extremo de cajas Petri de 9.0 cm de diámetro con MMV un disco de 6 mm de diámetro con micelio en crecimiento activo de las distintas especies de hongos fitopatógenos, permitiendo el desarrollo de la colonia a 28 °C durante 3 a 5 días, dependiendo de la aislado. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se inoculó un disco de 6 mm de diámetro tomado del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp. Para su confrontación, las cepas se inocularon a una distancia de 6 cm y se incubaron a 28 °C, en obscuridad. A los 15 días de incubación, cada confrontación *Trichoderma* sp.- fitopatógeno se clasificó determinando el tipo de antagonismo según Bell et al. (1982), mediante la escala: 1 = *Trichoderma* sp. sobrecrece completamente al fitopatógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2 = *Trichoderma* sp. sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3 = *Trichoderma* sp. y el fitopatógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 5.9 Ensayos de inhibición

### a) Inhibición por metabolitos secundarios solubles

Se utilizó el método del papel celofán (Dennis y Webster, 1971), que consistió en cortar papel celofán en círculos de 9.0 cm de diámetro, los cuales se lavaron con agua destilada y se esterilizaron a 121 °C (15 lbs/in<sup>2</sup>) por 15 min. Los círculos de papel celofán así preparados se colocaron en condiciones asépticas en campana de flujo laminar sobre cajas de Petri con MMV solidificado. En el centro de la placa de Petri, sobre el papel celofán, se colocó un inóculo cilíndrico de 6 mm de diámetro tomado del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp., incubándose a 28 °C. Cuando el micelio cubrió  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie del medio de cultivo, en campana de flujo laminar se retiró el papel celofán

con la colonia fúngica adherida. En el mismo medio, se inoculó un disco de 6 mm de diámetro con micelio en crecimiento activo de las distintas especies de hongos fitopatógenos, incubándose a 28 °C y midiendo cada 24 h el diámetro del crecimiento radial. De la misma manera, en el mismo medio de cultivo se inoculó e incubó una caja control, en la que no había crecido previamente *Trichoderma* spp. El experimento finalizó cuando el micelio del microorganismo fitopatógeno del cultivo control llenó la caja de Petri. Los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos, se utilizó la siguiente fórmula (Worasatit et al., 1994):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

Dónde: D1 = diámetro de la colonia del microorganismo fitopatógeno creciendo en cajas con MMV libre de inhibidores y D2 = diámetro de la colonia del mismo microorganismo creciendo en cajas con MMV, en la cual previamente creció *Trichoderma* spp. sobre el papel celofán.

Se clasificó el tipo de inhibición según su nivel de actividad, donde:

clase 1 = *Trichoderma* sp. inhibe del 67 al 100% del crecimiento del fitopatógeno,  
 clase 2 = *Trichoderma* sp. inhibe del 34 al 66% del crecimiento del fitopatógeno,  
 clase 3 = *Trichoderma* sp. inhibe del 1 al 33% del crecimiento del fitopatógeno.

#### b) Inhibición por metabolitos secundarios volátiles

Para evaluar si las especies de *Trichoderma* estudiadas generan sustancias volátiles que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos se utilizó la técnica de cultivos enfrentados de Dennis & Webster (1971). Se utilizaron inóculos cilíndricos de micelio de 6 mm de diámetro de una colonia del fitopatógeno en crecimiento activo, los cuales se colocaron en el centro de placas de Petri con MMV y se incubaron a 28 °C. Después de 72 h de incubación, en campana de flujo laminar se le quitó la tapa a la caja de Petri y la parte de la caja con medio y la colonia en crecimiento se acopló a la parte de la caja con micelio y medio de un cultivo de las cepas de *Trichoderma* spp. obtenida de la misma manera. Una vez que las placas

fueron acopladas, se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C durante 7-9 días, colocando la parte con la colonia de *Trichoderma* spp. como base y la del fitopatógeno como tapa, quedando en la parte superior. Como control se empleó el fitopatógeno acoplado a una base conteniendo únicamente MMV, sin *Trichoderma*. Por último, para medir el crecimiento del fitopatógeno y determinar el porcentaje de crecimiento inhibido por compuestos volátiles se utilizó la fórmula de Worasatit et al. (1994), previamente descrita. El experimento finalizó cuando el micelio del microorganismo fitopatógeno del cultivo control llenó la caja de Petri. Los ensayos se realizaron por triplicado.

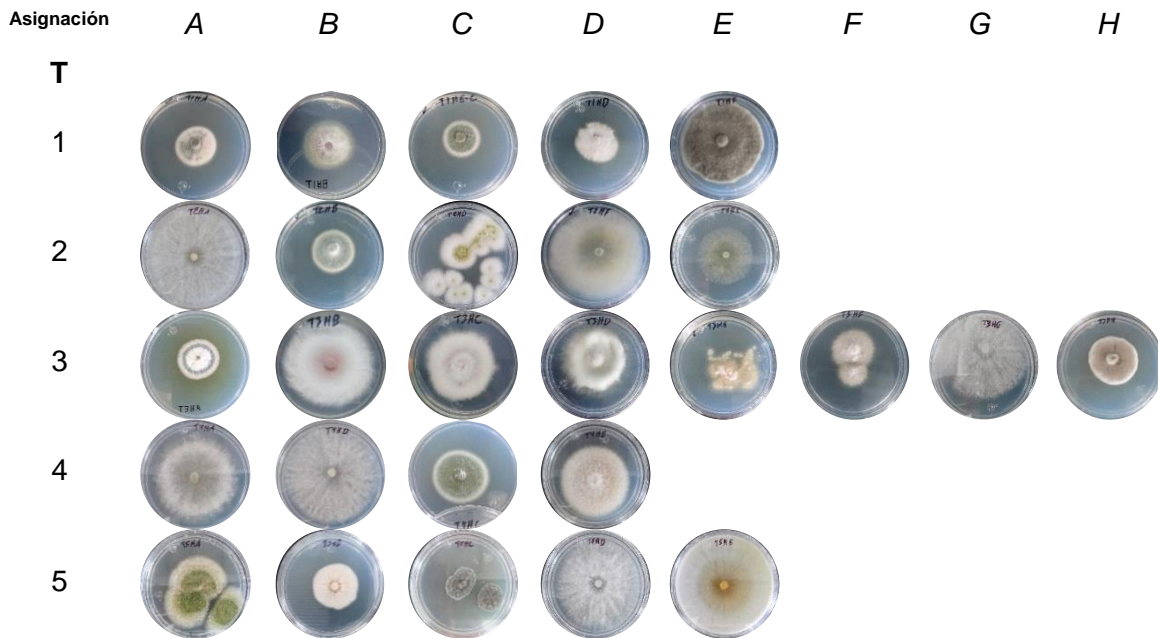
## 6. RESULTADOS

### 6.1 AISLADOS FÚNGICOS ASOCIADOS EN DIFERENTES COMPARTIMENTOS DEL SORGO

En el muestreo realizado se obtuvieron 171 aislados fúngicos, de los cuales 42 fueron aislados como endófitos del tejido foliar y 33 como endófitos de raíces de las plantas del sorgo, los otros 96 aislados fueron del suelo (Tabla 3). Empleando criterios morfológicos macroscópicos como textura, color, presencia de micelio aéreo, patrones de esporulación asexual, entre otros, se descartaron aquellos aislados que presentaban las mismas características o aspectos muy similares para no tener duplicados. Esta selección solo se hizo por transecto y por cada compartimento muestreado, de tal forma que entre transectos y muestras se conservaron aislados similares. Todos aquellos aislados que presentaron características propias de *Trichoderma* spp. se conservaron, independientemente de su similitud morfológica. Después de la selección, el total de aislados se redujo a 127, de los cuales 49 fueron aislados endófitos encontrando 27 en tejido foliar y 22 en raíz, mientras que 69 aislados provenían de las muestras de suelo (Tabla 3).

<b>Tabla 3. Aislados de hongos obtenidos en cada compartimento del agroecosistema de sorgo.</b>							
<b>TRANSECTO</b>		<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TOTALES</b>
<b>COMPARTIMENTO</b>							
<b>Tejido foliar (F)</b>	Antes→	7	9	12	6	8	42
	Después→	5	5	8	4	5	27
<b>Raíz (R)</b>	Antes→	7	6	9	5	6	33
	Después→	7	4	5	3	3	22
<b>Suelo (S)</b>	Antes→	17	28	27	15	9	96
	Después→	15	20	19	9	6	69

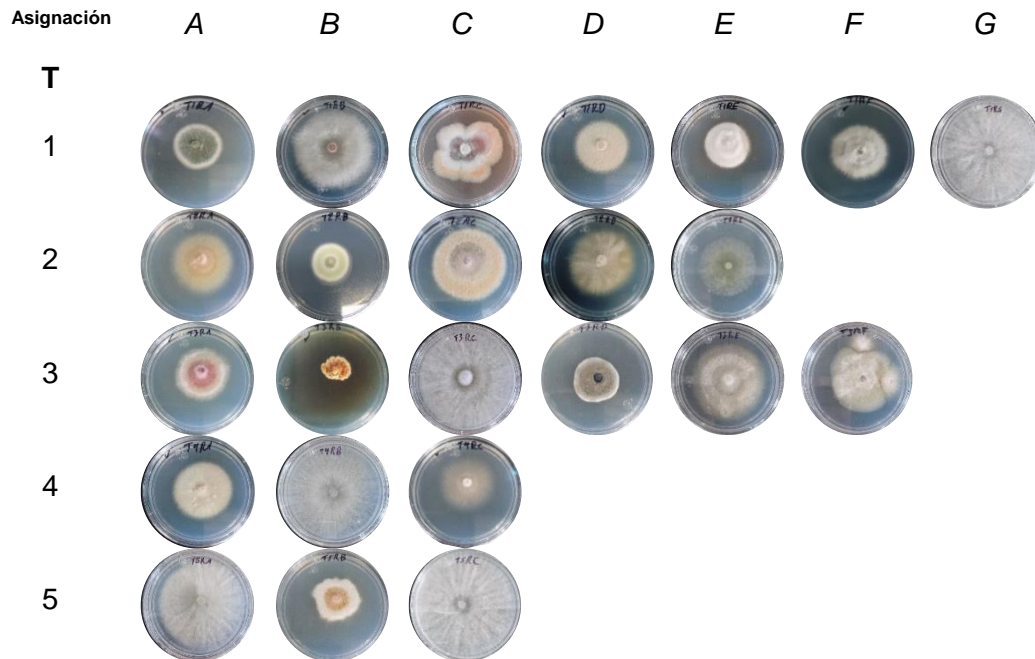
Numero de aislados en cada uno de los cinco transectos por compartimento. Antes: número de aislados totales, Después: número de aislados después de la selección



**Figura 3. Aislados fúngicos de tejido foliar de las plantas de sorgo evaluadas.** Letras de asignación: A, B, C, D, E, F, G y H. Numero de transecto (T): 1, 2, 3, 4 y 5

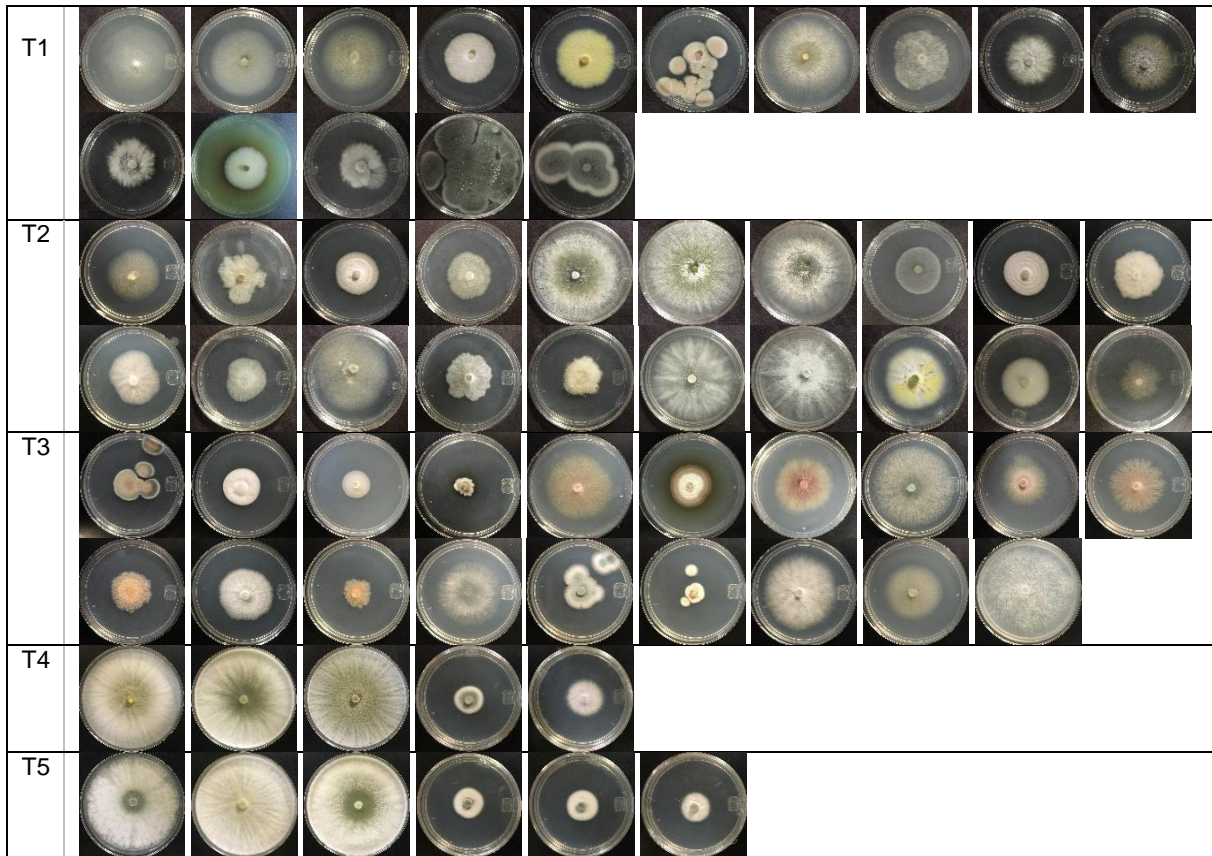
Se puede observar en la Figura 3 que la mayoría de los aislados de tejido foliar presentan morfologías características de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Visagie et al., 2014; Samson et al., 2014; Watanabe, 2010). La diversidad de especies encontrada es similar a la que fue descrita por Del Palacio et al (2016) en raíz, mientras que Stockholm et al (2016) encontró a especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* en granos del sorgo. Por otro lado, en otro estudio en donde aislaron especies fúngicas de tallos y raíces durante el crecimiento de plantas de sorgo, obtuvieron especies fúngicas en una etapa madura de la planta de sorgo (14 16 y 18 semanas), especies de los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma* y *Epicoccum*, éste último, no se encontró en nuestro estudio ya que ningún aislado presentaba las características propias del género (Reed et al., 1983; Partridge et al., 1984).

La figura 4 muestra los aislados de raíz, la cual presentó una gran diversidad de especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, entre otros. Encontrando solamente un aislado con características morfológicas similares al género *Alternaria* (aislado T3RB).



**Figura 4. Aislados fúngicos de raíz de las plantas de sorgo evaluadas.**  
 Letras de asignación: A, B, C, D, E, F y G. Numero de transecto (T): 1, 2, 3, 4 y 5

Con respecto a los aislados de suelo (Figura 5), estos presentaron una mayor diversidad que la encontrada para tejido foliar y raíz. Los aislados presentan morfologías similares a los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Colletotrichum*, entre otros.



**Figura 5. Aislados fúngicos del suelo del agroecosistema del sorgo de estudio.** Número de transecto (T): 1: 15 aislados, 2: 20 aislados, 3: 19 aislados, 4: 5 aislados y 5: 6 aislados.

## 6.2 *Trichoderma* spp. AISLADOS DE LOS TRES COMPARTIMENTOS DE SORGO

Se identificaron tres aislados con características morfológicas de *Trichoderma* spp. en tejido foliar, dos en raíz y siete en suelo. En este estudio se aislaron siete cepas con características morfológicas distintas, por lo que estos datos coinciden con estudios previos que documentan, encontrando una baja diversidad de especies de *Trichoderma* por compartimento, en donde además se presentan especies distintas.

### 6.2.1 Aislados de *Trichoderma* spp. del tejido foliar.

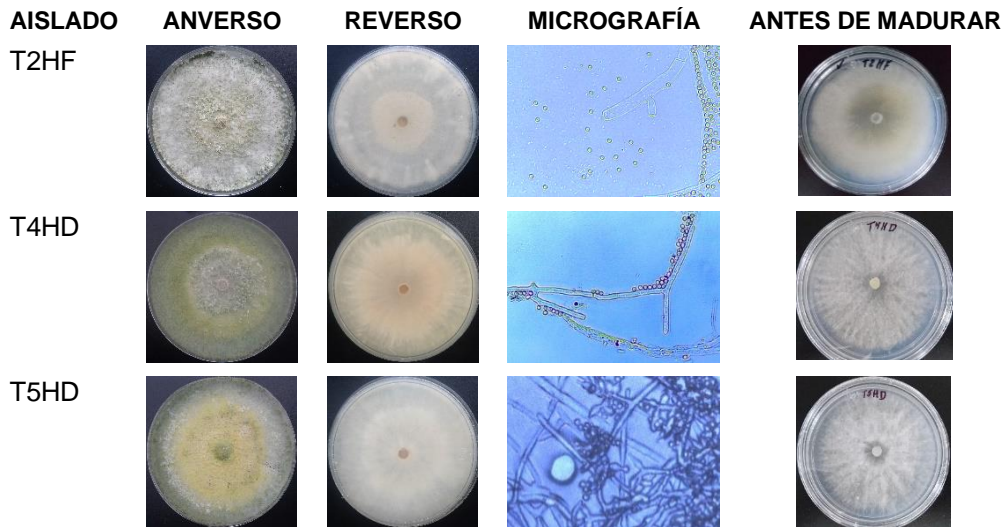
De los 27 aislados del tejido foliar, tres presentaron características morfológicas típicas del género *Trichoderma*. La identificación microscópica preliminar de los aislados fue en base a las características del género como son los conidióforos

hialinos, ramificados, no verticilados, fialides individuales o en grupo, conidias ovoides nacidas en racimos terminales,

El aislado T2HF cubrió la placa de medio PDA en cinco días a 25 °C, formando a los 14 días una colonia circular elevada de color gris pálido y textura granular y aterciopelada con pústulas color verde ceniza (conidias), las cuales comenzaron a aparecer al día siete (Tabla 4) con un anillo concéntrico amarillo muy tenue, mostrando al reverso de la placa una coloración perla. Las conidias observadas al microscopio mostraron una forma similar a la de los glóbulos rojos y emiten una coloración verde brillante, (Figura 6).

El aislado T4HD cubrió la placa de medio PDA en cuatro días a 25 °C y a los 14 días formó una colonia circular elevada de la cual se generaron anillos con diferentes tonalidades de verde, al centro un anillo concéntrico con pústulas, con textura lanosa, cuyas conidias aparecieron a los 6.5 días (Tabla 4) que después de una tonalidad amarillenta, cambiaron a verde oliva, apareciendo primero en la circunferencia de la colonia hacía al centro de la misma y al reverso de la colonia una coloración hueso. Al observarlas al microscopio las conidias mostraron una forma ovoide y un ligero color verde (Figura 6).

El aislado T5HD cubrió la placa de medio PDA en cuatro días a 25 °C y a los 14 días formó una colonia circular aplanada al centro de color verde amarillento con textura aterciopelada, en la periferia de la placa una coloración verde olivo dividiéndola del centro un anillo con pústulas blanquecinas, las conidias aparecieron en la periferia de la placa con una coloración amarillenta a los 6.5 días (Tabla 4) que después cambiaron a verde oliva. Al reverso de la colonia se observó una coloración blanquecina. Las conidias observadas al microscopio presentaban una forma ovoide con una tonalidad verde (Figura 6).



**Figura 6. *Trichoderma* spp. aislados del tejido foliar del sorgo. Nota:**  
Micrografía 40X

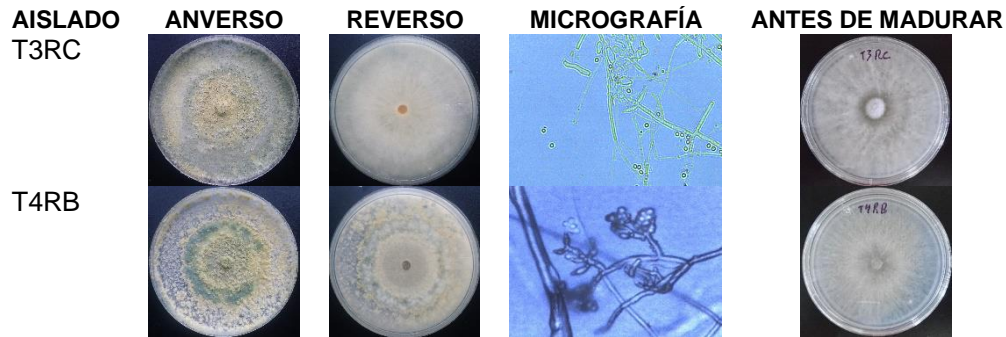
### 6.2.2 Aislados de *Trichoderma* spp. de raíz

De los 22 aislados de la raíz, dos presentaron características morfológicas del género *Trichoderma*.

El aislado T3RC logró cubrir la placa de medio PDA en 3.5 días a 25 °C, y a los 12 días, formó una colonia circular elevada de color verde ceniza y textura semi-granular con pústulas, formadora de anillos concéntricos y al reverso de la colonia una coloración blanquecina, comenzando a conidiar a los seis días en la periferia y en los anillos amarillentos que cambiaron a verde olivo. Las conidias observadas al microscopio presentaron una forma ovoide con un ligero tono verde (Figura 7).

El aislado T4RB cubrió la placa de medio PDA en 4.5 días a 25 °C, a los 12 días formó una colonia semi-circular con un anillo concéntrico verde olivo y al centro una tonalidad verde limón con textura aterciopelada con pústulas. Las conidias comenzaron a aparecer a los 4.5 días (Tabla 4) en pústulas en color verde ceniza que cambiaban a amarillo y un definitivo verde olivo. Al observarlas al microscopio, las conidias presentaron una forma de disco elipsoidal con tonalidad verde brillante

y al reverso la colonia, tenía una coloración hueso y beige, donde se notaban mejor los anillos que este aislado forma (Figura 7).



**Figura 7. *Trichoderma* spp. aislados de la raíz del sorgo.** Nota: Micrografía 40X

### 6.2.3 Aislados de *Trichoderma* spp. del suelo

De los 69 aislados del suelo, siete presentaron características morfológicas del género *Trichoderma*.

El aislado 2T6G logró cubrir la placa de medio PDA en tres días a 25 °C, y a los 10 días formó una colonia circular elevada color verde oliva y al centro amarillo limón, de la que se generaron anillos, con textura lanosa. Las conidias empezaron a aparecer a los 2.5 días (Tabla 4) y conforme crecía la colonia produjo conidias de manera abundante. Al ser observadas en el microscopio, las conidias mostraron una forma de disco elipsoidal; por ultimo al reverso de la placa se apreciaba una colonia central color hueso con hifas hialinas que se extendieron en la placa (Figura 8).

El aislado 2T7G presentó características similares, pero no iguales al aislado 2T6G, cubriendo la placa de medio PDA en 2.5 días a 25 °C y a los 10 días formó una colonia circular elevada color verde oliva y al centro amarillo-limón, formadora de anillos, con textura lanosa. Las conidias empezaron a aparecer a los dos días (Tabla 4) y conforme crecía, ésta conidiaba de color verde olivo y al observarlas al microscopio tenían una forma similar a los glóbulos rojos. Al reverso, al igual que el

aislado 2T6G, se apreciaba una colonia central de color beige con hifas hialinas que se extendían en la placa (Figura 8).

El aislado 2T8G en medio PDA cubrió la placa en tres días a 25 °C y a los 10 días, formó una colonia circular elevada algodonosa blanca, formadora de anillos y con textura granular con pústulas verdes que a los 5.5 días (Tabla 4) comenzó a formar conidias de una tonalidad blanca que cambiaban a verde y conidiaba conforme crecía. Al ser observadas al microscopio (40X), las conidias presentaron forma de óvalo con una ligera tonalidad verde; al reverso de la placa se apreciaban las hifas hialinas y los puntos de las pústulas que habían formado color hueso, con mayor intensidad al centro de la placa (Figura 8).

El aislado 2T21G cubrió la placa de medio PDA en 3.5 días a 25 °C, formando a los 10 días de incubación una colonia circular aplanada y aterciopelada de la cual se generaron anillos verdes y amarillos al centro de color verde amarillento, con textura aterciopelada. En la periferia de la placa la colonia adquirió una coloración verde olivo y dividiéndola desde el centro un anillo verde olivo. Las conidias aparecieron como pústulas a los tres días (Tabla 4), conidias en forma de óvalo y una tonalidad muy débil de color verde, y al reverso de la placa una coloración beige con más intensidad al centro que se observó donde se formaron las pústulas (Figura 8).

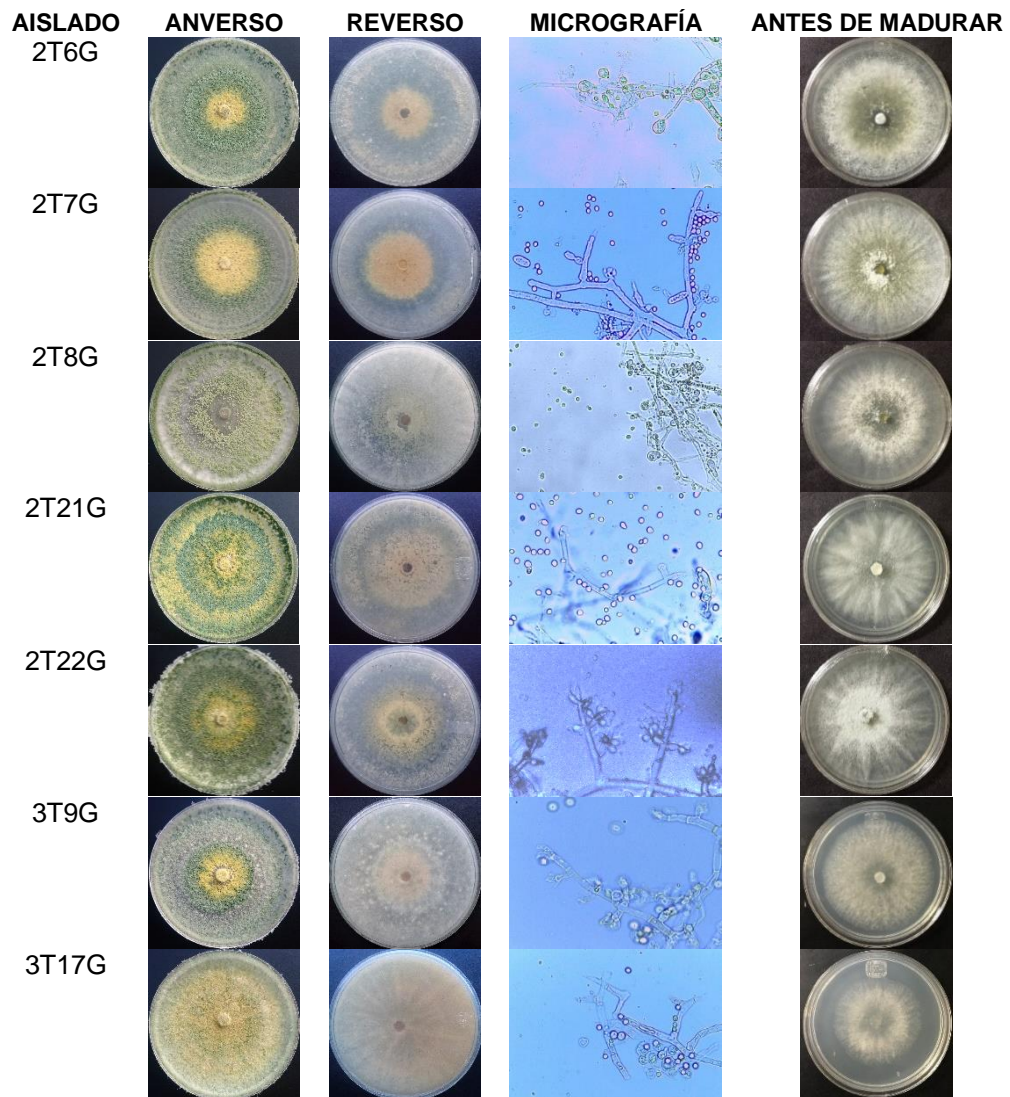
El aislado 2T22G cubrió la placa de medio PDA en 3.5 días a 25°C, formando a los 10 días de crecimiento una colonia circular algodonosa, aplanada en la cual se generaron anillos verdes y amarillos, adquiriendo al centro un color verde amarillento y con menor cantidad de biomasa en la periferia. Las conidias aparecieron a los tres días (Tabla 4) mostrando una textura aterciopelada y una forma de óvalo con una coloración tenue de verde; al reverso de la placa una coloración beige con más intensidad al centro y se aprecia la zona en donde se formaron las pústulas (Figura 8).



<b>Tabla 4. Tiempo de conidiación</b>		
<b>COMPARTIMENTO</b>	<b>AISLADO</b>	<b>DÍAS EN CONIDIAR</b>
Tejido foliar	T2HF	7
	T4HD	6.5
	T5HD	6.5
Raíz	T3RC	6
	T4RB	4.5
Suelo	2T6G	2.5
	2T7G	2.5
	2T8G	5.5
	2T21G	3
	2T22G	3
	3T9G	2.5
	3T17G	4.5

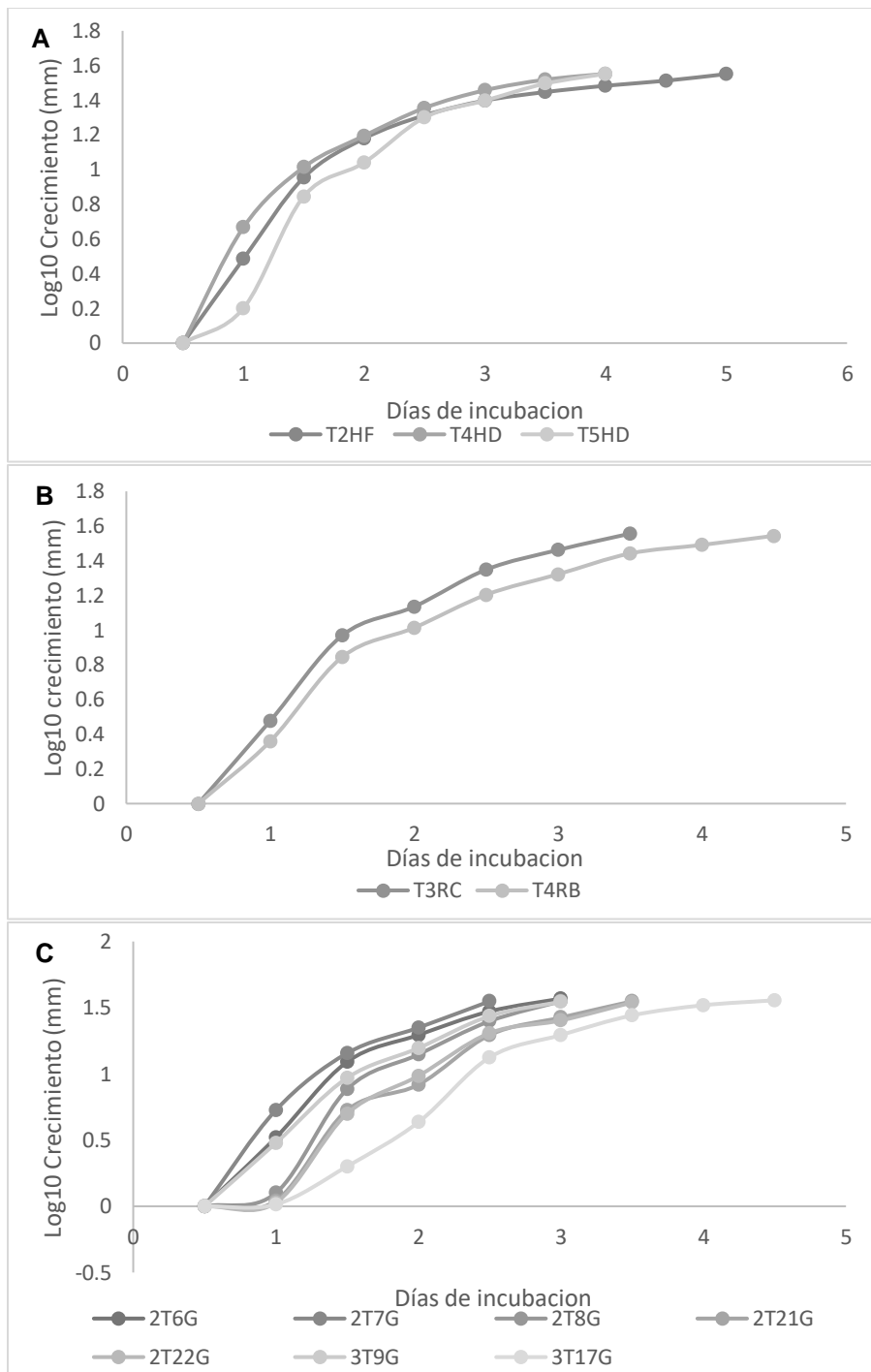
El aislado 3T9G cubrió la placa de medio PDA en tres días a 25 °C, formando a los 10 días de incubación una colonia semi-circular elevada y lanosa color verde oliva y al centro amarillo limón, de la que se generaron anillos con textura lanosa no muy densa. Las conidias aparecen a los 2.5 días (Tabla 4) de desarrollo, en forma de similar a los glóbulos rojos, con una ligera tonalidad verde; al reverso una coloración beige con más intensidad al centro que se observó donde se formaron pústulas (Figura 8).

El aislado 3T17G cubrió la placa de medio PDA en 4.5 días a 25 °C, desarrollando una colonia circular elevada algodonosa color verde amarillento a los 10 días de incubación. Se aprecia la formación de anillos con textura lanosa, y las conidias aparecen a los 4.5 días de crecimiento (Tabla 4), en forma de óvalo con coloración verde; al reverso de la placa una coloración beige (Figura 8).



**Figura 8. *Trichoderma* spp. aislados del suelo del agroecosistema del sorgo de estudio. Nota: Micrografía 40X**

### 6.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *Trichoderma* spp. AISLADOS DE SORGO



**Figura 9. Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* aisladas del tejido foliar (A), raíz (B) y suelo (C) del sorgo, inoculadas en MMV sólido e incubándose a 25 °C. El diámetro colonial se midió cada 24 h.**

Al evaluar el crecimiento *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. aquellas aisladas del suelo fueron las que mostraron un crecimiento más rápido, en comparación con las cepas de los otros dos compartimentos. De estas, el aislado de más rápido crecimiento fue la 2T7G, llenando la placa en 2.5 días; en contraste, la que mostró el crecimiento más lento fue la 3T17G, que tardó hasta 4.5 días en llenar la placa (Figura 9). Además, Los aislados obtenidas del suelo también fueron las de más rápida conidiación, iniciando el proceso entre los dos y los cinco días.

Las cepas de *Trichoderma* aisladas de tejido foliar fueron las más lentas para crecer y para conidiar, en comparación con las cepas aisladas de los otros compartimentos (Tabla 4). Los aislados dentro de éste compartimento que mostraron el crecimiento más rápido fueron T4HD y T5HD, cubriendo la placa en 4 días, mientras que el aislado T2HF la hizo después de cinco días de incubación (Figura 9). Por último, de las dos cepas de *Trichoderma* aisladas como endófitos de raíz mostraron velocidades de crecimiento intermedias con relación a las provenientes de suelo y tejido foliar; así, el aislado T3RC llenó la caja Petri después de 3.5 y la T4RB en 4.5 días de incubación (Figura 9).

Las velocidades de crecimiento del micelio de los grupos de los aislados endófitos del tejido foliar y de la raíz presentaron una distribución normal, mientras que el grupo de los aislados del suelo se observó una distribución no normal. Al realizar un análisis ANOVA de una vía no se encontraron diferencias significativas entre las medias del crecimiento de los grupos del tejido foliar y raíz ( $p > 0.501$ ). Sin embargo, estos grupos no se pudieron comparar con los de los aislados del suelo debido a la distribución de estos últimos.

## **6.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Trichoderma* spp. AISLADAS**

### **6.4.1 Secuenciación**

En la figura 10 se muestran electroferogramas de las secuencias de los aislados T5HD (Figura 10 bloque A), 2T22G (Figura 10 bloque B) y T4HD (Figura 10 bloque C) las cuales no presentan indeterminaciones. Las secuencias obtenidas variaron

en longitud, siendo la más pequeña la del aislado 2T6G con 215 pb y la de mayor longitud la del aislado 3T9G con 549 pb.



**Figura 10. Electroferogramas de las secuencias del gen *tef 1-α* de la cepa T5HD (A), 2T22G (B) y T4HD (C). Se muestran como ejemplos de la calidad de los electroferogramas de las secuencias obtenidas en el presente trabajo.**

#### 6.4.2 Identificación genético molecular

Al realizar el análisis Blastn se encontró que las secuencias obtenidas tenían máxima identidad con secuencias de diferentes cepas/aislados de especies de *Trichoderma* spp. depositadas en GenBank (Tabla 5).

**Tabla 5. Resultados del análisis Blastn de las secuencias del factor de elongación de la traducción (tef 1-  $\alpha$ ) obtenidas a partir de los aislados de estudio.**

Compartimento	Cepa	Especie (aislado/cepa) con máxima identidad	E	% Identidad	n/n <sup>a</sup>	ID
Tejido foliar	T2HF (1T)*	<i>Hypocrea lixii</i> (Tri102)	0.0	98.16	533/543	HQ229942
		<i>Hypocrea lixii</i> (UOKT038)	0.0	98.16	533/543	EF442086
		<i>Hypocrea lixii</i> (T-22)	0.0	98.15	533/543	FR872742
		<i>Hypocrea lixii</i> (475/02)	7e <sup>-98</sup>	99.50	200/201	HQ857145
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT187)	7e <sup>-98</sup>	99.50	200/201	AY298871
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT186)	7e <sup>-98</sup>	99.50	200/201	AY298870
	T4HD	<i>Hypocrea lixii</i> (475/02)	4e <sup>-90</sup>	98.95	189/191	HQ857145
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT187)	4e <sup>-90</sup>	98.95	189/191	AY298871
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT186)	4e <sup>-90</sup>	98.95	189/191	AY298870
	T5HD	<i>Hypocrea lixii</i> (475/02)	3e <sup>-96</sup>	99.01	200/202	HQ857145
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT187)	3e <sup>-96</sup>	99.01	200/202	AY298871
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT186)	3e <sup>-96</sup>	99.01	200/202	AY298870
Raíz	T3RC	<i>Hypocrea lixii</i> (475/02)	5e <sup>-95</sup>	99.00	198/200	HQ857145
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT187)	5e <sup>-95</sup>	99.00	198/200	AY298871
		<i>Trichoderma lixii</i> (ZAUT186)	5e <sup>-95</sup>	99.00	198/200	AY298870
	T4RB	<i>Trichoderma atroviride</i> (P5)	1e <sup>-95</sup>	98.54	202/205	MH393753
		<i>Trichoderma atroviride</i> (P26)	1e <sup>-95</sup>	98.54	202/205	MH393752
		<i>Trichoderma atroviride</i> (P9)	1e <sup>-95</sup>	98.54	202/205	MH393750
Suelo	2T6G	<i>Trichoderma afroharzianum</i> (CBS 466.94)	1e <sup>-87</sup>	97.92	188/192	KP008851
		<i>Trichoderma harzianum</i> (PPRC RW20)	1e <sup>-87</sup>	97.92	188/192	FJ716621
		<i>Hypocrea lixii</i> (AS16-1)	1e <sup>-87</sup>	97.92	188/192	FJ618589
	2T7G	<i>Trichoderma harzianum</i> (ZAUT337)	5e <sup>-100</sup>	92.40	243/263	AY298899
		<i>Trichoderma afroharzianum</i> (CBS 466.94)	2e <sup>-94</sup>	99.00	198/200	KP008851
		<i>Trichoderma harzianum</i> (PPRC RW20)	2e <sup>-94</sup>	99.00	198/200	FJ716621
	2T8G	<i>Trichoderma harzianum</i> (ZAUT337)	5e <sup>-95</sup>	92.13	234/254	AY298899
		<i>Trichoderma afroharzianum</i> (CBS 466.94)	2e <sup>-89</sup>	98.95	189/191	KP008851
		<i>Trichoderma harzianum</i> (PPRC RW20)	2e <sup>-89</sup>	98.95	189/191	FJ716621
	2T21G	<i>Trichoderma harzianum</i> (ZAUT337)	1e <sup>-100</sup>	92.42	244/264	AY298899
		<i>Trichoderma afroharzianum</i> (CBS 466.94)	5e <sup>-95</sup>	99.00	199/201	KP008851
		<i>Trichoderma harzianum</i> (PPRC RW20)	5e <sup>-95</sup>	99.00	199/201	FJ716621
	2T22G	<i>Trichoderma harzianum</i> (ZAUT337)	5e <sup>-100</sup>	92.08	244/265	AY298899
		<i>Trichoderma afroharzianum</i> (CBS 466.94)	2e <sup>-94</sup>	98.51	199/202	KP008851
		<i>Trichoderma harzianum</i> (PPRC RW20)	2e <sup>-94</sup>	98.51	199/202	FJ716621
	3T9G	<i>Trichoderma virens</i> (B304s)	1e <sup>-94</sup>	99.00	198/200	MG679368
		<i>Hypocrea virens</i> (A5)	1e <sup>-94</sup>	99.49	195/196	FJ973432
		<i>Hypocrea virens</i> (PP 112)	5e <sup>-94</sup>	98.98	195/197	HM450978
	3T17G	<i>Trichoderma virens</i> (B304s)	4e <sup>-95</sup>	99.00	199/201	MG679368
		<i>Hypocrea virens</i> (A5)	1e <sup>-94</sup>	99.49	195/196	FJ973432
		<i>Hypocrea virens</i> (PP 112)	5e <sup>-94</sup>	98.99	196/198	HM450978

Notas: <sup>a</sup>n<sub>i</sub>, número de nucleótidos idénticos; n<sub>t</sub>, número de nucleótidos totales comparados en el análisis Blastn. \*1T Usando en primer ITS4.

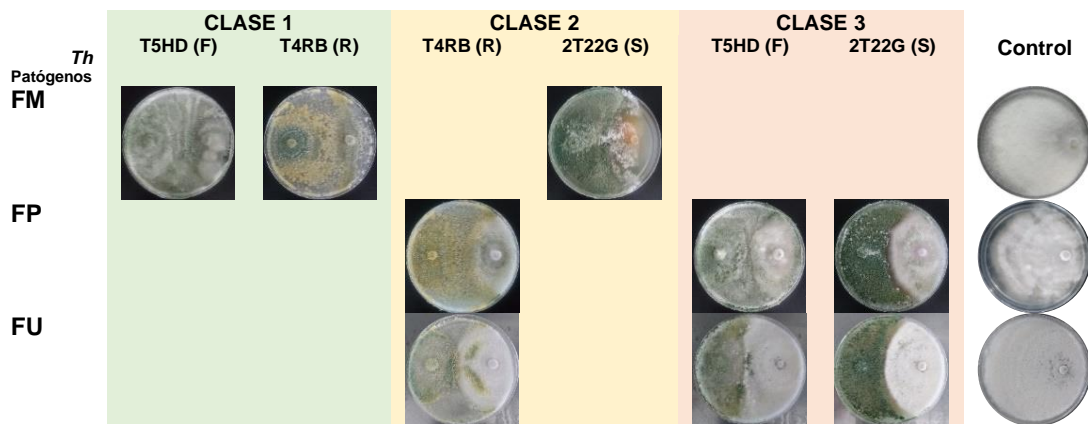
Todas las cepas obtenidas de tejido foliar presentan máxima identidad con *T. lixii*/H. *lixii*, pero los resultados obtenidos no permiten decir si son variantes genéticas de dicha especie o representan aislados clonales. En el caso de las cepas aisladas de la raíz del sorgo, la secuencia de la cepa T3RC mostró máxima identidad con *Trichoderma lixii*, mientras que la secuencia de la cepa T4RB con *Trichoderma atroviride*. Por último, de las siete cepas aisladas del suelo del cultivo de sorgo, cinco de ellas presentaron máxima identidad con secuencias de *Trichoderma*

*harzianum*, mientras dos lo hicieron con secuencias de *Trichoderma virens* (Tabla 5). Aunque en la lista de este último caso aparece *Trichoderma afroharzianum*, el resto de las secuencias en cada cepa pertenecen a *T. harzianum*, por lo que es probable que las cepas pertenezcan a ésta última especie.

### 6.5 ANTAGONISMO DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* spp. HACIA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS: Ensayos de confrontación en cultivo dual

Para evaluar el potencial biocontrolador de las cepas de nativas de *Trichoderma* aisladas de sorgo obtenidas en este trabajo, se seleccionó aleatoriamente una cepa de cada compartimento. Así, para los ensayos que se describen a continuación se muestran los resultados obtenidos con las cepas T5HD de tejido foliar, T4RB de raíz y 2T22G de suelo.

#### 6.5 Antagonismo hacia *Fusarium* spp.

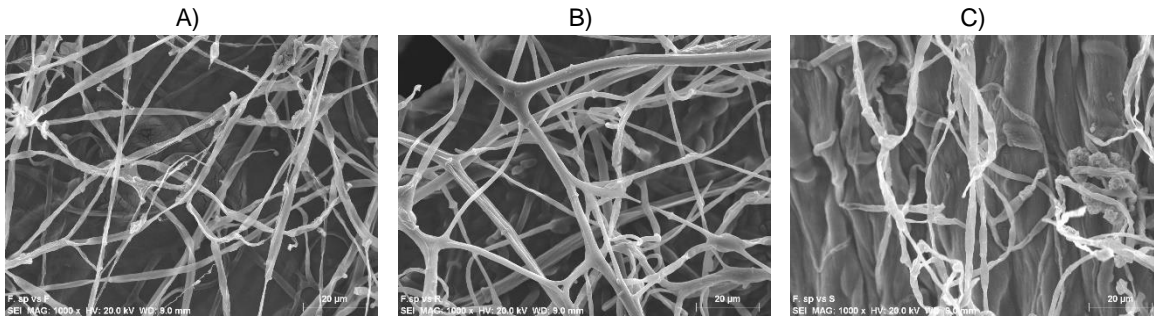


**Figura 11. Antagonismo de *Trichoderma* spp. hacia *Fusarium* spp.** La cepa de *Trichoderma* está inoculada al lado izquierdo y el fitopatógeno al lado derecho de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1 (verde) > clase 2 (amarillo) > clase 3 (rojo). El nombre clave de la cepa de *Trichoderma* aparece en la fila *Th*, seguida de la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Fusarium mexicanum* (FM), *Fusarium pseudocircinatum* (FP) y *Fusarium* sp. (FU).

Las cepas T5HD y 2T22G de *Trichoderma* aisladas de tejido foliar (T5HD) y suelo, respectivamente, (2T22G) presentaron un antagonismo clase 3 de la escala de Bell

et al. (1982) que se describe en materiales y métodos en contra de los fitopatógenos *Fusarium pseudocircinatum* (FP) y *Fusarium* sp. (FU). Es decir, no fueron capaces de sobrecrecer *in vitro* a dichos fitopatógenos. La cepa T4RB aislada de raíz (T4RB) se clasificó en antagonismo clase 2 frente a ambas cepas de *Fusarium*. En los ensayos realizados contra el fitopatógeno *Fusarium mexicanum* (FM), las cepas T5HD y T4RB de *Trichoderma* aisladas del tejido foliar y de raíz, respectivamente, fueron los mejores antagonistas, clasificándose en clase 1; mientras que la cepa de *Trichoderma* 2T22G mostró antagonismo clase 2. Los datos obtenidos muestran que las cepas de *Trichoderma* aisladas como endófitos de tejido foliar (T5HD) y raíz (T4RB), fueron las que mejor capacidad antagónica mostraron frente a los fitopatógenos de este género (Figura 11).

Al observar al microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) la interacción de las cepas de *Trichoderma* con *Fusarium* no se encontró en ningún caso el proceso de micoparasitismo caracterizado por el enrollamiento y la formación de apresorios del micelio del micoparásito sobre el micelio del fitopatógeno (Figura 12). Es importante mencionar que las microfotografías mostradas en la Figura 12 son solo con la especie FU. Por otro lado, en los casos de la interacción de *Trichoderma* de tejido foliar y suelo (Figura 12, paneles A y C), se observa un aplanamiento de las hifas del huésped *Fusarium*. Es posible que estas dos cepas de *Trichoderma* interactúen más eficazmente mediante procesos de antibiosis frente a este género, siendo posible que este cambio morfológico causado al huésped sea debido a la producción de metabolitos secundarios de las cepas de *Trichoderma*.

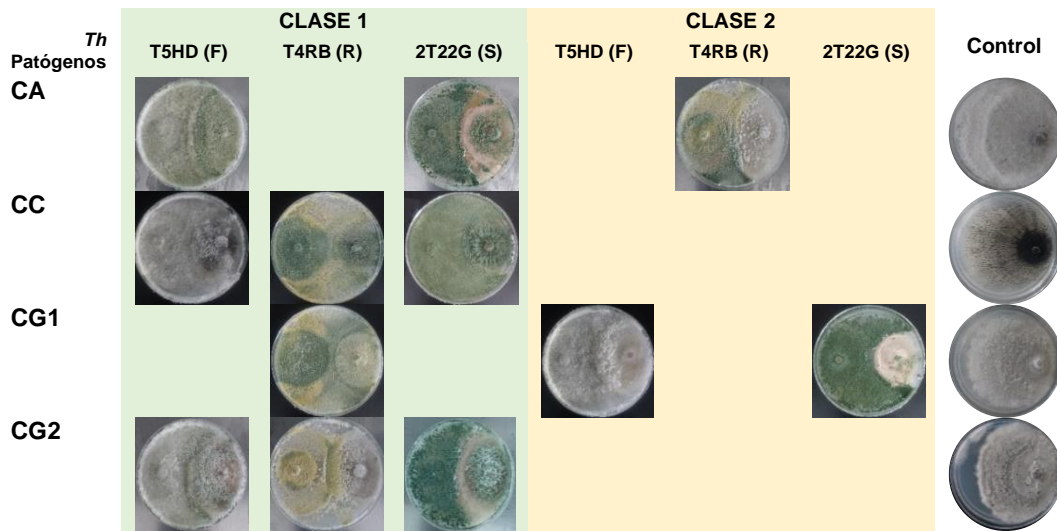


**Figura 12. Micoparasitismo frente al género *Fusarium*.** Microscopia electrónica de barrido, ampliación 1000X, HV: 20 kV. A) interacción de *Trichoderma* de tejido foliar (T5HD) y *Fusarium* sp. B) interacción de *Trichoderma* de raíz (T4RB) y *Fusarium* sp. C) interacción de *Trichoderma* de suelo (2T22G) y *Fusarium* sp.

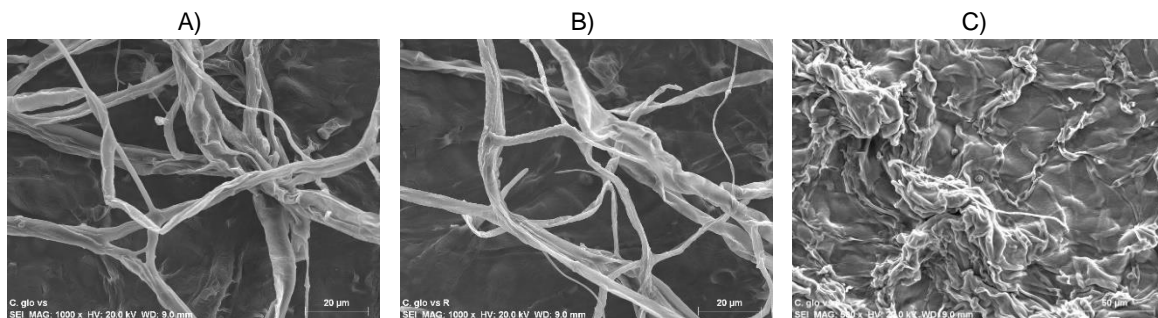
### 6.5.2 Antagonismo hacia *Colletotrichum* spp.

El antagonismo observado por parte de las cepas de *Trichoderma* aisladas de tejido foliar (T5HD), raíz (T4RB) y suelo (2T22G) hacia las cepas fitopatógenas del género *Colletotrichum* fue predominantemente de clase 1 (Figura 13). Los únicos casos en los que no se observó este nivel tan eficiente de antagonismo fue en los ensayos de las cepas T5HD de tejido foliar y 2T22G de suelo contra de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG1), y de la cepa T4RB de raíz frente a *Colletotrichum acutatum* (CA), en los que el nivel de antagonismo se ubicó en clase 2.

Las observaciones mediante SEM en la interacción de las cepas de *Trichoderma* con *Colletotrichum* mostraron el típico proceso de micoparasitismo, con contacto y enrollamiento de hifas del *Trichoderma* sp. alrededor del huésped (Figura 14). Esto se observa particularmente en los casos de las cepas de tejido foliar (T5HD) y de raíz (T4RB). Por otro lado, en la interacción de *Trichoderma* aislada de suelo (2T22G) se observa un claro aplanamiento, encogimiento y degradación en las hifas del fitopatógeno (Figura 14, panel C), lo que sugiere una alta capacidad micoparasítica y de antibiosis por parte de esta cepa, causando necrosis al poco tiempo de contacto.

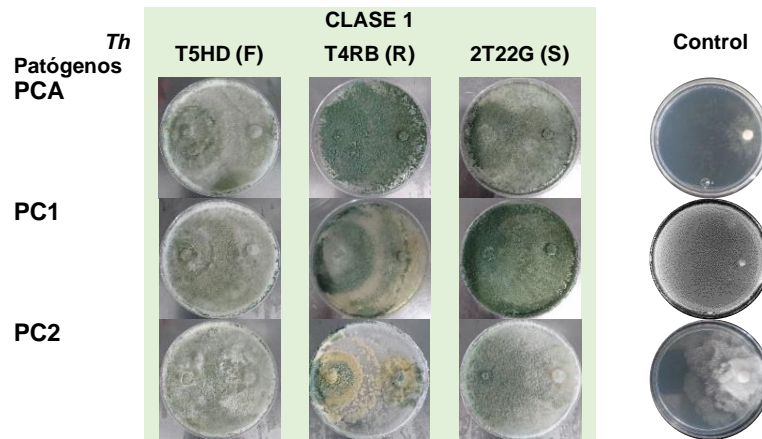


**Figura 13. Antagonismo de *Trichoderma* spp. hacia *Colletotrichum* spp.** La cepa de *Trichoderma* está inoculada al lado izquierdo y el fitopatógeno al lado derecho de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1 (verde) > clase 2 (amarillo) > clase 3 (rojo). El nombre clave de la cepa de *Trichoderma* aparece en la fila Th, seguida de la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Colletotrichum acutatum* (CA) *Colletotrichum coccodes* (CC), *Colletotrichum gloeosporoides* de Morelia (CG1) y *Colletotrichum gloeosporoides* de Uruapan (CG2).



**Figura 14. Micoparasitismo frente al género *Colletotrichum*.** Microscopía electrónica de barrido, ampliación 1000X, HV: 20 kV. A) interacción de *Trichoderma* de tejido foliar (T5HD) y *Colletotrichum* B) interacción de *Trichoderma* de raíz (T4RB) y *Colletotrichum* C) interacción de *Trichoderma* de suelo (2T22G) y *Colletotrichum*.

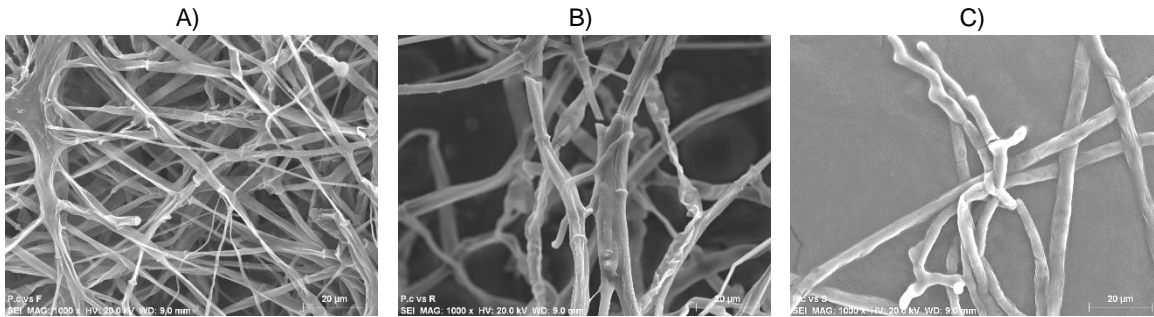
### 6.5.3 Antagonismo hacia *Phytophthora* spp.



**Figura 15. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente al género *Phytophthora*.** La cepa de *Trichoderma* está inoculada al lado izquierdo y el fitopatógeno al lado derecho de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1 (verde) > clase 2 (amarillo) > clase 3 (rojo). El nombre clave de la cepa de *Trichoderma* aparece en la fila *Th*, seguida de la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Phytophthora capsici* (PCA), *Phytophthora cinnamomi* de Atécuaro (PC1) y *Phytophthora cinnamomi* de Morelia (PC2).

Las cepas de *Trichoderma* aisladas de tejido foliar (T5HD), raíz (T4RB) y suelo (2T22G) antagonizaron eficientemente las cepas de oomicetes fitopatógenos del género *Phytophthora* (Figura 15), ya que en todos los casos se clasificaron en clase 1.

Las microfotografías de SEM para la interacción de las cepas aisladas de tejido foliar, raíz y suelo de *Trichoderma* con las cepas del género oomicete *Phytophthora* muestran el proceso de contacto y enrollamiento micoparasítico alrededor del huésped (Figura 16). Esto confirma que estas tres cepas aisladas de estos compartimentos tienen capacidad micoparasítica frente al género *Phytophthora*.



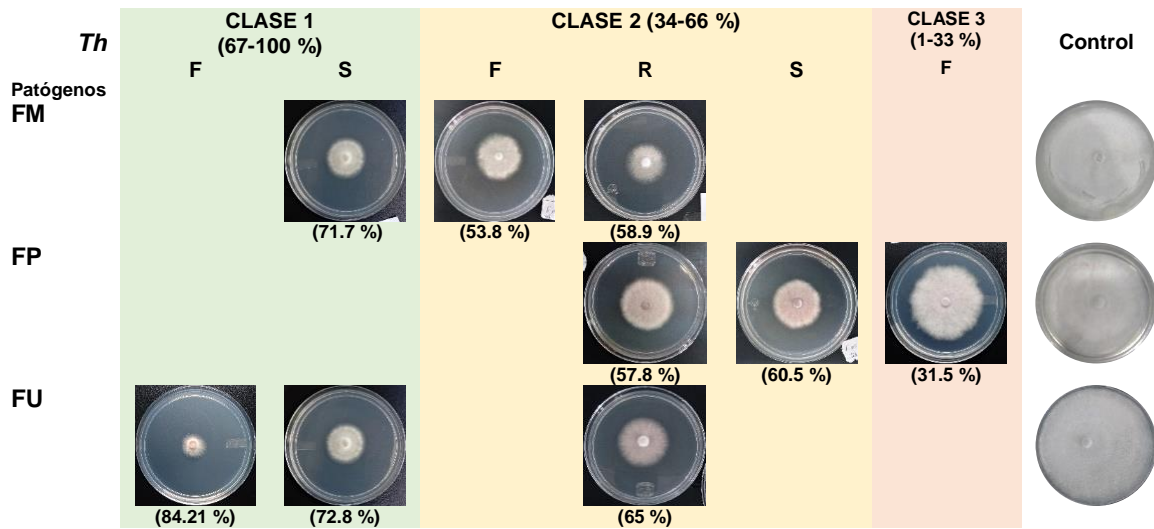
**Figura 16. Micoparasitismo frente al género *Phytophthora*.** Microscopia electrónica de barrido, ampliación 1000X, HV: 20 kV. A) interacción de *Trichoderma* de tejido foliar (T5HD) y *Phytophthora* B) interacción de *Trichoderma* de raíz (T4RB) y *Phytophthora* C) interacción de *Trichoderma* de suelo (2T22G) y *Phytophthora*.

## 6.6 ANTAGONISMO DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* spp. HACIA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS: Inhibición del crecimiento por metabolitos secundarios solubles (MSS)

Los ensayos de inhibición por metabolitos secundarios solubles (MSS) de las tres cepas de *Trichoderma* estudiadas frente a los fitopatógenos evaluados según la escala de clasificación de Worasatit et al., (1994), descrita en Materiales y métodos, mostraron resultados variables.

### 6.6.1 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. por MSS

En estos ensayos sólo la cepa T5HD se clasificó en clase 3 frente a FP, al inhibir menos del 33% el crecimiento de dicho fitopatógeno. No obstante, dicha cepa de *Trichoderma* inhibió más del 67% a FM y FU, clasificándose en clase 1 de la escala anteriormente mencionada. La cepa T4RB aislada de raíz presentó inhibición clase 2 frente a FM, FP y FU, inhibiendo 58.9%, 57.8% y 65%, respectivamente, el crecimiento de estos fitopatógenos. Por último, la cepa de *Trichoderma* aislada del suelo (2T22G) mostró una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento en contra de estos 3 fitopatógenos en comparación con las cepas de aisladas de tejido foliar (T5HD) y raíz (T4RB). Dicha cepa mostró inhibición clase 1 frente a FM y FU, inhibiendo el crecimiento más del 67% en ambos casos; mientras que frente a FP inhibió el 60.5% del crecimiento con respecto al control, ubicándose en clase 2 (Figura 17).

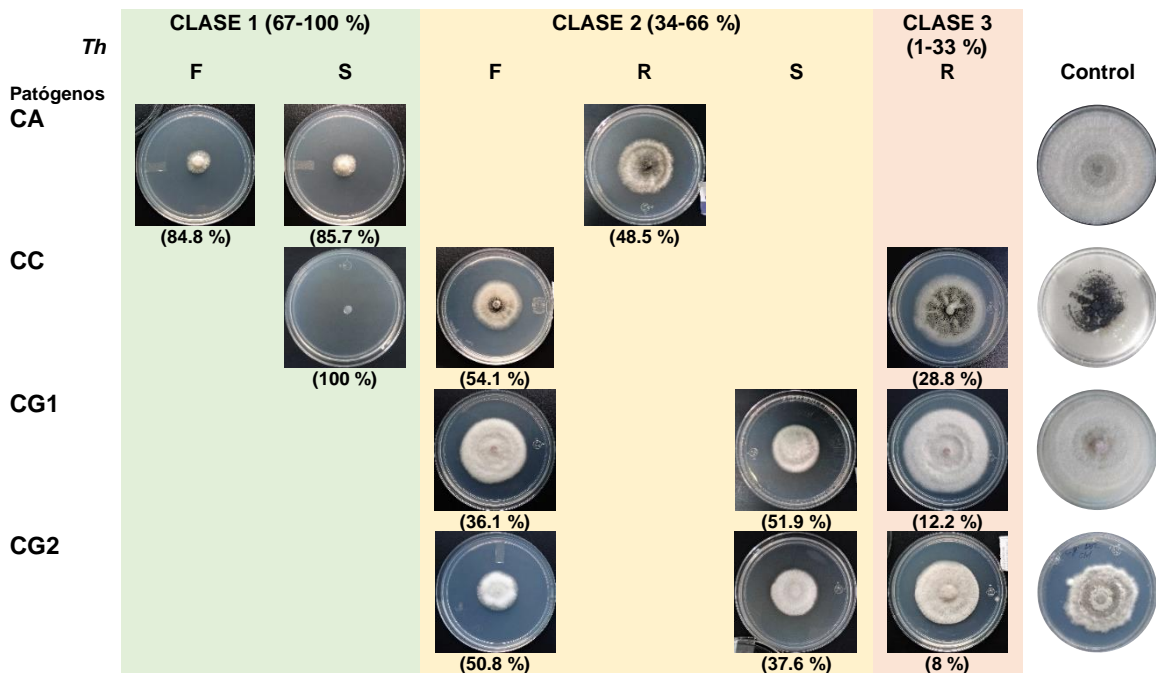


**Figura 17. Inhibición por MSS de *Trichoderma* spp. frente al género *Fusarium*.** Fitopatógenos inoculados al centro de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1: 67-100% (verde) > clase 2: 34-66% (amarillo) > clase 3: 1-33% (rojo). La cepa de *Trichoderma* aparece en la fila *Th* con la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Fusarium mexicanum* (FM), *Fusarium pseudocircinatum* (FP) y *Fusarium* sp. (FU).

### 6.6.2 Inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* spp. por MSS

Los niveles observados en la escala de inhibición de Worasatit et al. (1994) por parte de cada una de las especies de *Trichoderma* aisladas de tejido foliar (T5HD), raíz (T4RB) y suelo (2T22G) en contra de los fitopatógenos del género *Colletotrichum* fueron variables. La cepa de tejido foliar T5HD logró inhibir un 84.8% del crecimiento del fitopatógeno CA con respecto al control, ubicándose en clase 1; mientras que hacia el resto de las cepas de *Colletotrichum* evaluadas la inhibición se ubicó en clase 2 (Figura 18). La cepa T4RB aislada de raíz mostró menor efectividad en contra de este género fúngico comparándose con las otras dos cepas, clasificándose en clase 2 frente a CA (48.8%) y clase 3 frente a las cepas de las otras especies del género. Por último, la cepa 2T22G aislada del suelo presentó la mayor capacidad de inhibición del crecimiento frente a las especies de este género fitopatógeno, en comparación con las otras dos cepas de *Trichoderma*, la cepa de

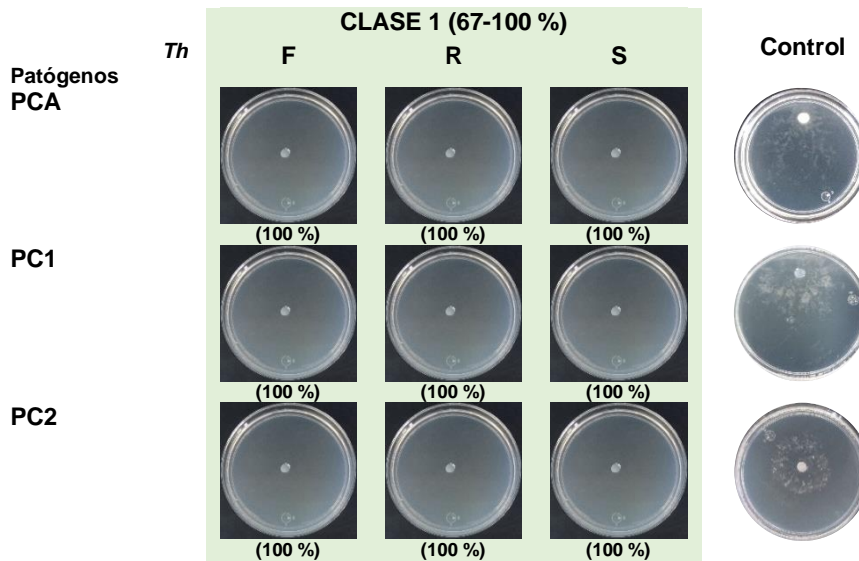
raíz y la de tejido foliar, clasificándose en clase 1 en contra CC y CA, y clase 2 frente a CG1 y CG2.



**Figura 18. Inhibición por MSS de *Trichoderma* spp. frente al género *Colletotrichum*.** Fitopatógenos inoculados al centro de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1: 67-100% (verde)> clase 2: 34-66% (amarillo)> clase 3: 1-33% (rojo). La cepa de *Trichoderma* aparece en la fila *Th* con la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Colletotrichum acutatum* (CA) *Colletotrichum coccodes* (CC), *Colletotrichum gloesporoides* de Morelia (CG1) y *Colletotrichum gloesporoides* de Uruapan (CG2).

### 6.6.3 Inhibición del crecimiento de *Phytophthora* spp. por MSS

Finalmente, en los ensayos de inhibición de los oomycetes fitopatógenos del género *Phytophthora*, las 3 cepas de *Trichoderma* mostraron un antagonismo clase 1, inhibiendo el crecimiento del fitopatógeno en un 100% con respecto al control (Figura 19).



**Figura 19. Inhibición por MSS de *Trichoderma* spp. frente al género *Phytophthora*.** Fitopatógenos inoculados al centro de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1: 67-100% (verde)> clase 2: 34-66% (amarillo)> clase 3: 1-33% (rojo). La cepa de *Trichoderma* aparece en la fila *Th* con la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Phytophthora capsici* (PCA), *Phytophthora cinnamomi* de Atécuaro (PC1) y *Phytophthora cinnamomi* de Morelia (PC2).

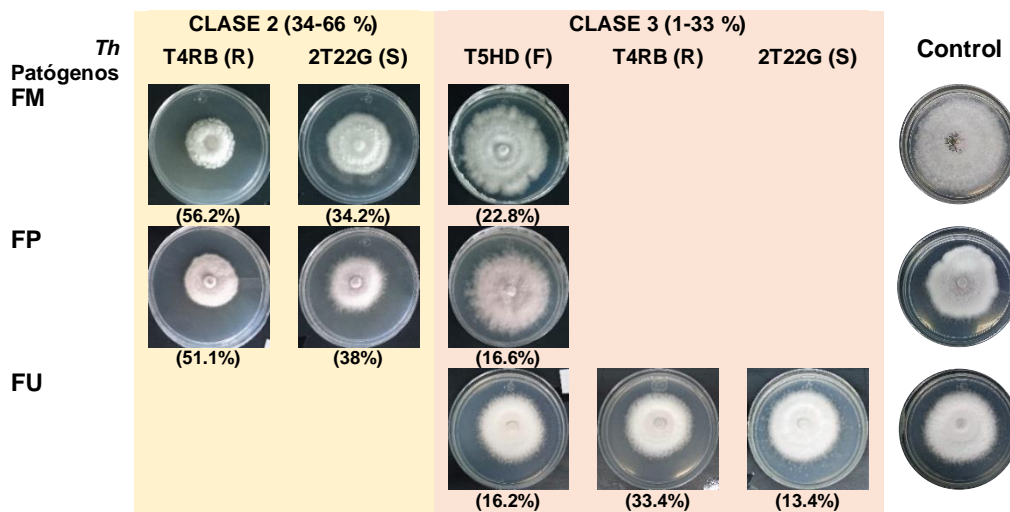
## 6.7 ANTAGONISMO DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* spp. HACIA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS: Inhibición del crecimiento por metabolitos secundarios volátiles (MSV)

Al igual que en Los ensayos de inhibición por MSS también en los ensayos de inhibición del crecimiento por MSV en cultivos duales de las tres cepas de *Trichoderma* estudiadas se clasificó según la escala de clasificación de Worasatit et al., (1994), mostrando resultados heterogéneos.

### 6.7.1 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. por MSV

Los ensayos de inhibición del crecimiento micelial por parte de las cepas de *Trichoderma* aisladas de tejido foliar (T5HD), raíz (T4RB) y suelo (2T22G) frente a los fitopatógenos del género *Fusarium*, se clasificaron en las clases 2 y 3. La cepa de tejido foliar no inhibió significativamente a los fitopatógenos del género *Fusarium*; frente a FM, FP y FU los compuestos volátiles solo inhibieron el 22.8%, 16.6% y 16.6% respectivamente, quedando en los tres casos en clase 3 (Figura 20). Las

cepas de *Trichoderma* aisladas de raíz (T4RB) y suelo (2T22G) mostraron resultados similares frente a FM y FP, clasificándose ambas en la clase 2. Así, la cepa T4RB inhibió en 56.2% el crecimiento de FM y en 34.2% el de FP, respecto a sus respectivos controles. En tanto que la cepa 2T22G inhibió el crecimiento de FM en un 51.1% y solo un 38% a FP. Los compuestos volátiles de las cepas T4RB y 2T22G inhibieron el crecimiento del fitopatógeno de zarzamora FU en 33.4% y 13.4%, respectivamente. De manera interesante, en los ensayos frente al género *Fusarium*, los compuestos volátiles no solo inhibieron el crecimiento radial del fitopatógeno, sino que también afectaron la morfología del micelio de este generando hifas translucidas o hialinas, poco visibles a simple vista, después del radio visible de la colonia (Figura 20).

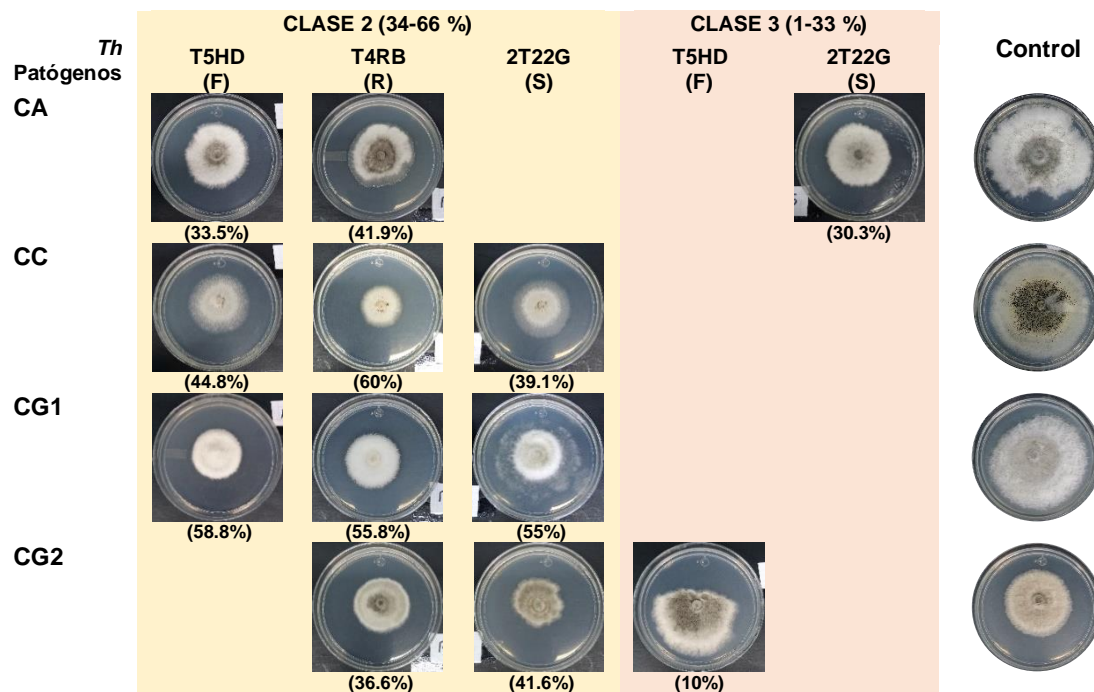


**Figura 20. Inhibición por MSV de *Trichoderma* spp. frente al género *Fusarium*.** Fitopatógenos inoculados al centro de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de inhibición por compuestos volátiles provocado por las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1: 67-100% (verde)> clase 2: 34-66% (amarillo)> clase 3: 1-33% (rojo). La cepa de *Trichoderma* aparece en la fila Th con la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Fusarium mexicanum* (FM), *Fusarium pseudocircinatum* (FP) y *Fusarium* sp. (FU).

### 6.7.2 Inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* spp. por MSV

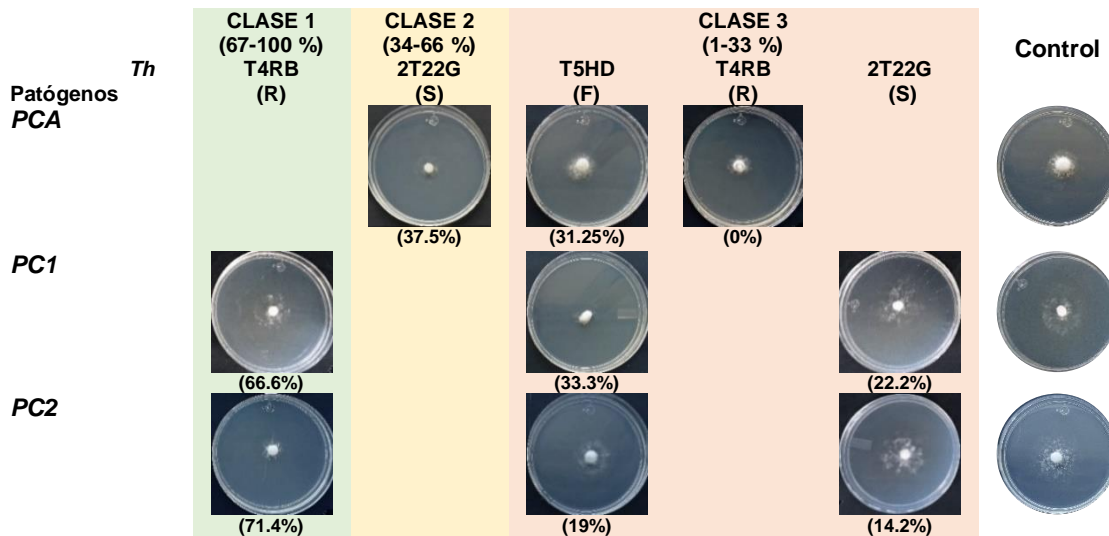
Al igual que en *Fusarium* spp., los compuestos volátiles producidos por las especies de *Trichoderma* ocasionaron inhibición del crecimiento de los fitopatógenos del

género *Colletotrichum* solo de las clases 2 y 3. La cepa T5HD de tejido foliar mostró una inhibición clase 2 para los fitopatógenos CC (44.8%), CG1 (58.8%) y CA (33.5%), y clase 3 para el fitopatógeno de aguacate CG2, con un 30.3% de inhibición. La cepa T4RB ocasionó inhibición del crecimiento clase 2 frente a todos los fitopatógenos del género *Colletotrichum* con 60, 55.8, 41.9 y 36.6% para los casos de CC, CG1, CA y CG2, respectivamente. Por último, la cepa de suelo 2T22G ocasionó inhibición clase 2 frente a CG1, CG2 y CC, con 55, 41.6 y 39.1%, respectivamente; mientras que la inhibición hacia CA fue de 30.3%, clasificándose en clase 3 (Figura 21). Por otro lado, al igual que en los ensayos de inhibición por metabolitos volátiles frente al género *Fusarium*, en las pruebas de T4RB frente a CC y en todas las pruebas frente al fitopatógeno CG2, también se observó la formación de hifas translúcidas o hialinas después del radio visible de la colonia.



**Figura 21. Inhibición por MSV de *Trichoderma* spp. frente al género *Colletotrichum*.** Fitopatógenos inoculados al centro de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de inhibición por compuestos volátiles provocado por las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1: 67-100% (verde)> clase 2: 34-66% (amarillo)> clase 3: 1-33% (rojo). La cepa de *Trichoderma* aparece en la fila Th con la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Colletotrichum acutatum* (CA) *Colletotrichum coccodes* (CC), *Colletotrichum gloeosporoides* de Morelia (CG1) y *Colletotrichum gloeosporoides* de Uruapan (CG2).

### 6.7.3 Inhibición del crecimiento de *Phytophthora* spp. por MSV



**Figura 22. Inhibición por MSV de *Trichoderma* spp. frente al género *Phytophthora*.** Fitopatógenos inoculados al centro de la placa Petri. Se muestran resultados representativos de cada nivel de inhibición por compuestos volátiles provocado por las cepas de *Trichoderma*. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1: 67-100% (verde)> clase 2: 34-66% (amarillo)> clase 3: 1-33% (rojo). La cepa de *Trichoderma* aparece en la fila Th con la letra que corresponde al compartimento F: tejido foliar, R: raíz y S: suelo. Fitopatógenos: *Phytophthora capsici* (PCA), *Phytophthora cinnamomi* de Atécuaro (PC1) y *Phytophthora cinnamomi* de Morelia (PC2).

En los ensayos frente a los fitopatógenos del género *Phytophthora* se obtuvieron resultados variables. Los ensayos de la cepa T5HD de tejido foliar se clasificaron en clase 3 en todos los casos. Los porcentajes de inhibición fueron los siguientes: PC1, 33.3; PCA, 31.2 y PC2, 19%. T4RB ocasionó inhibición del crecimiento de PC1 y PC2 en un 66.6% y 71.4%, respectivamente, por lo que se clasificó en clase 1. Esta cepa resultó la mayor productora de compuestos volátiles capaz de inhibir el crecimiento de los oomicetes probados. Sin embargo, frente a PCA no produce inhibición alguna (0%), clasificándose en clase 3. Por último, la cepa 2T22G, de suelo, se clasificó en clase 3 frente a PC1 con 22.2% y PC2 con un 14.2%, en clase 2 frente a PCA con un 37.5% (Figura 22). Es importante mencionar que a partir del día 7 de prueba las cepas de *Trichoderma* evaluadas crecían por sobre la placa hasta invadir la placa de encima, lo que impedía su medición por más días. En base a la evidencia aquí obtenida es posible sugerir que las cepas de *Trichoderma* siguen

un gradiente de concentración de algún volátil producido por los oomicetes de prueba. Debido al tiempo de análisis particularmente en los ensayos frente a los oomicetes fitopatógenos aquí evaluados fue imposible observar daño al micelio de los oomicetes.

## 7. DISCUSIÓN

Diversos de los géneros y especies fúngicas encontradas en el presente trabajo han sido reportadas previamente en sorgo, aunque la mayoría de los estudios al respecto describen la comunidad fúngica de granos almacenados, debido a las implicaciones en salud pública. En este primer apartado no se discutirá la presencia de *Trichoderma* spp., debido a que se las especies del género encontradas en este trabajo se discutirá posteriormente, cuando se aborde la identificación genético-molecular de los aislados de dicho género.

En los primeros estudios para caracterizar la comunidad fúngica asociada al sorgo se documentó la presencia de especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum* y *Trichoderma* en raíz y tallo durante las diferentes etapas del proceso de desarrollo de la planta, entre las ocho y las 18 semanas de cultivo (Reed et al., 1983; Partridge et al., 1984). De los géneros encontrados, el más representado y mejor caracterizado fue *Fusarium*, del cual se identificaron a las especies *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. "roseum"*, *F. tricinctum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* en las dos estructuras de la planta analizadas y durante todas las etapas de desarrollo. Un estudio más reciente realizado en un agroecosistema de sorgo de Brasil (Alves dos Reis et al., 2010), en distintas partes de la planta, sin considerar granos, se identificaron cepas de *Cladosporium* spp. (61.8% de prevalencia), *Helminthosporium* spp. (33.4%), *Fusarium* spp. (25.1%), levaduras (17.5%), *Epicoccum* spp. (11.0%), *Mucor* spp. (6.1%), *Alternaria* spp. (4.2%), *Nigrospora* spp. (4.7%), *Aspergillus parasiticus* (4.0%), *Aspergillus flavus* (3.0%), *Acremonium* spp. (2.2%) y *Penicillium* spp. (1.4%). Entre las especies de *Fusarium* identificadas en este estudio se reportó a *F. verticillioides* (15.1%), *F. subglutinans* (3.7%) y *Fusarium proliferatum* (0.2%). En el suelo del cultivo el énfasis fue identificar especies productoras de toxinas, reportándose aislados de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. De manera interesante, en dicho trabajo también se evaluó la comunidad fúngica representada en el aire del agroecosistema, encontrándose a *Cladosporium* spp. (93.3%), *Helminthosporium* spp. (23.3%), *Curvularia* spp. (15.0%), levaduras (13.3%), *Mucor* spp. (11.6%), *Rhizopus* spp. (10.0%), *Trichoderma* spp. (10.0%), *Acremonium* spp. (10.0%), *Epicoccum* spp. (6.6%),

*Penicillium* spp. (6.6%), *Aspergillus* spp. (6.6%), *F. verticillioides* (3.3%), *F. acuminatum* (3.3%), *Phoma* spp. (3.3%), *Neurospora* spp. (3.3%), *Nigrospora* spp. (3.3%), *F. avenaceum* (1.7%), *F. subglutinans* (1.7%), *F. semitectum* (1.7%), así como hongos que no esporulan (46.6%). El análisis de presencia fúngica en el aire del cultivo es importante tanto para determinar cómo pueden dispersarse algunas de las especies encontradas en otros compartimentos del agroecosistema como para estudiar la presencia y dispersión de fitopatógenos en particular.

Un estudio realizado *in vitro* para evaluar la transferencia de hongos de la semilla a la planta documentó en mayor proporción especies de los géneros *Curvularia*, *Fusarium* y *Aspergillus*, en ese orden, además de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, entre otras (Stokholm et al., 2016). La descripción de los hongos asociados al proceso de ensilado identificó aislados de *Aspergillus* (28.7%), *Alternaria* (22.9%) y *Penicillium* (13.4%), *Paecilomyces* (35.3%) y *Trichoderma* (11.1%) cuyos porcentajes de aislamiento variaron durante el tiempo de ensilado (Del Palacio et al., 2016).

Así, mientras que en los estudios previos dentro del agroecosistema se reportan la presencia de especies dentro de cuatro (Reed et al., 1983; Partridge et al., 1984) y diez géneros en la planta de sorgo (Alves dos Reis et al., 2010), en el presente trabajo se encontraron especies dentro de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Trichoderma*, por lo que los resultados aquí obtenidos, en términos generales, son consistentes cualitativa y cuantitativamente con estudios previos dentro del agroecosistema de sorgo. Es posible que las diferencias en algunos de los géneros descritos en los trabajos previos antes citados y no encontrados en el presente trabajo se deban al uso de distintos protocolos de aislamiento, a diferencias en el esquema de muestreo, o bien representen diferencias reales en la estructura de la comunidad fúngica en cultivos de sorgo ubicados en diferentes regiones geográficas. Es factible que un muestreo más intensivo del agroecosistema aquí estudiado pueda revelar la presencia de especies de otros géneros no detectados actualmente. Otro factor que influye en la estructura de comunidades fúngicas de los agroecosistemas es el manejo, incluida la rotación de cultivos, las prácticas de labranza, entre otras (Gil et al., 2011; Bainard et al.,

2017; Rosenzweig et al., 2018;). Debido a que no se cuenta con datos de manejo del área de estudio aquí empleada ni de algunos de los trabajos previamente citados, no es posible establecer de manera precisa si este es un factor importante en las diferencias de este trabajo con los estudios anteriores.

En el presente trabajo no se encontraron cepas de los principales hongos fitopatógenos de sorgo descritos a nivel global y local como *Macrophomina phaseolina*, *Sporisorium reilianum*, *Peronosclerospora sorghi*, *Claviceps africana*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora sorghi* (Hernández-Jiménez et al., 2004; Ramírez-Rojas et al., 2013; Díaz-Franco y Montes-García, 2008; Fernández-Pavía et al., 2012). Una posible explicación es que la velocidad de crecimiento de las cepas aisladas inhibió el crecimiento de dichos fitopatógenos, o bien al uso de medios generales para el aislamiento, no específicos de algunos de dichos fitopatógenos. De los géneros de hongos encontrados en el presente trabajo, *Fusarium* es de relevancia debido a que se ha asociado a *Fusarium moniliforme* con el tizón de la planta tanto a nivel global como en Michoacán (Fernández-Pavía et al., 2012, Astoreca et al., 2019). A futuro es importante identificar a nivel de especie las cepas de *Fusarium* aisladas, con la finalidad de saber si se trata del patógeno o de alguna especie endófito reportada en gramíneas (Swett y Gordon, 2015). No obstante, se ha documentado que *Fusarium* spp. puede cambiar de estilo de vida, pasando de ser endófito a necrótrofo, dependiendo de las modificaciones ambientales y el estado fisiológico de los agentes planta-hongo involucrados en la asociación (Padhi et al., 2016; Lofgren et al., 2018).

La rápida velocidad de crecimiento del micelio de las cepas aisladas de suelo en este trabajo coincide con las reportadas por Larralde et al. (2008), quienes documentan que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. obtenidas del mismo tipo de muestra en cultivos de sorgo, llenan la caja de Petri con medio PDA creciendo en tres días. El óptimo crecimiento de las cepas aisladas en las condiciones de cultivo probadas se debe a que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. son mesofílicas, aunque algunas pueden crecer en condiciones de temperatura extremas (Kredics et al., 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un antagonismo más eficiente de las cepas de *Trichoderma* spp. hacia distintas especies del género *Colletotrichum* que el reportado por Živković et al. (2010) quienes obtienen un antagonismo *T. harzianum* hacia *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* no mayor al 40%, lo que los ubicaría en una clase 2. De manera interesante, aquí se observó una diferencia significativa en el nivel de antagonismo de *Trichoderma* spp. hacia las dos cepas de *C. gloeosporioides* evaluadas, CG1 y CG2. Dicha diferencia puede reflejar diferencias en la virulencia de las cepas, así como en el hospedero que atacan las cepas de los fitopatógenos. Se han documentado diferencias en ese sentido entre aislados geográficos de *C. gloeosporioides* (Saxena et al., 2014). Al emplear cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra dicha especie, De la Cruz-Quiroz et al. (2018) obtuvieron niveles de antagonismo más bajos a los obtenidos en el presente trabajo, con porcentajes de inhibición entre el 9 % y el 22.5%, lo que correspondería a clase 3. Por otra parte, especies del género *Fusarium* se considerada como habitantes naturales del suelo (Summerell y Leslie, 2011), lo que indicaría el porqué de estos resultados tan poco efectivos frente a este género.

Las cepas de *Trichoderma* mostraron un antagonismo eficiente hacia las especies de *Phytophthora* evaluadas. Estos resultados coinciden con estudios previos en donde se ha documentado un claro dominio antagónico *in vitro* de cepas de diferentes especies de *Trichoderma* hacia cepas de especies del género *Phytophthora* (Nath et al., 2014, Ezziyyani et al., 2005). En el caso del ensayo frente a *P. capsici* en este trabajo se obtuvieron mejores resultados antagonismo que los de Mousumi et al., (2019), quienes utilizaron cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de rizósfera de cultivos de pimiento y jengibre generando porcentajes de inhibición del 42.1 al 63.5% en cultivo dual, correspondientes a la clase 2. También se obtuvieron resultados más altos de antagonismo que los mostrados por De la Cruz-Quiroz et al., (2018) en sus pruebas de cultivo dual empleado cepas de *Trichoderma* spp. contra *P. capsici*, con resultados que van del 1.37 al 22.1% de inhibición, clasificándose en clase 3. En un estudio en donde se evalúa el efecto de extractos de acetato de etilo obtenidos de cultivos líquidos de distintas especies de *Trichoderma* hacia *P. capsici*, se obtuvo 100% de inhibición en 6 de 8 ensayos

realizados (Bae et al., 2016). Esto muestra que *Trichoderma* spp. puede atacar a distancia a especies del género *Phytophthora*, mediante la secreción de metabolitos secundarios solubles.

Diferencias entre los niveles de antagonismo entre cepas/especies de *Trichoderma* spp. con cepas de la misma especie de un fitopatógeno particular se encuentran ampliamente documentadas en la literatura. Un ejemplo ilustrativo de lo anterior a nivel interespecífico es la interacción de *T. reesei*, *T. virens* y *T. atroviride* hacia *Rhizoctonia solani*. En ensayos de confrontación dual *in vitro*, el proceso de antagonismo presentó diferencias significativas en cada caso, *T. reesei* solo retrasó el crecimiento del fitopatógeno sin lograr detenerlo, *T. virens* inhibió el crecimiento de *R. solani* sobrecreciéndolo y matándolo, mientras que *T. atroviride* no detuvo el crecimiento del fitopatógeno, pero lo sobrecreció casi por completo (revisado en Atanasova, 2014). Esto refleja como la respuesta micoparasítica de *Trichoderma* spp. involucra la participación de varios genes, enzimas y diversos efectores que pueden diferir entre las especies del género y a lo largo del proceso de predación (revisado en Atanasova, 2014). La evidencia experimental sugiere que las tres especies pueden “sensar” a la presa, ya que todas cambian la expresión de genes antes del contacto; no obstante, los genes que muestran expresión diferencial son distintos entre cada especie. Así, en *T. reesei* se activan genes relacionados con la adquisición de nutrientes, particularmente los relacionados con la degradación de celulosa y hemicelulosa, lo que sugiere que compite con el fitopatógeno por la adquisición de nutrientes eficientemente. Estos mismos genes reducen su expresión en *T. atroviride* y no sus niveles de transcripción no se modifican en *T. virens*, lo que indica que la estrategia de estas especies es inducen la expresión de los genes involucrados en el ataque (revisado en Atanasova, 2014). Estas diferencias en los patrones de expresión de genes de acuerdo al estilo de vida y capacidad micoparasítica pueden aplicarse a otras especies del género *Trichoderma* para explicar las diferencias en el antagonismo observadas en el presente trabajo. No obstante, es necesario a futuro evaluar la expresión de genes en otras especies del género en confrontación con distintos fitopatógenos, con la

finalidad de tener explicaciones más precisas sobre las diferencias interespecíficas en el proceso de micoparasitismo.

Los resultados del análisis Blastn de las secuencias obtenidas de los aislados de estudio mostraron a tres de las especies de *Trichoderma* como endófitas, una sola especie en tejido foliar y dos especies en raíz, mientras que en suelo se identificaron dos especies, presentándose así una baja diversidad taxonómica de *Trichoderma* spp. por compartimento. En el caso particular del suelo, se encontraron las especies *T. harzianum* y *T. virens*. Previamente, Larralde et al. (2008) reportaron la identificación morfológica y molecular de seis especies de *Trichoderma* en suelo de cultivo de sorgo en el noreste del México, entre las que se encontraba *T. harzianum*, pero no *T. virens*. En dicho estudio la primera especie solo fue identificada en uno de los aislados caracterizados, mientras que en el presente trabajo fue la mayoritaria entre los aislados identificados. Un aislado de *T. harzianum* se ha obtenido de muestras de suelo de un cultivo de sorgo, sin mayores referencias (Mishra et al., 2016). Recientemente Alves dos Reis et al. (2010) encontraron que *Trichoderma* spp. representa el 30% de todos los aislados de suelo de un cultivo de sorgo, pero no se reportan las especies encontradas.

En el que quizá consiste en el único trabajo de sucesión de colonización fúngica en plantas de sorgo en crecimiento, no se obtuvo ningún aislado de *Trichoderma* spp. en tallo y raíces de plántulas entre las dos y las seis semanas de crecimiento (Reed et al., 1983; Partridge et al., 1984). En plantas después de la floración y los estados de tallo blando no se obtuvieron aislados de *Trichoderma* spp. en los tallos (tejido internodal entre el segundo y el tercer nódulo sobre el suelo), sin embargo, en las raíces de dichas plántulas representaron el 40, 25, y 15% de los hongos aislados a las 8, 10 y 12 semanas de crecimiento, respectivamente. En los estados maduros de las plantas tampoco se obtuvieron aislados de *Trichoderma* spp. del tallo, y aislamiento en la raíz se mantuvo en 25% a las 14, 6 y 18 semanas de crecimiento (Reed et al., 1983; Partridge et al., 1984). Los únicos dos aislados identificados en ambas partes de la planta fueron de la especie *T. viride* (Reed et al., 1983). En contraste, Alves dos Reis et al. (2010) no reportan el aislamiento de *Trichoderma* spp. de los tallos de plantas de sorgo.

De acuerdo a los antecedentes presentados con anterioridad, el presente representa el primer trabajo que reporta especies endófitas de *Trichoderma* spp. en las partes aéreas de la planta de sorgo. Los hongos endófitos se consideran componentes vitales para la producción sustentable de cultivos de relevancia socioeconómica, protegiendo a las plantas de patógenos y estrés ambiental, por lo que impactan de manera positiva en los rendimientos y la calidad de los cultivos (Lugtenberg et al., 2016). No obstante, las prácticas agrícolas actuales han disminuido la diversidad de hongos endófitos, por lo que es necesario tomar medidas que permitan la conservación de dicho grupo ecológico (Lugtenberg et al., 2016). Así, es necesario realizar más estudios sobre especies de *Trichoderma* endófitas de sorgo, con la finalidad de establecer su posible papel en la producción de este cultivo de gran relevancia socioeconómica a nivel global. Por otra parte, se ha documentado que en el aire que circula por un cultivo de sorgo, el 10% de los aislados de hongos obtenidos pertenecen al género *Trichoderma* (Alves dos Reis et al., 2010). En el presente trabajo no se obtuvieron aislados del aire circulante sobre el cultivo, algo que sería interesante de realizar a futuro debido a que se ha establecido que *Trichoderma* spp. y otros géneros de ascomicetes endofíticos de herbáceas y gramíneas dispersan sus conidias mediante el aire, oscilando entre el endofitismo y el saprofitismo en su ciclo de vida (Vázquez de Aldana et al., 2013).

De manera interesante, las cepas con clave 2T6G, 2T7G, 2T8G, 2T21G y 2T22G identificadas como *T. harzianum* provienen del mismo transecto, es decir, fueron aisladas de muestras de suelo de la misma zona del cultivo. No se encontró a dicha especie en otro transecto, lo que sugiere que la distribución de dicha especie no es aleatoria, aunque se desconocen las causas de dicha distribución.

En términos generales, los resultados del presente trabajo coinciden con lo descrito en estudios previos sobre hábitats de *Trichoderma* spp., particularmente de agro-ecosistemas, en los que se documenta que existe una baja diversidad de especies de *Trichoderma* en cada compartimento, siendo el suelo en donde se documenta que existe una mayor diversidad de especies del género (Chaverri y Samuels, 2013; Belayneh-Mulaw et al., 2010; Rosmana et al., 2015). En el caso de agroecosistemas, la diversidad de *Trichoderma* spp. ha sido analizada

principalmente en suelo, particularmente para el caso de cereales, lo cual ha sido revisado recientemente (Kredics et al., 2014). Así, los ejemplos que se enumeran a continuación provienen de dicha revisión. En suelo de distintas variedades de trigo se ha documentado a *Trichoderma* spp. como uno de los géneros predominantes (Pięta et al. 2000; Liang et al., 2004), aislándose las especies *T. atroviride*, *T. viride* (Hagn et al., 2003) y hasta 11 especies distintas en al menos un reporte, que incluyen a *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. gamsii*, así como a las especies encontradas en el presente trabajo *T. harzianum* y *T. virens* (Kredics et al., 2012). De manera contrastante, mientras que algunos estudios en suelo de trigo no documentan la presencia de *T. harzianum* (Hagn et al., 2003), otros la encuentran, junto con *Hypocrea orientalis*, como una de las dos especies presentes (Gherbawy et al., 2004). La baja diversidad de especies de *Trichoderma* en suelos agrícolas de cultivos de gramíneas y cereales se ha atribuido a la alcalinidad de los suelos estudiados, presentando valores de pH de 7.3–8.4 (Kredics et al., 2018).

En el caso de suelo de cultivo de maíz también se reporta una baja diversidad de especies, incluyendo *T. harzianum* y *H. orientalis* en Egipto (Gherbawy et al. 2004) y *T. harzianum*, *T. koningiopsis* y *T. virens* en México (Sánchez-Perez, 2009), pero de hasta nueve especies en Venezuela, incluyendo, entre otras, a *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, y *T. virens* (Pavone y Domenico, 2012). En todos los estudios anteriores la especie más prevalente fue *T. harzianum*, que en la actualidad se reconoce como un complejo de especies crípticas (Chaverri et al., 2015), por lo que es factible que los estudios que indican la presencia de dicha especie puedan estar reportando alguna de las especies del complejo.

El presente trabajo constituye apenas la segunda descripción a nivel nacional sobre la diversidad de especies del género *Trichoderma* en agroecosistemas de sorgo no relacionados con la contaminación de granos, y uno de los pocos que existen a nivel internacional. Por lo anterior, es necesario realizar estudios posteriores con un muestreo más intensivo para describir de manera más precisa la comunidad de *Trichoderma* spp. con la finalidad de encontrar cepas que puedan ser útiles en estrategias de biocontrol específicas de dicho cultivo.



## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Las especies de *Trichoderma* aisladas de los tres compartimentos muestran un crecimiento mesofílico y coinciden con las temperaturas óptimas de conidiación reportadas en la literatura para las especies de este género.
2. En relación a los ensayos antagónicos frente a microorganismos fitopatógenos de importancia agronómica del estado de Michoacán, permitieron evidenciar que las cepas de *Trichoderma* aisladas presentaron características micoparasíticas, e inhibición por metabolitos secundarios solubles y volátiles, además de distinguir diferencias en la capacidad antagónica de las cepas aisladas de distintos compartimentos.
3. A través de la técnica utilizada para evaluar la inhibición por metabolitos secundarios volátiles se pudo observar la disminución en el crecimiento de los fitopatógenos así como el debilitamiento del micelio por los metabolitos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma*.
4. Con los resultados aquí obtenidos contra los fitopatógenos confrontados, las cepas de *Trichoderma* estudiadas son prometedoras para el desarrollo de productos biocontroladores específicos contra fitopatógenos como los aquí evaluados.

## 9. CONCLUSIÓN

El cultivar de sorgo estudiado, presenta baja variedad de especies de *Trichoderma* en sus compartimentos tejido foliar, raíz y suelo. En tejido foliar y raíz se encontró a *T. lixii*/*H. lixii* así como a *T. atroviride* sólo en raíz; mientras que el suelo contenía dos especies, *T. harzianum* y *T. virens*. Entonces, la composición de especies es distinta para cada compartimento.



## **PERSPECTIVAS**

- Evaluar si las cepas aisladas pueden ser promotoras del crecimiento de plantas, así como si es posible que induzcan mecanismos de resistencia en las mismas plantas.
- Evaluar sus capacidades bioquímicas y/o metabólicas para conocer en mayor detalle el rol que juegan en cada compartimento.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Pozzi, C. R., Nascimento da Silva, V., Ortega, E., Corrêa, B. (2010). Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90(9): 1445-1451.
- Andrews, M., Hodge, S. & Raven, J.A. (2010). Positive plant microbial interactions. *Annals of Applied Biology*. 157: 317–320.
- Astoreca, A. L., Emateguy, L. G., Alconada, T. M. (2019). Fungal contamination and mycotoxins associated with sorghum crop: its relevance today. *European Journal of Plant Pathology*. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01797-w>.
- Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In V.K. Gupta, M. Schmol, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, M.G. Tuohy Editors, *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 25-40.
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics*. 2013 14:121. doi:10.1186/1471-2164-14-121.
- Bae, S.J., Mohanta, T.K., Chung, J.Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Hong, S.B., Seo, H., Bae, D.W., Bae, I., Bae, H. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*. 92 (2016): 128-138
- Bainard, L. D., Navarro-Borrell, A., Hamel, C., Braun, K., Hanson, K., Gan, Y. (2017). Increasing the frequency of pulses in crop rotations reduces soil fungal diversity and increases the proportion of fungal pathotrophs in a semiarid agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 240: 206-214.
- Baneshi, M. M., Kalantary, R. R., Jafari, A. J., Nasser, S., Jaafarzadeh, N. & Esrafil, A. (2014). Effect of bioaugmentation to enhance phytoremediation for removal of phenanthrene and pyrene from soil with *Sorghum* and *Onobrychis sativa*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014 12:24. doi:10.1186/2052-336X-12-24.
- Belayneh-Mulaw, T., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (2010). The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. *Diversity*. 2(4): 527-549.
- Bell, D. K., Wells, H. D. & Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72(4): 379-382.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W. & Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*. 6(2): 263-295.
- Busby, P.E., Ridout, M. & Newcombe, G. (2016). Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology*. 90(6): 645-55.

- Calviño, M. & Messing, J. (2012). Sweet sorghum as a model system for bioenergy crops. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(3): 323-329.
- Chaverri, P. & Samuels, G. J. (2013). Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*. 67(10): 2823-2837.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*. 95(6): 1100–1140.
- Cherif, S. S. & Benhamou, C. S. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Phytopathology*. 80(12):1406-1414.
- Cuervo-Parra, J. A., Sánchez-López, V. Romero- Cortes, T. Ramírez-Lepe, M. (2014). *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif y Par, *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research*. 8(16): 1704-1712.
- De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Rodríguez-Herrera, R., Hernández-Castillo, D. y. Aguilar, C.N. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*. 4 (2) 237-24
- De Sousa, A. R., de Castro Moreira, M. E., Toledo, R. C. L., dos Anjos Benjamin, L., Queiroz, V. A. V., Veloso, M. P. and Martino, H. S. D. (2018). Extruded sorghum (*Sorghum bicolor* L.) reduces metabolic risk of hepatic steatosis in obese rats consuming a high fat diet. *Food Research International*. 112 (2018): 48–55.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society*. 57(1):25-39
- Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*. 9(1): 59-67.
- El-Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A. & Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathology Journal*. 31(1): 50-60.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Sánchez, C. P. y Castillo, M. E. C. (2005). Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*. 27:119-126
- FAO Y OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura y Organización Mundial de la Salud). (2012). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos: documento de debate sobre la presencia de hongos y micotoxinas en el sorgo. *Comisión del Codex Alimentarius*. 9:1-59.

- Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G., Gómez-Dorantes, N., Gregorio-Cipriano, M. D. R. & Fernández-Pavía, Y. L. F. (2013). Enfermedades en plantas en el Estado de Michoacán. *Biológicas* (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). 14(2): 75-89.
- Fiorentino, N., Ventrino, V., Woo, S. L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G. & Roupael, Y. (2018). *Trichoderma*-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. *Frontiers in plant science*. 9(2018): 743.
- Fried, M. A. & Druzhinina, I.S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*. 158: 69-83.
- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Viterbo, A. & Yarden, O. (2011). Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(15): 5100-5109
- García, C. V. (2004). Introducción a la microbiología. Segunda edición Editorial EUNED. San José, Costa Rica. 83-88.
- Gherbawy, Y., Druzhinina, I., Shaban, G.M., Wuczkowsky, M., Yaser, M., El-Naghy, M.A., Prillinger, H., Kubicek, C.P. (2004). *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycological Progress*. 3(3): 211–218.
- Gil, S. V., Meriles, J., Conforto, C., Basanta, M., Radl, V., Hagn, A., Schloter, M., March, G. J. (2011). Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*. 47(1): 55-60.
- Hagn, A., Pritsch, K., Schloter, M., Munch, J.C. (2003). Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biology and Fertility of Soils*. 38: 236–244.
- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H. E., Nava-Juárez, R. A., & Chanona-Pérez, J. (2004). Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(3): 345-350.
- Heydari, A. & Pessaraki, M. (2010). A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10: 273–290
- Hirpara, D. G., Gajera, H. P., Bhimani, R. D. & Golakiya, B. A. (2016). The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Scc. *Current Genetics*. 62(3): 619-641.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*. 46(9): 615-631.
- Ikley, J. T., Wise, K. A., & Johnson, W. G. (2015). Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*), Johnsongrass (*Sorghum halepense*), and Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) are Alternative Hosts for *Clavibacter michiganensis* subsp. nebraskensis, Causal Agent of Goss's Wilt of Corn. *Weed Science*. 63(4): 901-909.

- INAFED. (2017). Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. [Base de datos en línea] disponible en: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/> [Consulta: 6 de septiembre del 2017].
- Infosiap. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. [Base de datos en línea] disponible en: [http:// http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp) [Consulta: 7 de septiembre del 2017].
- Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*. 80: 1-87.
- Kapanigowda, M.H., Perumal, R., Djanaguiraman, M., Aiken, R.M., Tesso, T., Prasad, P.V.V. & Little, C. (2013). Genotyping variation in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] exotic germplasm collections for drought and disease tolerance. *SpringerPlus*. 2013 2:650. Doi:10.1186/2193-1801-2-650.
- Kredics L., Láday, M., Körmöczi, P., Manczinger, L., Rákhely, G., Vágvölgyi, C., Szekeres, A. (2012). Genetic and biochemical diversity among *Trichoderma* isolates in soil samples from winter wheat fields of the Pannonian Plain. *Acta Biologica Szegediensis*. 56: 141–149.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*. 41(1): 37-42.
- Kredics, L., Chen, L., Kedves, O., Büchner, R., Hatvani, L., Allaga, H., Nagy, V. D., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., Vágvölgyi, C. (2018). Molecular Tools for Monitoring *Trichoderma* in Agricultural Environments. *Frontiers in microbiology*. 9: 1599. doi: 10.3389/fmicb.2018.01599.
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. In V.K. Gupta, M. Schmolli, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. G. Tuohy, editors, *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam. 3-24.
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*. 38(3): 310-319.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*. 106(7): 757-767.
- Larralde-Corona, C. P., Santiago-Mena, M. R., Sifuentes-Rincon, A. M., Rodríguez-Luna, I. C., Rodríguez-Perez, M. A., Shirai, K. & Narvaez-Zapata, J. A. (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(1):167-177.
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. (2011). The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*. 9(6): 440-451.

- Liang, C., Li, B., Lu, G., (2004). *Gliocladium* and *Trichoderma* in agricultural soil. *Journal of Zhejiang University Agriculture and Life Sciences*. 30: 415.
- Lofgren, L. A., LeBlanc, N. R., Certano, A. K., Nachtigall, J., LaBine, K. M., Riddle, J., Broz, K., Dong, Y., Bethan, B., Kafer, C. W., Kistler, H. C. (2018). *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist*. 217(3): 1203-1212.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., Herrera-Estrella, A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*. 196: 109-123.
- Malobane ME, Nciizah AD, Wakindiki IIC & Mudau FN. (2018). Sustainable production of sweet sorghum for biofuel production through conservation agriculture in South Africa. *Food Energy Secur.* 2018;7:e00129.
- Mareque, C., da Silva, T. F., Vollú, R. E., Beracochea, M., Seldin, L., & Battistoni, F. (2018). The Endophytic Bacterial Microbiota Associated with Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor*) Is Modulated by the Application of Chemical N Fertilizer to the Field. *International journal of genomics*. 2018: 7403670.
- Maropola, M. K. A., Ramond, J. B. & Trindade, M. (2015). Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *Journal of microbiological methods*. 112: 104-117.
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*. 28(1):1-11
- Martínez-Ramírez, J. L., Pescador-Rubio, A., Lezama-Gutiérrez, R., Rebolledo-Domínguez, O., Molina-Ochoa, J., López-Lavín, M. & Betancourt-Vallejo, A. (2005). Aspectos epidemiológicos de *Fusarium moniliforme* causante del tizón de la panoja del sorgo. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 9(3): 11-18.
- Mata, G. & Savoie, J. M. (2013). Preservation of *Agaricus subrufescens* strains at low temperature by using cultures on sorghum grains. *Revista iberoamericana de micología*. 30(2): 96-102.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, L. Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (wollenweb. Y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “escoba de bruja” del mango (*Mangifera indica* L.). *Rev. Mexicana de Fitopatología*. 27(1):18-26.
- Mishra, N., Khan, S. S., Sundari, S. K. (2016). Native isolate of *Trichoderma*: a biocontrol agent with unique stress tolerance properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(8): 130. doi: 10.1007/s11274-016-2086-4.
- Mishra, V., Jana, A. K., Jana, M. M. & Gupta, A. (2017). Enhancement in multiple lignolytic enzymes production for optimized lignin degradation and selectivity in fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*. 236: 49-59.

- Mousumi, M., Haridas, M. and Sabu, A. (2019). Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17(2019): 177-183.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G., Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma* plant pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4): 522-529.
- Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of action of fungal biological control agents. In P Narayanasamy, editor, *Biological management of diseases of crops, Volume 1: Characteristics of biological control agents. Progress in Biological Control Series, Springer, Dordrecht*. 15: 99-200.
- Nath, V. S., John, N. S., Anjanadevi, I. P., Hegde, V. M., Jeeva, M. L., Misra, R. S., Veena, S. S. (2014). Characterization of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Phytophthora colocasiae* associated with leaf blight of taro. *Annals of Microbiology*. 64(4): 1513-1522.
- Olmedo-Monfil V. y Casas-Flores S. (2014). Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In V. K. Gupta., M. Schmoll., A. Herrera-Estrella., R. S. Upadhyay., I. Druzhinina, M. G. Tuohy (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma. Heidelberg, Elsevier*. 429-453.
- Padhi, S., Panda, M. K., Das, D., & Tayung, K. (2016). ITS2 RNA secondary structure analysis reveals close affinity between endophytic and pathogenic fungi: A case study in *Fusarium* species. *Annals of Microbiology*. 66(2): 625-633.
- Partridge, J. E., Reed, J. E., Jensen, S. G., Sidhu, G. S. (1984). Spatial and temporal succession of fungal species in sorghum stalks as affected by environment. In ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), *Sorghum Root and Stalk Rots: A Critical Review. Proceedings of the Consultative Group Discussion on Research Needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases*. L. K. Mughogho Workshop Coordinator and Scientific Editor; Gloria Rosenberg, Publication Editor. 27 Nov-2 Dec 1983, Bellagio, Italy. Patancheru, A.P. 502324, India: ICRISAT. pp. 59-78.
- Phieler, R., Merten, D., Roth, M., Büchel, G. & Kothe, E. (2015). Phytoremediation using microbially mediated metal accumulation in *Sorghum bicolor*. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(24): 19408-19416.
- Pięta, D., Pastucha, A., Patkowska, E. (2000). Bacteria and fungi communities occurring in the soil after the cultivation of cereal and potato. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities Servis Horticulture*. 3 (2). <http://www.ejpau.pl/series>.
- Ramírez-Rojas, S., Perdomo-Roldán, F. & Canizalez, F. D. J. O. (2013). Etiología de la pudrición del tallo del sorgo en el estado de Morelos, México. *Investigación Agropecuaria*. 10(1): 43-48.
- Rani, P., Kalyani, N. & Prathiba, K. (2008). Evaluation of lignocellulosic wastes for production of edible mushrooms. *Applied biochemistry and biotechnology*. 151 (2-3): 151-159.
- Reed, J. E., Partridge J. E., Nordquist, P. T. (1983). Fungal colonization of stalks and roots of grain sorghum during the growing season. *Plant Disease*. 417: 417-420.

- Rosenzweig, S. T., Fonte, S. J., Schipanski, M. E. (2018). Intensifying rotations increases soil carbon, fungi, and aggregation in semi-arid agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 258: 14-22.
- Rosmana, A., Samuels, G. J., Ismaiel, A., Ibrahim, E. S., Chaverri, P., Herawati, Y. & Asman, A. (2015). *Trichoderma asperellum*: a dominant endophyte species in cacao grown in Sulawesi with potential for controlling vascular streak dieback disease. *Tropical Plant Pathology*. 40(1): 19-25.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. (2007). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett*. 278: 1–9.
- SAGARPA (secretaría de agricultura, ganadería desarrollo rural pesca y alimentación), (2016). Panorama Agroalimentario, Sorgo 2016. [en línea] Disponible en URL: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200640/Panorama\\_Agroalimentario\\_Sorgo\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200640/Panorama_Agroalimentario_Sorgo_2016.pdf) [Consulta: 25 de septiembre del 2017].
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*. 78: 141-73.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96(2): 195-206.
- Samuels, G. J., & Ismaiel, A. (2009). *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia*, 101(1): 142-156.
- Santos-Villalobos S, Guzmán- Ortíz D. A, Gómez-Lim M. A., Délano- Frier J. P., de- Folter S., Sánchez – García P. & Peña- Cabriaes J. J. (2012). Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) *Biological Control*. 64(1):37-44.
- Savary, S., Bregaglio, S., Willocquet, L., Gustafson, D., D’Croz D. M., Sparks, A., Castilla, N., Djurle, A., Allinne, C., Sharma, M., Rossi, V., Amorim, L., Bergamin, A., Yuen, J., Esker, P., McRoberts, N., Avelino, J., Duveiller, E., Koo, J. & Garrett, K. (2017). Crop health and its global impacts on the components of food security. *Food Sec*. 9(2017):311–327.
- Saxena A., Raghuvanshi R., Singh H.B. (2014). Molecular, phenotypic and pathogenic variability in *Colletotrichum* isolates of subtropical region in North Eastern India, causing fruit rot of chillies. *Applied Microbiology*. 2014; 117:1422–1434.
- Schuster, A. & Schmoll, M. (2010). Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87(3): 787.
- Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martinez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S.E., Kubicek, C.P. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the close presence of a fungal prey. *BMC Genomics*. 10(1): 567.

- Shoresh, M., Harman, G.E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48: 21–43.
- Slima, S. B., Ktari, N., Trabelsi, I., Moussa, H., Makni, I. & Salah, R. B. (2017). Purification, characterization and antioxidant properties of a novel polysaccharide extracted from *Sorghum bicolor* (L.) seeds in sausage. *International Journal of Biological Macromolecules*. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.010.
- Stokholm, M. S., Wulff, E. G., Zida, E. P., Thio, I. G., Néya, J. B., Soalla, R. W., Głazowska, S. E., Andresen, M., Topbjerg, H. B., Boelt, B. & Lund, O. S. (2016). DNA barcoding and isolation of vertically transmitted ascomycetes in sorghum from Burkina Faso: *Epicoccum sorghinum* is dominant in seedlings and appears as a common root pathogen. *Microbiological research*. 191: 38-50.
- Summerell, B.A. and Leslie, J.F. (2011). Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*. 50 (2011): 135-144.
- Swett, C. L., Gordon, T. R. (2015). Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology*. 13: 120-129.
- Vanamala, J. K., Massey, A. R., Pinnamaneni, S. R., Reddivari, L. & Reardon, K. F. (2017). Grain and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) serves as a novel source of bioactive compounds for human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Doi: 10.1080/10408398.2017.1344186.
- Vázquez-De Aldana, B. R., Bills, G., Zabalgoceazcoa, I. (2013). Are endophytes an important link between airborne spores and allergen exposure? *Fungal Diversity*. 60(1): 33-42.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. & Lorito, M. (2008). *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1-10.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*. 78: 343-71.
- Wang, D., Bean, S., McLaren, J., Seib, P., Madl, R., Tuinstra, M., Shi, Y., Lenz, M., Wu, X. & Zhao, R. (2008). Grain sorghum is a viable feedstock for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35(5): 313-320.
- Wang, X., Chen, C. & Wang, J. (2017). Phytoremediation of strontium contaminated soil by *Sorghum bicolor* (L.) Moench and soil microbial community-level physiological profiles (CLPPs). *Environmental Science and Pollution Research*. 24(8): 7668-7678.
- Watanabe T. (2010). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. *Boca Raton: CRC Press*. 2010: 397.
- White, T. J., Bruns T., Lee, S. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322, In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., New York.

- Zachow, C., Berg, C., Müller, H., Meincke, R., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Kubicek C. P. & Berg, G. (2009). Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *The ISME Journal*. 3(1): 79-92.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*-chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2):74-90.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*. 62(3): 611-623.