

Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*

Vladimir Sánchez¹

Oscar Rebolledo²

¹Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito central # 200, Colonia Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oaxaca, México. ²Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, A.P. 36, C.P. 28100, Tecomán, Colima, México

Trichoderma species in soil cultivated with *Agave tequilana* in Los Altos South region, Jalisco and assessment of their antagonistic capacity against *Thielaviopsis paradoxa*

Abstract. A survey was conducted to determine the species of *Trichoderma* from the soil of commercial plantations of tequila agave (*Agave tequilana*) in the Los Altos Sur region located in Jalisco State, Mexico in order to study them as biocontrol agents against one of the plant pathogens that attack the tequila agave. Sixty four cultures of *Trichoderma* were identified morphologically and some of them by DNA sequencing analyses of the internal transcribed space (ITS), translation elongation factor 1 alpha (*tef1*), actin (*act*), and calmodulin (*cal*). Morphologically, 60 isolates (93.7%) were identified as *T. longibrachiatum* and ITS sequence data for 25 of these cultures confirmed their identity. Three cultures (4.6%) were identified as *T. harzianum* and DNA sequences of ITS, *tef1*, *act* and *cal* confirmed the result. One culture (1.5%) was identified morphologically and by ITS sequence data as *T. reesei*. Antagonism against *Thielaviopsis paradoxa* was evaluated for several isolates of each species of *Trichoderma*. Isolates of *T. longibrachiatum*, *T. viridescens* and *T. reesei* produced significantly higher inhibition against *Th. paradoxa* than *T. harzianum*.

Key words: molecular identification, morphology, taxonomy, biological control.

Resumen. Se determinaron taxonómicamente especies de *Trichoderma* que se aislaron de muestras edáficas procedentes de plantaciones comerciales de agave tequilero (*Agave tequilana*) de la región de Los Altos Sur, Jalisco, con el propósito de conocer la riqueza de especies en la zona y valorar su potencial como agentes de biocontrol contra *Thielaviopsis paradoxa*, uno de los fitopatógenos causantes de la enfermedad "marchitez del agave". En total sesenta y cinco aislamientos se identificaron mediante estudios morfológicos y algunas de ellas por análisis y secuenciación del ADN ribosomal, que contuvo los genes: región espaciadora transcritora interna (ITS), factor de elongación 1- α (*tef1*), actina (*act*), y calmodulina (*cal*). Morfológicamente, 60 cepas (93.7%) se identificaron como *T. longibrachiatum* confirmándose en 25 de ellas su identidad mediante la secuencia de su región ITS. Tres cepas (4.6%) fueron identificadas como *T. harzianum* en base a su morfología y a los análisis de la secuencia de los genes ITS, *tef1*, *cal* y *act*, y una se ubicó como *T. reesei* (1.5%) según su morfología y por la secuencia de su ITS. De 9 cepas seleccionadas se evaluó su capacidad inhibitoria sobre *Thielaviopsis paradoxa*. Las cepas *T. longibrachiatum*, *T. viridescens* y *T. reesei* inhibieron en mayor porcentaje a *Th. paradoxa* que las cepas de *T. harzianum*.

Palabras clave: Identificación molecular, morfología, taxonomía, control biológico.

Received 22 February 2010; accepted 1 September 2010.

Recibido 22 de febrero 2010; aceptado 1 de septiembre 2010.

Autor para correspondencia: Vladimir Sánchez
vsanchez@unpa.edu.mx

Introducción

El agave tequilero (*Agave tequilana* Weber cv. 'Azul') es una planta que se utiliza como materia prima para la producción del tequila. Este cultivo es susceptible a la enfermedad "marchitez del agave" o "tristeza y muerte del agave" caracterizada por el enrollamiento anormal de las hojas y la posterior marchitez generalizada de la planta. Se ha reportado a *Fusarium oxysporum* Schlecht. y *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn como los fitopatógenos involucrados con esta enfermedad (Fucikovsky, 2001; Castañeda, 2002), para su control se realizan prácticas culturales y la aplicación de una amplia variedad de agroquímicos tales como: Sulfocop F® (sulfato de cobre), Comet® (sulfato de cobre pentahidratado), Benlate® (benomilo), y Bactrol® (sulfato de gentamicina y clorhidrato de oxitetraciclina) (Flores *et al.*, 2002). Sin embargo, el empleo de pesticidas se asocia con una serie de afecciones a la salud humana, entre las cuales se resaltan: la muerte fetal por anomalías congénitas (Regidor *et al.*, 2004), la degeneración de retinas (Kirrane *et al.*, 2005) y el aumento en la incidencia de leucemia (Lee *et al.*, 2004).

Una alternativa a la aplicación de químicos nocivos es el control biológico, el cual debe ser incluido en el manejo integrado de la enfermedad "marchitez del agave". Entre los agentes de biocontrol, se ha demostrado que diversas especies del género *Trichoderma* tienen la capacidad de controlar un amplio rango de hongos fitopatógenos (Whipps, 2001). El género *Trichoderma* está ampliamente distribuido en la naturaleza, incluye especies de vida libre que habitan en las primeras capas edáficas y en la zona rizosférica de las plantas, es considerado como oportunista y simbiote de plantas (Harman *et al.*, 2004). Los mecanismos mediante los cuales las especies de *Trichoderma* pueden controlar los fitopatógenos son: micoparasitismo, producción de antibióticos, competencia por espacio y nutrientes. Además se ha comprobado que algunas especies promueven el

desarrollo de la planta e inducen en ellas mecanismos de defensa contra patógenos (Howell, 2003; Vinale *et al.*, 2008).

Como primer paso para el desarrollo de un método de biocontrol para el manejo de la enfermedad del agave tequilero, se aislaron cepas de *Trichoderma* de suelos cultivados con agave tequilero en la región Los Altos Sur, en el estado de Jalisco (Sánchez *et al.*, 2007), donde la enfermedad "marchitez del agave" se encuentra distribuida.

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) identificar los aislamientos de *Trichoderma* mediante estudios morfológicos y algunos con secuenciación y análisis de ADN y ii) evaluar *in vitro* la capacidad inhibitoria de cada una de las especies de *Trichoderma* identificadas sobre *Th. paradoxa*.

Materiales y métodos

Cepas de *Trichoderma*

Sesenta y cinco cepas se incluyeron en este estudio (Tabla 1), las cuales fueron aisladas de muestras edáficas colectadas en 28 plantaciones comerciales de agave "azul", ubicadas en las comunidades de Acatic, Las Motas, Tepatitlán y Arandas en el estado de Jalisco, México (Sánchez *et al.*, 2007). Todas las cepas se depositaron en la colección de United States Department of Agriculture, Systematic Botany and Mycology Lab., Beltsville, Maryland, USA, en donde se conservan a 5°C en tubos con medio harina de maíz agar y en nitrógeno líquido con glicerol al 10%.

Determinación taxonómica mediante caracteres morfológicos

Las observaciones morfológicas se realizaron en micelios de *Trichoderma* cultivadas en harina de maíz agar más dextrosa (HMD). Este medio se preparó de la siguiente manera: 17 g de harina de maíz agar y 20 g de dextrosa se disolvieron en 1000 ml de agua destilada. Las cajas Petri se incubaron a 20°C con

12h luz y 12h oscuridad por 7 días. Se registró la apariencia del micelio, la presencia y la forma de las pústulas, la pigmentación y el aroma del medio.

Las características de los conidióforos, células conidiógenas y clamidosporas fueron observadas con un microscopio compuesto, utilizando campo claro y contraste de fases. Se midieron 30 unidades de las siguientes estructuras: conidias (longitud y ancho); fialides (longitud, ancho y la base); ancho de la célula que soporta la fialide y clamidosporas (longitud y ancho). Para la identificación de las especies de *Trichoderma* se usó la clave interactiva disponible en <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.

Determinación taxonómica mediante caracteres moleculares

Cada cepa de *Trichoderma* se cultivó en medio líquido de papa dextrosa (24 g en 1000 ml de agua destilada) en cajas petri (6 cm de diám.) por 3 días a 25°C. Se colectó el micelio y se transfirió a un tubo de centrifuga de 1.5 ml. Posteriormente el ADN se extrajo empleando un kit comercial PureGene con el protocolo descrito para tejidos de plantas (Dodd *et al.*, 2002). La amplificación por PCR y secuenciación de una región nuclear del ADN ribosomal, que contuvo los genes: región espaciadora transcritora interna (ITS), factor de elongación 1- α (*tef1*), actina (*act*), y calmodulina (*cal*), se efectuó en base a los métodos descritos por Samuels *et al.* (2006). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de otras especies de *Trichoderma* incluidas en el GenBank utilizando la herramienta básica de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio de *Trichoderma* sobre *Thielaviopsis paradoxa*

De las 65 cepas estudiadas se seleccionaron algunas de ellas en base a las especies de *Trichoderma* identificadas, cuatro de

T. longibrachiatum (una por cada localidad de muestreo), una de *T. reesei*, tres de *T. harzianum* y una de *T. viridescens* (V.S.L. 143 = G.J.S. 04-232), la cual fue aislada de una plantación ubicada en Tepatitlán por Sánchez *et al.* (2007) y reportada previamente por Jaklitsch *et al.* (2006). El hongo fitopatógeno *Th. paradoxa* empleado fue aislado de plantas de palma datilera enfermas, se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC MYA-1387), Manassas, Virginia, USA y se conservó en medio papa dextrosa agar (PDA) a 4°C.

Se empleó el método de membrana de celofán en cajas Petri (Dennis y Webster, 1971) para lo cual se cortaron membranas de papel celofán de 9 cm de diám., se hirvieron durante 10 min, se enjuagaron y se esterizaron (121°C por 20 min) antes de ser colocadas sobre el medio PDA contenido en cajas Petri. Después se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *Trichoderma* (tres días de edad) sobre el centro de cada membrana de celofán. Como testigo se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *Th. paradoxa* (tres días de edad) sobre el centro de la membrana en lugar del antagonista. Las cajas se incubaron a 25°C por dos días en la oscuridad y después se retiró la membrana con el micelio del hongo adherido. Posteriormente, se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *Th. paradoxa* (tres días de edad) sobre la superficie del medio PDA en el centro de la caja Petri. Se midió el diámetro del micelio hasta que el testigo cubrió completamente la superficie del medio PDA. El porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de *Th. paradoxa*, se determinó mediante la siguiente relación (Worasatit *et al.*, 1994): % inhibición = $[(D_1 - D_2) / D_1] * 100$.

Donde D_1 es el diámetro del micelio de *Th. paradoxa* creciendo en cajas Petri donde antes creció *Th. paradoxa* y D_2 es el diámetro del micelio de *Th. paradoxa* creciendo en cajas Petri previamente inoculadas con las especies de *Trichoderma* a valorar. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones y se realizó al menos dos veces. El análisis de varianza (ANOVA) se efectuó con el programa estadístico SAS (SAS version 6.12, SAS

Institute Inc., Cary, NC, USA) y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos expresados en porcentaje fueron transformados ($\text{seno}^{-1} \times x$) antes de llevar a cabo el análisis.

Resultados

Identificación de *Trichoderma*

Sesenta cepas se identificaron como *T. longibrachiatum*, tres como *T. harzianum*, una como *T. reesei* y *T. viridescens*, basándose en los análisis morfológicos crecidos sobre medio HMD a 25°C por una semana. *T. longibrachiatum* se encontró distribuida en las cuatro localidades, *T. harzianum* solamente en Arandas, *T. reesei* y *T. viridescens* en Tepatitlán (Tabla 1).

Con el propósito de confirmar la determinación taxonómica realizada mediante caracteres morfológicos, 25 de los 60 aislamientos determinados como *T. longibrachiatum* se seleccionaron para una identificación mediante métodos moleculares usando la secuencia de su región ITS. La herramienta de búsqueda BLAST identificó positivamente a todas estas cepas. Posteriormente las secuencias de la región ITS de estos aislados se compararon con la secuencia ITS de la cepa ATCC 18648 de *T.*

longibrachiatum identificada por el experto en el género (Samuels, 2006). De las 25 cepas, 20 tuvieron una homología del 100 %, cuatro del 99 % y una del 91 % a la cepa ATCC 18648. El análisis tipo BLAST de la cepa V.S.L. 74 reveló una identidad con 12 ITS de *T. reesei* o *Hypocrea jerorina* (estado sexual o teleomorfo de *T. reesei*) (Lieckfeldt *et al.*, 2000). Para las tres cepas identificadas morfológicamente como *T. harzianum*, se amplificaron y secuenciaron los genes: ITS, *tefl*, *act* y *cal*. Las secuencias obtenidas de los fragmentos ITS, *tefl* y *cal* se compararon con las secuencias de la cepa G.J.S. 00-22 de *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2003) y la secuencia del gene *act* con la cepa G.J.S. 90-22 de *Hypocrea lixii* (estado sexual de *T. harzianum*), las cuales fueron identificadas por especialistas en el género (Samuels, 2006). Ninguna de las tres cepas investigadas mostraron una homología idéntica con los cuatro fragmentos secuenciados a las cepas G.J.S. 00-22 y G.J.S. 90-22. Las secuencias de la región ITS de las cepas V.S.L. 282, V.S.L. 291 y V.S.L. 292 presentaron una homología del 99 % a la cepa G.J.S. 00-22. La secuencia del gene *tefl* de V.S.L. 282 presentó la homología más alta (90 %) a la cepa G.J.S. 00-22, mientras que el resto de las cepas tuvieron un porcentaje de similitud del 89 %. La secuencia del gene *act* de nuestras cepas de *T. harzianum* mostraron una homología del 95 al 96 % con la

cepa G.J.S. 90-22. En el caso de la secuencia del gene *cal*, la cepa V.S.L. 282 mostró la homología más alta (97 %) a la cepa G.J.S. 00-22, siguiendo las cepas V.S.L. 292 y V.S.L. 291 con un 96 y 95% respectivamente. En base a los análisis de la secuencia de DNA de cuatro genes (ITS, *tefl*, *cal* y *act*) estas cepas se identificaron como *T. harzianum*.

Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio de *Trichoderma* sobre *Thielaviopsis paradoxa*

De acuerdo a los análisis estadísticos, se encontraron diferencias significativas entre las especies de *Trichoderma* en su habilidad para inhibir el crecimiento de *Th. paradoxa* (Tabla 2). Las cepas de *T. longibrachiatum* mostraron ser las más antagónicas. Dos de las cuatro cepas evaluadas inhibieron completamente el crecimiento de *Th. paradoxa* y las otras dos inhibieron en porcentajes de 95.60 y 87.52. Mientras que la cepa V.S.L. 143 de *T. viridescens* y la cepa V.S.L.74 de *T. reesei* inhibieron el crecimiento del fitopatógeno en un 87.52 y 80.27 %, respectivamente. Por

otra parte, se observó un bajo porcentaje de inhibición (4.65 al 10.22 %) de las cepas de *T. harzianum*.

Discusión

El método principal para la identificación de especies de *Trichoderma* es mediante caracteres morfológicos, cada especie descrita en la literatura tiene características distintivas que nos ayudan en su diferenciación. Debido a que se siguen estudiando nuevas especies, las características morfológicas ya no son suficientes para definir otras especies, y ahora se tienen que analizar secuencias de varios genes incluyendo ITS, *tefl*, *act*, y *cal*, siendo el gene *tefl* con mayor capacidad para reflejar diferencias entre especies estrechamente relacionadas (Samuels, 2006).

Basándose por una combinación de características morfológicas, por análisis y secuenciación de algunos genes, se identificaron cuatro especies en el ecosistema del agave

Tabla 2. Capacidad inhibitoria de las especies de *Trichoderma* nativas de la región de Los Altos Sur, Jalisco, México sobre el crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa*

Cepa ¹	Localidad	Especie identificada	% de inhibición sobre <i>Th. paradoxa</i>
V.S.L. 122 = G.J.S. 04-265	Tepatitlán	<i>T. longibrachiatum</i>	100 a ²
V.S.L. 201 = G.J.S. 04-283	Las Motas	<i>T. longibrachiatum</i>	100 a
V.S.L. 251 = G.J.S. 04-291	Arandas	<i>T. longibrachiatum</i>	95.60 b
V.S.L. 143 = G.J.S. 04-232	Tepatitlán	<i>T. viridescens</i>	87.52 c
V.S.L. 33 = G.J.S. 04-238	Acatic	<i>T. longibrachiatum</i>	86.97 cd
V.S.L. 74 = G.J.S. 04-250	Tepatitlán	<i>T. reesei</i>	80.27 d
V.S.L. 282 = G.J.S. 04-296	Arandas	<i>T. harzianum</i>	10.22 e
V.S.L. 291 = G.J.S. 04-297	Arandas	<i>T. harzianum</i>	5.87 ef
V.S.L. 292 = G.J.S. 04-298	Arandas	<i>T. harzianum</i>	4.65 f

¹V.S.L. = Colección del autor, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan; G.J.S. = Colección de Gary J. Samuels, USDA-ARS, Beltsville, MD, USA.

²Medias en cada columna seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 1. Especies de *Trichoderma* presentes en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco, México

Número de plantaciones de muestreo	Localidad	Número de cepas aisladas	Especies identificadas (Número de cepas)
4	Acatic	7	<i>T. longibrachiatum</i> (7)
12	Tepatitlán	34	<i>T. longibrachiatum</i> (32) <i>T. reesei</i> (1) <i>T. viridescens</i> ¹ (1)
4	Las Motas	11	<i>T. longibrachiatum</i> (11)
8	Arandas	13	<i>T. longibrachiatum</i> (10) <i>T. harzianum</i> (3)

¹Cepa identificada por Jaklitsch *et al.* (2006).

tequilero: *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. viridescens* y *T. longibrachiatum*, siendo esta última la especie más ampliamente distribuida en la zona de estudio. Estos resultados sugieren que las condiciones fisicoquímicas que prevalecen en el suelo donde se cultiva el agave tequilero en dicha región, favorece en particular el dominio de *T. longibrachiatum*.

T. longibrachiatum y *T. harzianum* son especies que se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes habitats en el mundo (Samuels, 2006), *T. harzianum* es considerado como cosmopolita y es la más utilizada como agente de biocontrol contra varios fitopatógenos (Samuels, 1996; Chaverri *et al.*, 2003), sin embargo, en este estudio sólo se identificaron tres cepas de esta especie. En México, estas dos especies han sido aisladas de suelos cultivados con mango en Colima (Michel-Aceves *et al.*, 2001). *T. viridescens* también tiene una amplia distribución, pero es más común en regiones templadas (Jaklitsch *et al.*, 2006), en este trabajo se corroboró la identificación de la cepa V.S.L. 143 de *T. viridescens* reportada por Jaklitsch *et al.* (2006) y los resultados obtenidos coinciden con la descripción morfológica realizada por estos autores. A nuestro conocimiento es la primera cepa de México que se identifica como *T. viridescens*. Mientras *T. reesei* presenta una distribución reducida, la mayoría de las cepas se han aislado de regiones que se encuentran dentro de la línea ecuatorial (Samuels, 2006), y otras se han aislado de regiones geográficas que incluyen el hemisferio sur (Lieckfeldt *et al.*, 2000) y la que se identificó en esta investigación que corresponde al hemisferio norte. Esta especie es de gran importancia industrial debido a que ha sido utilizada para la producción de grandes cantidades de celulasas.

El experimento de antibiosis mostró que cepas de *T. longibrachiatum* inhibieron completamente el crecimiento de *Th. paradoxa* indicando la eficacia de los metabolitos producidos por el antagonista. Comparativamente, Sánchez *et al.*, (2007) obtuvieron resultados similares al evaluar nueve cepas de *T. longibrachiatum* contra *Th. paradoxa*, donde

todas las cepas del antagonista produjeron metabolitos no volátiles que inhibieron totalmente el crecimiento del patógeno. Otros trabajos con experimentos similares al presentado anteriormente, mostraron una inhibición total en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* por *T. koningii* (Worasatit *et al.*, 1994), *R. cerealis* por *T. atroviride* y *T. harzianum* (Innocenti *et al.*, 2003), y *Moniliophthora roreri* por *T. theobromicola* (Samuels *et al.*, 2006). La habilidad de algunas especies de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de fitopatógenos, es atribuida a la síntesis de un amplio rango de sustancias antibióticas (Reino *et al.*, 2008). Lumsden *et al.* (1992) reportaron que la gliotoxina (producida por *T. virens*) mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Pythium ultimum* y *R. solani*. Worasatit *et al.* (1994) reportaron que el metabolito pirona producido por *T. koningii*, fue el responsable de la inhibición del crecimiento de *R. solani*. Otros estudios reportaron que la atroviridina y neoatroviridina producidos por *T. atroviride* exhibieron fuerte actividad antifúngica contra *Curvularia inaequalis*, *Colletotrichum dematium* y *F. oxysporum* y moderada actividad contra *Verticillium dahliae*, *Aspergillus niger* y *Cladosporium* sp. (Oh *et al.*, 2002). Estos estudios podrían explicar la inhibición del crecimiento de *Th. paradoxa* por la producción de metabolitos con actividad antibiótica sintetizados por *T. longibrachiatum*.

Nuestros resultados indican que *T. longibrachiatum* es un promisorio candidato para el biocontrol del fitopatógeno *Th. paradoxa*. Sin embargo, no se recomienda su empleo como agente de biocontrol en campo, debido a que es la especie más comúnmente identificada como el agente causal en la mayoría de las micosis reportadas, particularmente en pacientes inmunocomprometidos e inmunosuprimidos (Druzhinina *et al.*, 2008). No obstante, *T. longibrachiatum* podría considerarse como una fuente de metabolitos con actividad antibiótica, para lo cual se requiere realizar estudios para aislar y caracterizar los metabolitos implicados en la inhibición de *Th. paradoxa*. De esta

investigación, la cepa V.S.L. 143 de *T. viridescens* y la cepa V.S.L.74 de *T. reesei* inhibieron más del 80% el crecimiento del fitopatógeno, las cuales se proponen como agentes potenciales de biocontrol del fitopatógeno *Th. paradoxa*. Para complementar el control de la "marchitez del agave", además se requiere extender los muestreos a otras regiones productoras de agave tequilero, y para evaluar el efecto inhibitorio de las poblaciones de *Trichoderma* contra *F. oxysporum* el cual es considerado también como agente causal de la enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto No. 42303-Z del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Se agradece al Dr. Gary J. Samuels y al Dr. Adnan Ismaiel (USDA-ARS) por su apoyo en la identificación de *Trichoderma*.

Literatura citada

- Castañeda, V. H., 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez del agave tequilero. In: Flores, L.H.E., M.K.F. Byerly, R.J.J. Aceves, M.J. Ireta, Q.R. Soltero, M.C. Álvarez, V.H. Castañeda, M.P. Rodríguez (eds.), Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. CEAJAL, CIRPAC, INIFAP. pp. 21-24.
- Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels, D.M. Geiser, 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:302-313.
- Dennis, C., J. Webster, 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57:25-39.
- Dodd, S.L., E. Lieckfeldt, P. Chaverri, B.E. Overton, G.J. Samuels, 2002. Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs. *Mycological Progress* 1:409-428.
- Druzhinina, I.S., M. Komoń-Zelazowska, L. Kredics, L. Hatvani, Z. Antal, T. Belayneh, C.P. Kubicek, 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology* 154:3447-3459.
- Flores, L.H.E., M.K.F. Byerly, R.J.J. Aceves, C.J.A. Ruíz, 2002. Diagnóstico del sistema de producción de agave con énfasis en problemas fitosanitarios. In: Flores L.H.E., M.K.F. Byerly, R.J.J. Aceves,

- M.J. Ireta, Q.R. Soltero, M.C. Álvarez, V.H. Castañeda, M.P. Rodríguez (eds.), Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. CEAJAL, CIRPAC, INIFAP. pp. 63-95.
- Fucikovskiy, L., 2001. "Tristeza" and death of *Agave tequilana* Weber var. Blue. In: De Boer S.H. (ed.), *Plant Pathogenic Bacteria*. Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Netherlands. pp.359-361.
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- Innocenti, G., R. Roberti, M. Montanari, E. Zakrisson, 2003. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. *Mycological Research* 107: 421-427.
- Jaklitsch, W.M., G.J. Samuels, S.L. Dodd, B.S. Lu, I.S. Druzhinina, 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 55:135-177.
- Kirrane, E.F., J.A. Hoppin, F. Kamel, D.M. Umbach, W.K. Boyes, A.J. DeRoos, M. Alavanja, D.P. Sandler, 2005. Retinal degeneration and other eye disorders in wives of farmer pesticide applicators enrolled in the agricultural health study. *American Journal of Epidemiology* 161:1020-1029.
- Lee, W.J., J.A. Hoppin, A. Blair, J.H. Lubin, M. Dosemeci, D.P. Sandler, M.C.R. Alavanja, 2004. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the agricultural health study. *American Journal of Epidemiology* 159:373-380.
- Lieckfeldt, E., C. Kullnig, G.J. Samuels, C.P. Kubicek, 2000. Sexually competent, sucrose- and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from South American soils. *Mycologia* 92:374-480.
- Lumsden, R.D., J.C. Locke, S.T. Adkins, J.F. Walter, C.J. Ridout, 1992. Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology* 82:230-235.
- Michel-Aceves, A.C., O. Rebolledo-Domínguez, R. Lezama-Gutiérrez, M.E. Ochoa-Moreno, J.C. Mesina-Escamilla, G.J. Samuels, 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "Escoba de Bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154-160.
- Oh, S.U., B.S. Yun, S.J. Lee, J.H. Kim, I.D. Yoo, 2002. Atroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. *The Journal of Antibiotic* 55:557-564.
- Regidor, E., E. Ronda, A. M. García, V. Domínguez, 2004. Paternal exposure to agricultural pesticides and cause specific fetal death. *Occupational and Environmental Medicine* 61:334-339.
- Reino, J.L., R.F. Guerrero, R. Hernández-Galán, I.G. Collado, 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7:89-123.
- Samuels, G.J., 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* 100:923-935.
- Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96:195-206.
- Samuels, G.J., C. Suarez, K. Solis, K.A. Holmes, S.E. Thomas, A. Ismaiel, H.C. Evans, 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in south america. *Mycological Research* 110:381-392.
- Sánchez, V., O. Rebolledo, R.M. Picaso, E. Cárdenas, J. Córdova, O. González, G.J. Samuels, 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*.

- Mycopathologia 163:49-58.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, S.L. Woo, M. Lorito, 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry 40:1-10.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52:487-511.
- Worasatit, N., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, C. Rowland, 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. Mycological Research 98:1357-1363.
-