

Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*

Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*

Hilda Guadalupe García-Núñez*, Ángel Roberto Martínez-Campos, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR), Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Cerrillo Piedras Blancas, Carretera a Tlachaloya s/n, Toluca, Estado de México, CP 50090; María Rosa Hermosa-Prieto, Enrique Monte-Vázquez, Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, Campus de Villamayor C/ Del Duero, 12; 37185 Villamayor (Salamanca), España; Carlos Jorge Aguilar-Ortigoza, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Cerrillo Piedras Blancas, Carretera Toluca-Atlacomulco, Estado de México, CP 50090, México; Carlos Ernesto González-Esquivel, Laboratorio de Agroecología, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México. *Autor para correspondencia: g_adlih@yahoo.com.

Recibido: 11 de mayo 2016.

Aceptado: 13 de octubre 2016.

García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR; Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ, González-Esquivel CE. 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 58-79.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-4](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4)

Primera publicación DOI: 16 de Enero, 2017.

First DOI publication: January 16, 2017.

Resumen. El presente trabajo muestra la caracterización morfológica y molecular de 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 y TJ6) y su relación

Abstract. This paper presents the morphological and molecular characterization of 10 native isolates of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 and TJ6) and their phylogenetic relation, as well as its biocontrol ability against *Phytophthora infestans*. The results of the molecular characterization by amplifying the ITS1-ITS4 region of nucle1 and TJ6). The phylogenetic analysis by maximum parsimony showed a close relation among the isolates of these two groups. Biocontrol tests between the antagonist and the pathogen showed significant differences ($p < 0.05$). Strain TX8 had the highest inhibition percentage (98 %), while TL4 recorded the lowest percentage (49 %). The isolates of *T. harzianum* (TL5, TL6,

filogenética, así como su capacidad de biocontrol contra *Phytophthora infestans*. Los resultados de la caracterización molecular al amplificar la región ITS1-ITS4 del ADN ribosómico nuclear y un fragmento del gen *tefla* mostraron que de las 10 cepas, seis corresponden a *Trichoderma asperellum* (TL2, TL4, TX7, TX8, TT6 y TF8) y cuatro a *T. harzianum/Hypocrea lixii* (TL5, TL6, TF10 y TJ6). El análisis filogenético por máxima parsimonia demostró que existe una estrecha relación entre las cepas de estos dos grupos. Las pruebas *in vitro* de biocontrol entre el antagonista y el patógeno indicaron diferencias significativas ($p < 0.05$). La cepa TX8 registró el mayor porcentaje (98 %) de inhibición, mientras que TL4 fue la de menor porcentaje (49 %). Las cuatro cepas de *H. lixii* (TL5, TL6, TF10 y TJ6) presentaron capacidad de inhibición media (55-66 %).

Palabras clave: *T. asperellum*, *H. lixii*, antagonismo, papa, *Solanum tuberosum*.

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) tiene gran importancia económica y agrícola, ya que la papa es el tercer alimento más consumido en el mundo (FAO, 2014). La producción que se cosecha en el campo mexicano representa el 0.5 % de su oferta a nivel mundial (SIAP, 2014). El municipio de Zinacantepec, Estado de México, en el año 2014 registró una producción de 17,535 t, equivalente a \$115,239.06 (SIAP, 2014). El rendimiento de este tubérculo se ve afectado por la presencia de agentes fitopatógenos, tal es el caso del oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary que causa la enfermedad conocida como “tizón tardío” (Kerroum *et al.*, 2015). Este oomiceto provoca lesiones foliares que se desarrollan de tres a siete días, lo que deriva en una epidemia (Rekanović *et al.*, 2011). En los últimos años este patógeno ha

TF10 y TJ6) showed percentages between 55-65 %.

Key words: *T. asperellum*, *T. harzianum*, antagonism, potato, *Solanum tuberosum*.

The potato crop (*Solanum tuberosum*) is of great economic and agricultural importance, since potato is the third most consumed food in the world (FAO, 2014). Potato production in Mexican fields contributes 0.5 % of the worldwide supply (SIAP, 2014). The municipality of Zinacantepec, State of Mexico, recorded a production of 17,535 t in 2014, equivalent to \$115,239.06 (SIAP, 2014). Potato yield is affected by the presence of phytopathogenic agents such as the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary, which causes a disease known as “late blight” or potato blight (Kerroum *et al.*, 2015). This oomycete causes leaf lesions which take from three to seven days to develop and become epidemics (Rekanović *et al.*, 2011). In recent years, this pathogen has caused significant economic losses in Zinacantepec (López *et al.*, 2013). Chemical control is the most used method; it is successfully applied to seed, leaves and soil, but has residual effects, which causes chemical products to accumulate on water bodies, soil, plants and animals (Miller *et al.*, 2000; Aceves *et al.*, 2008).

Hence, it is important to search for ecological strategies for biological control, including the use of microorganisms that help reduce the presence of pathogens (Aceves *et al.*, 2008). Some species of the *Trichoderma* genus are known to act as biocontrol agents with broad spectrum of action against pathogens of agricultural crops (Schuster y Schmoll, 2010). This genus uses mechanisms such as: competition, mycoparasitism and antibiosis (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Bailey *et*

causado grandes pérdidas económicas en Zinacantepec (López *et al.*, 2013). El control químico es el método más utilizado, se aplica a la semilla, follaje y suelo, con resultados eficientes, pero con efectos de residualidad, lo que provoca que los productos químicos se acumulen en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales (Miller *et al.*, 2000; Aceves *et al.*, 2008).

Lo anterior sugiere buscar estrategias ecológicas como el control biológico, que consiste en el uso de microorganismos que ayuden a disminuir la presencia de patógenos (Aceves *et al.*, 2008). Algunas especies del género *Trichoderma* son reconocidas como agentes de biocontrol con amplio espectro de acción hacia fitopatógenos de cultivos agrícolas (Schuster y Schmoll, 2010). Este género utiliza mecanismos de acción tales como: competencia, micoparasitismo y antibiosis (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008). Las formulaciones comerciales compuestas por varias especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride*) que se aplican en campo (Lorito *et al.*, 2010; Mazyar *et al.*, 2010) generalmente pertenecen a una región diferente a la que se aplica, lo que deriva en la ineficacia del control (Harman *et al.*, 2010). Al respecto Altieri (1999) recomienda la utilización de especies nativas adaptadas a las condiciones ecológicas de la región de aplicación para garantizar la acción exitosa de biocontrol. Sin embargo, algunas empresas requieren cepas con capacidad de biocontrol y adaptación a diferentes regiones y sobre diversos agentes patógenos (PHC, 2016).

En el control biológico es importante la evaluación del potencial antagonico *in vitro* y en planta, así como la caracterización taxonómica de los aislados, ya que esto permite conocer los requerimientos de la especie para su crecimiento y establecer criterios de selección como agente de biocontrol, debido a que no todas las especies de

al., 2008). Commercial formulations containing various species of *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* and *T. atroviride*) used in the field (Lorito *et al.*, 2010; Mazyar *et al.*, 2010) usually belong to a different region than that where they are applied, which results in ineffective control (Harman *et al.*, 2010). To this regard, Altieri (1999) recommends the use of native species adapted to the ecological conditions of the region where the control is carried out to ensure a successful biocontrol. However, some companies require isolates with biocontrol ability and adaptation to different regions and against diverse pathogenic agents (PHC, 2016).

In the biological control, it is important to assess the antagonistic potential of the isolates *in vitro* and in plants and carry out a taxonomic characterization, in order to find out what the requirements are for the species to grow and, based on this information, establish a selection criteria to use them as a biocontrol agents, since not all the species of *Trichoderma* have such ability (Munir *et al.*, 2013). Conventional characterization of *Trichoderma* species based on morphological characteristics is not enough due to the plasticity of their traits, so it is important to conduct molecular studies to make a more accurate taxonomical diagnosis (Hermosa *et al.*, 2000). Phylogenetic analyses are a tool that supports and validates molecular studies through evolutionary evidence that can reveal convergent or divergent relations among species (Morrone, 2001).

In previous studies (García-Núñez *et al.*, 2012), 10 native isolates of *Trichoderma* from horticultural soils of the Toluca Valley, Mexico—some of them used in *in vitro* antagonism tests— showed high potential for the control of *Sclerotinia* sp., the causing agent of lettuce soft rot. The isolates were not identified at molecular level, so it is important to know to which species they belong to, as well as their potential biocontrol effect on other pathogens.

Trichoderma tienen esta capacidad (Munir *et al.*, 2013). La caracterización convencional de las especies de *Trichoderma* basada en características morfológicas no es suficiente, debido a la plasticidad de caracteres, por lo que es importante realizar estudios moleculares para tener un diagnóstico con mayor certeza taxonómica (Hermosa *et al.*, 2000). Los análisis filogenéticos son una herramienta que apoya y valida los estudios moleculares, mediante la evidencia evolutiva que puede demostrar relaciones convergentes o divergentes entre especies (Morrone, 2001).

En estudios previos a este trabajo (García-Núñez *et al.*, 2012), se aislaron 10 cepas nativas de *Trichoderma* de suelos hortícolas del Valle de Toluca, México, algunas de las cuales en pruebas de antagonismo *in vitro* mostraron alto potencial para el control de *Sclerotinia* sp., agente causal de la pudrición blanda en lechuga. Las cepas no se identificaron a nivel molecular, por lo que es importante conocer a que especie pertenecen, así como su posible efecto de biocontrol sobre otros patógenos. Por ejemplo, se ha demostrado que cepas de *Trichoderma asperellum* son antagonistas de hongos y oomicetos fitopatógenos (Taghdi *et al.*, 2015). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar mediante técnicas convencionales, moleculares y filogenéticas 10 cepas nativas de *Trichoderma*, así como evaluar su potencial de biocontrol contra *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío en cultivo de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio y origen de las cepas

Las 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 y TJ6) utilizadas para este estudio fueron aisladas en un

For example, it has been shown that isolates of *Trichoderma asperellum* are fungi antagonists and phytopathogenic oomycetes (Taghdi *et al.*, 2015). For this reason, the present study was aimed to characterize 10 native isolates of *Trichoderma* using conventional, molecular and phylogenetic techniques, and assess their biocontrol potential against *Phytophthora infestans*, the causing agent of late blight in potato crops.

MATERIALES Y MÉTODOS

Study area and origin of the isolates

The 10 native isolates of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 and TJ6) used in this research were isolated in a previous study (García-Núñez *et al.*, 2012). The isolation points are located in areas of the Toluca Valley horticultural zone (Table 1).

One strain of *Phytophthora infestans* was isolated from a potato crop plot in La Peñuela, a location from the municipality of Zinacantepec, State of Mexico. For this purpose, leaves with late blight signs and symptoms were selected; that is, necrotic stalk and petioles tissue showing dark spots, as well as the presence of white mycelium with gray sporulation on the backside of leaves. The sample was placed on wet paper and taken to the lab, where it was placed on sterilized filter paper and then on Petri dishes with wet cotton to create wet chambers, which were then maintained at room temperature during seven days to foster the presence of mycelium and sporulation. When there was enough mycelium, an evaluation was performed using Sutton's (1980) technique, described as follows: an active sporulated mycelium was taken with an inoculation loop and put in a Petri dish using a Potato Dextrose Agar (PDA, Bioxon) culture

trabajo previo (García-Núñez *et al.*, 2012). Los puntos de aislamiento se ubican en localidades de la zona hortícola del Valle de Toluca (Cuadro 1).

Se aisló una cepa de *Phytophthora infestans* de una parcela de cultivo de papa de La Peñuela, localidad del municipio de Zinacantepec, Estado de México. Se seleccionaron follajes con signos y síntomas de tizón tardío, es decir tejido de tallos y peciolos con necrosis, con apariencia de manchas oscuras y en el envés de las hojas presencia de un halo de micelio blanco con esporulación color gris. La muestra fue colocada en papel húmedo y se trasladó al laboratorio, donde fue colocada en papel filtro esterilizado y después en placas Petri con algodón húmedo, generando así cámaras húmedas que se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete días para propiciar la presencia de micelio y esporulación del patógeno. Cuando se obtuvo micelio suficiente se procedió siguiendo la técnica de Sutton (1980), tal como se describe a continuación: se tomó una muestra de micelio activo esporulado con una asa bacteriológica y se inoculó en una placa Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Bioxon). Se incubó a 22±2 °C por 12 días, posteriormente de estas muestras se obtuvo un aislamiento monospórico mediante la técnica de punta de hifa para obtener una cepa pura. A partir de la cepa pura de *P. infestans* se realizaron las pruebas de los postulados de Koch para validar su patogénesis.

Las cepas se encuentran resguardadas en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR), de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Caracterización morfológica macroscópica de las cepas

Una vez obtenidas las cepas puras de *Trichoderma* y de *P. infestans* se realizó su caracterización

Cuadro 1. Ubicación geográfica de aislados de *Trichoderma* en la zona hortícola del Valle de Toluca.

Table 1. Geographic location of the isolates of *Trichoderma* in the horticultural zone of the Toluca Valley.

Localidad	Coordenadas	Cepa
Sta. Ma. Xajalpa	14Q0443334/2114038	TX7
Sta. Ma. Xajalpa	14Q0443347/2116334	TX8
San Juan la Isla	14Q0442109/2115420	TJ6
Sn Francisco Putla	14Q0434242/2114300	TF8
Sn Francisco Putla	14Q0432918/2116404	TF10
Sn Francisco Tetetla	14Q0435475/2114358	TL2
Sn Francisco Tetetla	14Q0436273/2114681	TL4
Sn Francisco Tetetla	14Q0435875/2114606	TL5
Sn Francisco Tetetla	14Q0436993/2113877	TL6

medium. The mycelium was incubated at 22±2°C during 12 days. From this sample, a monosporic isolate was obtained applying the tip-of-hyphae technique. Using the pure strain of *P. infestans*, tests using Koch's postulates were conducted to validate its pathogenesis.

The isolates are safeguarded at the Institute of Agricultural and Rural Sciences (ICAR) of the Autonomous University of the State of Mexico.

Macroscopic morphological characterization of isolates

After obtaining pure isolates of *Trichoderma* and *P. infestans*, they were morphologically characterized. Isolates of *Trichoderma* were identified using the guide by Barnett and Hunter (1972), considering the following macroscopic morphological characteristics: mycelium texture, concentric rings development and conidia pigmentation. The strain of *P. infestans* was characterized using the guide of Erwin and Robeiros (1996) and considering mycelium texture and type, as well as spore pigmentation.

morfológica. Las cepas de *Trichoderma* se identificaron siguiendo la guía de Barnett y Hunter (1972), considerando características morfológicas macroscópicas como: textura del micelio, formación de anillos concéntricos y la pigmentación de las conidias. La cepa de *P. infestans* se caracterizó a través de la guía de Erwin y Robeiro (1996), considerando la textura, tipo de micelio y la pigmentación de las esporas.

Caracterización morfológica microscópica

Para cada cepa se hicieron cámaras de cultivo en placas Petri de acuerdo con el método modificado de Harris (1986) como se describe a continuación: se colocó un triángulo de vidrio que contenía un porta objetos con un disco de medio PDA (Bioxon) de 15mm de diámetro, en el que se inoculó una asada de esporas de la cepa de *Trichoderma*. Se cubrió la muestra con un cubreobjetos, se cerró la caja Petri y se incubó a 25 °C por siete días. Posteriormente se retiró el cubreobjetos que contenía micelio activo y esporas del aislado y se colocó sobre un portaobjetos, se tiñó con una gota de azul de algodón. Se realizaron observaciones en microscopio óptico (Image Motic Plus 2.0) acoplado a una cámara digital. Las imágenes se capturaron bajo el objetivo de 100X usando aceite de inmersión. Para *Trichoderma* la descripción se realizó de acuerdo a las siguientes características: forma y número de conidias, fialides, y conidióforos, para lo cual se utilizó la guía de identificación de Barnett y Hunter (1972). Para *P. infestans* las características morfológicas que se tomaron en cuenta fueron: tipo de hifa; forma y tamaño de esporangios; tipo de papila y presencia o ausencia de clamidosporas, según lo recomendado para Oomycetes (Erwin y Robeiro, 1996).

Microscopic morphological characterization

Culture chambers in Petri dishes were built for each strain, according to the modified method by Harris (1986) as follows: a glass triangle containing a slide with a 15 mm in diameter PDA medium disk (Bioxon) was used to inoculate a spore loop of the strain of *Trichoderma*. The sample was covered with a slide, and the Petri dish was capped and incubated at 25 °C during seven days. Then, the slide containing the active mycelium and isolate spores were removed and placed on a slide; the slide was stained with a drop of cotton blue. Observations were made under an optical microscope (Image Motic Plus 2.0) connected to a digital camera. The images were captured under a target of 100X using immersion oil. For *Trichoderma*, the description was based on the following characteristics: shape and number of conidia, phialides and conidiophores; this was performed according to the Barnett and Hunter (1972) identification guide. For *P. infestans*, the morphological characteristics taken into account were: hyphae type; sporangia shape and size; type of papilla or absence of chlamydospores, according to recommendations for oomycetes (Erwin and Robeiro, 1996).

Molecular characterization of *Trichoderma*

Obtaining mycelium. Petri dishes with a PDA (Bioxon) culture medium and a 76 mm in diameter sterilized cellulose circular membrane (Sigma) were inoculated with 100 µL of a 1×10^8 spore suspension per mL of each strain. The dishes were incubated at 25 °C during three days. The mycelium recovered from the membrane by scratching with a scratcher under sterility conditions was frozen and

Caracterización molecular de *Trichoderma*

Obtención del micelio. Cajas petri con medio de cultivo PDA (Bioxon) y una membrana circular de celulosa de 76 mm de diámetro (Sigma) esterilizada se inocularon con 100 µL de una suspensión de 1×10^8 esporas por mL de cada una de las cepas. Las placas se incubaron a 25 °C por tres días. El micelio se recuperó de la membrana por raspado con una espátula en condiciones de esterilidad, se congeló y liofilizó. La extracción de ADN genómico del hongo se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Hermosa *et al.* (2000).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificó la región ITS1-ITS4, zona del ADN ribosómico nuclear como se describe a continuación: se utilizaron los primers comerciales ITS1f (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4r(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') comprobados por Hermosa *et al.* (2012), esperando una amplificación de 600 pb. Se preparó cada reacción con un volumen final de 50 µL que contenía 5 µL de Buffer + MgCl₂ (50 mM), 0.3 µL dNTPs (2 mM/µL), 2 µL de primer (10 µM), 1 µL de Taq polimerasa (5U); 1.5 µL de DNA genómico; 38.2 µL de agua miliQ. La reacción se corrió en un termociclador (MJ Research, Inc.) bajo el siguiente programa: Primera etapa, desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min. Segunda etapa, 35 ciclos cada uno comenzando con desnaturalización a 94 °C por 1 min, seguido por alineación a 53 °C por 1 min con 30 s, y extensión a 72 °C por 2 min. Tercera etapa, extensión final a 72 °C por 7 min. El producto se mantuvo a 4 °C. Los fragmentos de DNA productos de la amplificación (3 µL) mezclado con 2 µL de buffer de carga, fueron separados en gel de agarosa (0.8 %) mezclado con 3 µL de bromuro de etidio. Se utilizaron 5 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (Gene ruler, Thermo Scientific). Las condiciones de corrida de la cámara de

lyophilized. The extraction of genomic DNA of the fungi was performed according to the technique described by Hermosa *et al.* (2000).

Polymerase chain reaction (PCR). The ITS1-ITS4 region, nuclear ribosomal DNA zone, was amplified as follows: the commercial primers ITS1f (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4r (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), with which an amplification of 600 bp was expected. Each reaction was prepared with a final volume of 50 µL containing 5 µL of Buffer + MgCl₂ (50 mM), 0.3 µL dNTPs (2 mM/µL), 2 µL of primer (10 µM), 1 µL of Taq polymerase (5U); 1.5 µL of genomic ADN; 38.2 µL of miliQ of water. The reaction was conducted in a thermocycler (MJ Research, Inc.) under the following program: first stage: initial denaturation at 94 °C during 3 min; second stage; 35 cycles each, starting with denaturation at 94 °C for 1 min, followed by alignment at 53 °C for 1 min 30 s, and extension to 72 °C for 2 min; third stage: final extension to 72 °C for 7 min. The product was kept at 4 °C. The DNA fragments obtained from the amplification (3 µL), mixed with 2 µL of charge buffer, were isolated in a mixture of agarose gel (0.8 %) and 3 µL of ethidium bromide. At this stage, five µL of molecular weight marker of 100 bp (Gene ruler, Thermo Scientific) were used. Running conditions for the electrophoresis camera were 81 volts during 30 min. The DNA fragments were observed using a UV light photo documenter.

The PCR fragments obtained were purified according to the gel extraction (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel) clean-up kit protocol. The DNA quality and concentration was evaluated in a Nanodrop. The DNA bands were observed in 1 % agarose gel. The same procedure was followed to amplify a fragment of the *translation elongation factor 1 alpha (tef1a)* gen with the primers EF1278f 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' (Chaverri and Samuels, 2003) and TEF1LLer

electroforesis fueron 81 volts por 30 min. Los fragmentos de ADN fueron visualizados con un fotodocumentador de luz ultravioleta.

Los fragmentos producto de PCR se purificaron siguiendo el protocolo del kit clean-up, gel extracción (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel). Se evaluó la calidad y concentración del ADN en un Nanodrop. Se visualizaron las bandas de ADN en un gel de agarosa al 1 %. Este mismo procedimiento se realizó para amplificar un fragmento del gen *translation elongation factor 1 alpha (tef1a)* con el par de primers EF1278f 5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3' (Chaverri y Samuels, 2003) y TEFILLer 5'-AACTTGCA-GGCAATGTGG-3' (Jaklistch *et al.*, 2005). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C 30 s, alineación 58 °C por 1 min, extensión 72 °C 1 min, extensión final de 72 °C por 7 min.

Preparación de las muestras para secuenciación. Se colocaron en tubos eppendorf 3 µl de producto de PCR purificado (50 ngµL⁻¹), 3 µL de primer (1µM) y 2 µl de agua miliQ. Las muestras se enviaron al Departamento de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, España.

Análisis de secuencias en bases de datos genómicos. Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas FinchTV versión 4.1 y DNASTAR para obtener las secuencias consenso. Posteriormente se realizó el análisis de alineamiento BLAST en la base de datos Genbank.

Análisis filogenéticos. Con la finalidad de conocer la relación filogenética de las cepas se utilizaron como grupos externos a *Trichoderma viride* y *Trichoderma longibrachiatum* (Mohammad *et al.*, 2014). Se alinearon ambas secuencias mediante el programa BioEdit Sequence Alignment ver. 7.05 (Hall, 2004) y las relaciones filogenéticas se realizaron mediante el programa Past ver.207 (Harmer

5'-AACTTGCAAGGCAATGTGG-3' (Jaklistch *et al.*, 2005). The amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 3 min, 35 denaturation cycles at 94 °C 30 s, alignment at 58°C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, final extension at 72 °C for 7 min.

Sample preparation for sequencing. Eppendorf tubes with 3 µl of purified PCR product (50 ngµL⁻¹), 3 µL of primer (1µM) and 2 µl of miliQ water. The samples were sent to the Sequencing Department of the University of Salamanca, Spain.

Sequences analysis in genomic databases. The sequences obtained were analyzed using FinchTV version 4.1 and DNASTAR in order to obtain consensus sequences. Then, a BLAST alignment analysis in the Genbank database was performed.

Phylogenetic analysis. To identify the phylogenetic relation of the isolates, external groups to *Trichoderma viride* and *Trichoderma longibrachiatum* (Mohammad *et al.*, 2014) were used. Both sequences were aligned using BioEdit Sequence Alignment ver. 7.05 (Hall, 2004); the phylogenetic relations were established using the heuristic method in the parsimony analysis with the program Past version 207 (Harmer *et al.*, 2001). The robustness of the internal branches was assessed with 1000 bootstrap replications.

Antagonism tests

In vitro confrontation tests were performed on 10 native isolates of *Trichoderma* and *Phytophthora infestans*, using a modified version of the method of Larralde *et al.*, (2008), as follows: on Petri dishes containing PDA, antagonists and pathogens were confronted by placing a 5 mm diameter circle of active mycelium in face to face on each dish, separated by approximately 5 cm; they were incubated at 25±2 °C for seven days. This test was carried out in batch (in triplicate) using three

et al., 2001). Se obtuvo el análisis cladístico de parsimonia, mediante un Bootstrap Heuristic.

Pruebas de antagonismo

Se realizaron pruebas de confrontación *in vitro* entre las 10 cepas nativas de *Trichoderma* y *Phytophthora infestans*, por el método modificado de Larralde *et al.*, (2008), como se describe a continuación: en cajas Petri con PDA se confrontaron antagonistas contra patógenos, colocando frente a frente un disco de 5 mm de diámetro de micelio activo de cada uno de ellos, separados 5 cm aproximadamente, se incubaron a 25 ± 2 °C por siete días. Este ensayo se hizo por triplicado, con tres repeticiones de cada cepa de *Trichoderma*. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial fue monitoreado cada 24 h, usando la siguiente fórmula: $PIRG = [(R1-R2)/R1] \times 100$, donde R1 es el crecimiento radial del control no confrontado con la cepa de *P. infestans* y R2 es el crecimiento radial del crecimiento de *Trichoderma* confrontado con *P. infestans*. Las pruebas de confrontación se realizaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar, para cada una de las 10 cepas nativas de *Trichoderma* que se enfrentaron contra *P. infestans*. El potencial de cada cepa de *Trichoderma* como agente de biocontrol para la infección por *P. infestans* se evaluó mediante análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, $p \leq 0.05$), utilizando el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización morfológica macroscópica de *Trichoderma* y *P. infestans*

Con excepción de la cepa TF10, las cepas nativas de *Trichoderma* presentaron micelio de

repetitions of each strain of *Trichoderma*. The inhibition percentage of their radial growth was monitored every 24 hours using the following formula: $PIRG = [(R1-R2)/R1] \times 100$, where R1 is the radial growth of the non-confronted strain of *P. infestans*, and R2 is the radial growth of *Trichoderma* confronted against *P. infestans*. Confrontation test were performed according to a randomized experimental design for each of the 10 native isolates of *Trichoderma* confronted against *P. infestans*. The potential of each strain of *Trichoderma* as a biocontrol agent of *P. infestans* infection was evaluated by variance analysis and multiple media comparison (Tukey, $p \leq 0.05$), using the Statistical Analysis System (SAS) software version 9.

RESULTS AND DISCUSION

Macroscopic morphological characterization of *Trichoderma* and *P. infestans*

Except for strain TF10, the native isolates of *Trichoderma* developed abundant fluffy mycelium (Figure 1). Isolates TL2, TL4, TX8 y TT6 developed from two to three well defined concentric white (mycelium) and green (conidia) rings. Strain TL5 developed yellow pigmentation and concentric rings. Meanwhile, no rings were observed in isolates TX7, TF10, TL6 TF8 y TJ6, and the mycelium spread evenly on the dishes. Conidial pigmentation of isolates ranged from light green to dark green. Although the isolates came from the same location, they developed different pigmentation, as in the case of those from San Francisco Tetetla, where TL2, TL4, TL5 and TL6 developed green pigmentation with different tones. The shape and quantity of conidia observed on the dishes may have been caused by factors contributing to a stress environment, such

consistencia esponjosa abundante (Figura 1). Las cepas TL2, TL4, TX8 y TT6 presentaron de dos a tres anillos concéntricos bien definidos, blancos (micelio) y verdes (conidias). La cepa TL5 presentó pigmentación amarilla y anillos concéntricos. Mientras tanto, en TX7, TF10, TL6 TF8 y TJ6 no se observaron los anillos y el micelio se extendió de manera homogénea en las placas. La pigmentación conidial de las cepas fue desde una tonalidad verde claro a verde oscuro. Aunque las cepas son de la misma localidad presentaron pigmentación diferente, tal es el caso de San Francisco Tetetla donde TL2, TL4, TL5 y TL6 tuvieron pigmentación verde

as: light exposure, lack of nutrients or pH changes (Osorio-Concepción *et al.*, 2013). The shape and pigmentation of the mycelium observed in the native isolates are related to the *Trichoderma* genus, according to Barnett and Hunter (1972) taxonomic identification criteria. These characteristics differ among native isolates and none of them resembles each other; for this reason, it was difficult to group them and identify the species based on these data.

The strain of *P. infestans* developed abundant white fluffy mycelium with beige tones caused by the presence of sporangia. No concentric ring development was observed (Figure 2).

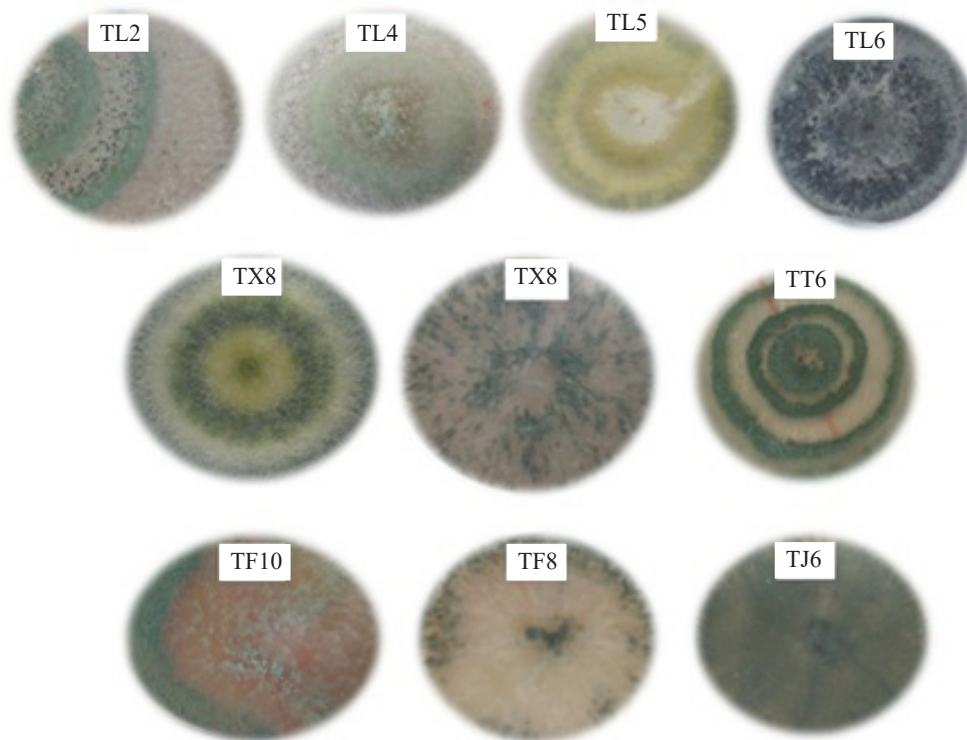


Figura 1. Colonias de las 10 cepas nativas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA.
Figure 1. Cultures from the 10 native strains of *Trichoderma* spp. on PDA medium.

con diferentes tonalidades. La forma y cantidad de la conidiación observada en las placas, puede ser estimulada por factores que propician un ambiente de estrés, como son: la exposición a la luz, la falta de nutrientes o cambios en pH (Osorio-Concepción *et al.*, 2013). La forma y la pigmentación del micelio observado en las cepas nativas corresponden al género *Trichoderma* de acuerdo a los criterios de identificación taxonómica de Barnett y Hunter (1972). Estas características difieren entre las cepas nativas y ninguna se parece entre sí, por esta razón es difícil agruparlas y definir especies a partir de estos datos (Gupta *et al.*, 2013).

La cepa de *P. infestans* mostró micelio blanco de consistencia esponjosa abundante y con una tonalidad ligeramente beige por la presencia de los esporangios. No se apreció formación de anillos concéntricos (Figura 2).

Caracterización morfológica microscópica de *Trichoderma* y *P. infestans*

Para *P. infestans* se observaron hifas hialinas y ramificadas con diámetro 5-8 μm , esporangióforos alargados con pedicelo de 5 μm y esporangios elipsoidales ($28.2 \pm 11 \times 17.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$) con papilas caducas (Figura 3). Estos resultados se apegan a las características que reportan Erwin y Robeiro (1996) para *P. infestans*. También coinciden con la descripción de los aislados de *P. infestans* reportados por López-Orona *et al.* (2013).

Los resultados de las observaciones microscópicas de *Trichoderma* mostraron que las cepas TF8, TX7, TX8, TT6 y TL2 presentaron conidias ligeramente ovoides, dispuestas en roseta en grupos de 4 a 6, clamidosporas abundantes y globosas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados en grupos de 3 a 4, ornamentación finamente espinosa y conidióforos ramificados (Figura 4). Estas características coinciden con los estudios reportados por

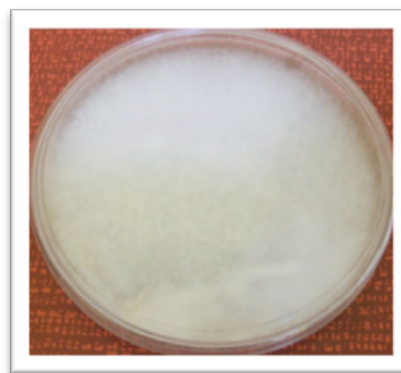


Figura 2. Aspecto de la colonia de la cepa de *P. infestans* en medio de cultivo PDA.

Figure 2. Mycelium of *P. infestans* grown on PDA culture medium.

Microscopic morphological characterization of *Trichoderma* and *P. infestans*

P. infestans showed 5-8 μm in diameter hyaline and ramified hyphae, long sporangiospores with 5 μm pedicel, and ellipsoidal sporangia ($28.2 \pm 11 \times 17.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$) with aged papillae (Figure 3). These results are in agreement with the characteristics reported by Erwin and Robeiro (1996) for *P. infestans*. They also agree with the description of *P. infestans* isolates reported by López-Orona *et al.* (2013).

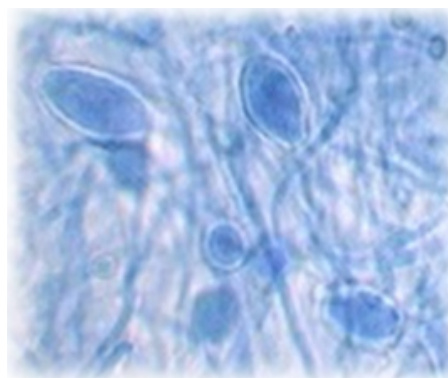


Figura 3. Esporangios elipsoidales de *P. infestans*.

Figure 3. Ellipsoidal sporangia of *P. infestans*.

Samuels *et al.*, (2010). La cepa TL4 presentó conidias ovoides y fialides en par o triadas a lo largo del conidióforo, más anchas en el centro que en la base, características que permiten clasificarla como *T. asperelloides*. Las cepas TL5, TL6, TF10, TJ6 presentaron hifas hialinas, conidióforos largos con ramificación, fialides anchas por el centro y alargadas en la base agrupadas piramidalmente, conidias globosas de pared lisa y abundantes clamidosporas

The results from microscopic observations of *Trichoderma* showed that TF8, TX7, TX8, TT6 and TL2 developed slightly ovoid conidia arranged in rosette-like clusters of 4-6, abundant and spherical chlamydospores, apical phialides arranged in the form of transverse whorls in groups of 3-4, fine thorny ornamentation and ramified conidiophores (Figure 4). These characteristics are in agreement with those reported by Samuels

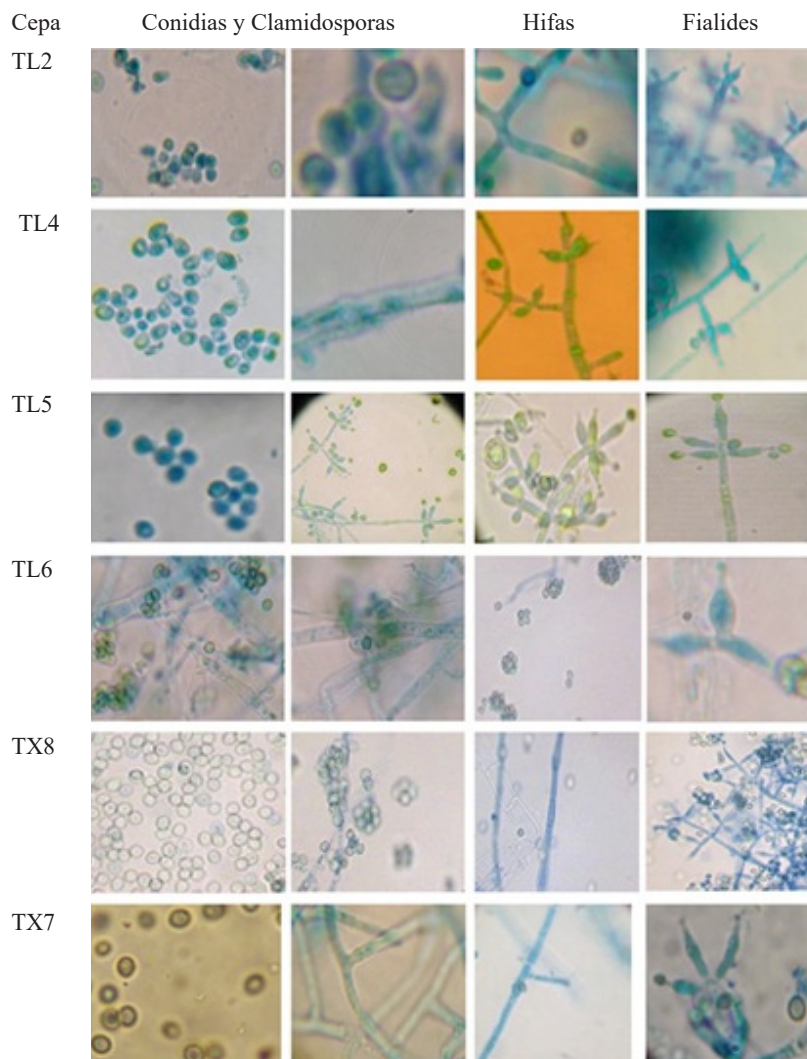


Figura 4. Características microscópicas de las cepas nativas de *Trichoderma* a 100X.
Figure 4. Microscopic characteristics of native isolates of *Trichoderma* at 100X.

terminales, características que revelan un acercamiento a *Hypocrea* (Chaverri y Samuels, 2002; Druzhinina y Kubicek, 2005; Ortiz-García *et al.*, 2015). Debido a que las características morfológicas macroscópicas y microscópicas son variables, no permiten discriminar entre especies, lo cual muestra la importancia de la caracterización molecular para clasificar taxonómicamente a las cepas, ya que un diagnóstico a nivel de especie basado en caracteres morfológicos puede derivar en un diagnóstico erróneo, tal como sucedió en los estudios realizados por Hermosa *et al.*, (2000) quienes realizaron la caracterización molecular de cepas de una colección que habían sido clasificadas morfológicamente como *T. longibranchiatum*; encontrando que se trataba de *T. asperellum*.

Caracterización molecular

La amplificación del ADN genómico de las cepas con los primers ITS1 y ITS4 fue de 600 pb, observándose bandas bien definidas (Figura 5). La amplificación del ADN genómico de los aislados con el par de primers tef1 278f y tef1ller fue de 1200 pb (Figura 6). Los resultados obtenidos del GenBank mediante el análisis Blast de las secuencias amplificadas de los dos pares de primers, mostró que de las 10 cepas, seis (TL2, TL4, TF8, TT6, TX7 y TX8) tienen una identidad del 99 % con *T. asperellum*. Las cuatro cepas restantes (TJ6, TL5, TL6 y TF10) presentaron una identidad del 99 % con *Hypocrea lixii*, el teleomorfo de *T. harzianum* (Cuadro 2). Por la variabilidad de los ITS a veces es difícil discriminar entre especies, por lo que se amplificó un fragmento del gen tef1 α , lo cual ayudó a corroborar la taxonomía de los aislados nativos. Esto coincide con lo reportado por Druzhinina y Kubicek (2005) y Kredics *et al.* (2014), quienes indican que estos marcadores son básicos para la caracterización de *Trichoderma/Hypocrea*. Así

et al., (2010). Strain TL4 developed ovoid conidia and phialides in pairs or groups of three all along the conidiophore that were wider at the center than at the base; based on these characteristics, it can be classified as *T. asperelloides*. Isolates TL5, TL6, TF10 and TJ6 showed hyaline hyphae, long ramified conidiophores, phialides wide at the center, long at the base and grouped in a pyramid, smooth-walled globose conidia and many terminal chlamydospores; these characteristics show a similarity to *Hypocrea* (Chaverri and Samuels, 2002; Druzhinina y Kubicek, 2005; Ortiz-García *et al.*, 2015). Since the macroscopic morphological characteristics vary, they do not allow discriminating among species, which highlights the importance of the molecular characterization to taxonomically classify the isolates, given that a diagnosis at the species level based on morphological traits may result in a wrong diagnosis, as in the studies conducted by Hermosa *et al.*, (2000), who performed molecular characterization of isolates from a collection that had been morphologically classified as *T. longibranchiatum* but that was actually *T. asperellum*.

Molecular characterization

The genomic DNA amplification of the isolates using primers ITS1 and ITS4 was of 600 bp (Figure 5). The genomic DNA amplification of isolates with the primers pair tef1 278f and tef1ller was 1200 bp (Figure 6). The results from GenBank through a BLAST analysis of the amplified sequences of the two primer pairs showed that from the 10 isolates, six (TL2, TL4, TF8, TT6, TX7 y TX8) were 99 % identical to *T. asperellum*. The other four isolates (TJ6, TL5, TL6 y TF10) were 99 % identical to *T. harzianum* a anamorph of *Hypocrea lixii* (Table 2). Due to the ITS variability, it is sometimes difficult to discriminate among species, so a fragment of the

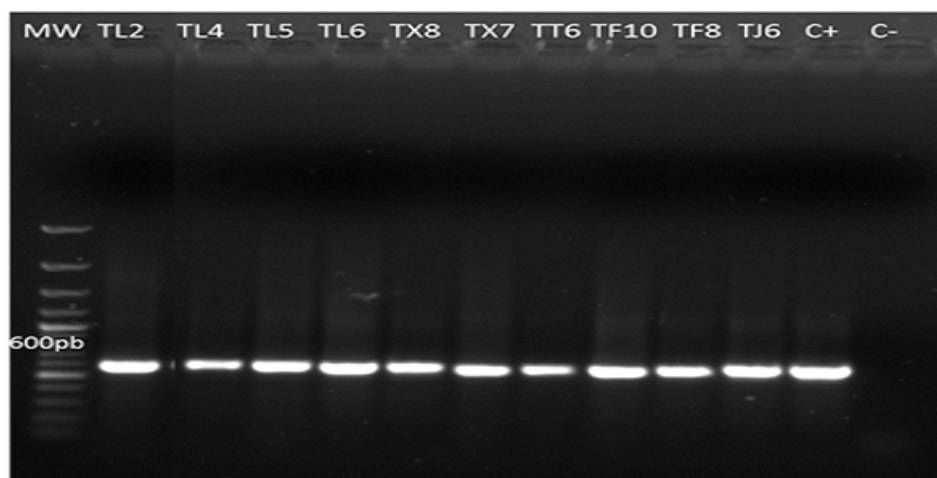


Figura 5. Productos de amplificación de PCR a partir de ADN genómico de 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 y TJ6) a 600pb con los primers ITS1, ITS4. MW= marcador de peso molecular (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+= Control positivo (*T. asperellum*). C- = Control negativo. Gel de agarosa al 0.8 %.

Figure 5. PCR amplification products from genomic DNA of 10 native strains of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 and TJ6) at 600bp with primers ITS1, ITS4. MW= molecular weight marker (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+ = Positive control (*T. asperellum*). C- = Negative control. 0.8 % agarose gel.

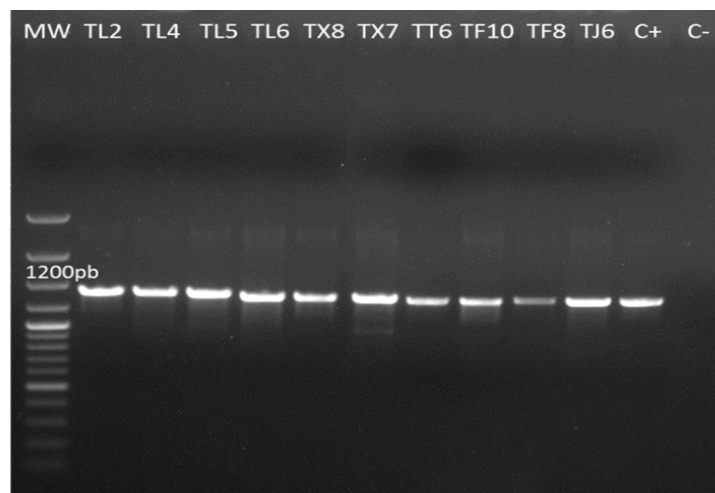


Figura 6. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de los aislados nativos de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 y TJ6) a 1200pb con los primers, tef1 α 278f y tef11er. MW= marcador de peso molecular (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+= Control positivo (*T. asperellum*). C- = Control negativo. Gel de agarosa al 0.8 %.

Figure 6. PCR amplification products from genomic DNA of native isolates of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 and TJ6) at 1200bp with primers tef1 α 278f and tef11er. MW= molecular weight marker (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+ = Positive control (*T. asperellum*). C- = Negative control. 0.8 % agarose gel.

Cuadro 2. Especies de *Trichoderma/Hypocrea* presentes en la zona hortícola del Valle de Toluca, México, identificadas mediante la amplificación de los espaciadores internos transcritos (ITS) y un fragmento del gen translation elongation factor 1 alpha (*tef1α*).

Table 2. *Trichoderma/Hypocrea* species found in the Toluca Valley, Mexico, horticultural zone, identified through amplification of internal transcribed spacers (ITS) and a fragment of the gen translation elongation factor 1 alpha (*tef1α*).

Cepa	Identificación molecular ITS1-ITS4	Identidad (%)	Cepa de referencia Genbank	TEF1α	Identidad (%)	Cepa de referencia Genbank
TX7	<i>T.asperellum</i>	97	LC002589	<i>T. asperellum</i>	99	FJ436181
TX8	<i>T.asperellum</i>	99	KP721591	<i>T.asperellum</i>	99	KP009011
TJ6	<i>H. lixii</i>	99	AY605733	<i>H. lixii</i>	99	FJ179573
TT6	<i>T.asperellum</i>	99	KP883284	<i>T. asperellum</i>	99	FJ179573
TL2	<i>T.asperellum</i>	99	LN846676	<i>T.asperellum</i>	99	FJ436181
TL4	<i>T.asperellum</i>	99	KC859434	<i>T.asperellum</i>	99	KP009011
TL5	<i>H. lixii</i>	99	AY605752	<i>H. lixii</i>	99	FJ179573
TL6	<i>H. lixii</i>	99	FR872742	<i>H. lixii</i>	99	KF923284
TF8	<i>T.asperellum</i>	99	KC8594341	<i>T.asperellum</i>	99	KP009011
TF10	<i>H. lixii</i>	99	FJ860767	<i>H. lixii</i>	98	KPO08786

mismo, los estudios de Ortiz-García *et al.* (2015) demuestran que las secuencias ITS permiten identificar exitosamente aislados de *Trichoderma/Hypocrea*.

Los resultados obtenidos indican que las cepas TL2, TF8, TT6, TX7 y TX8 identificadas por caracteres morfológicos como *T. asperellum* efectivamente pertenecen a esta especie. La cepa TL4, que inicialmente fue clasificada como *T. asperelloides*, fue reclasificada con base en los estudios moleculares como *T. asperellum*. De esta manera queda demostrado que la identificación molecular respalda la descripción morfológica y estos elementos permiten tener un diagnóstico taxonómico acertado y confiable. Por otra parte, estos resultados coinciden con los estudios de Guigón *et al.*, (2010), quienes reportan la presencia de cepas de *T. asperellum* en cultivos hortícolas. La cepas TJ6, TL5, TL6 y TF10 que inicialmente fueron clasificadas como *Hypocrea*, fueron ubicadas taxonómicamente a partir de los análisis moleculares como *H. lixii*.

Los resultados obtenidos de la caracterización de las cepas nativas de la zona hortícola del Valle

tef1α gen was amplified, as this helped to confirm the taxonomy of the native isolates. This result agree with the findings reported by Druzhinina and Kubicek (2005), and Kredics *et al.* (2014), who stated that these markers are essential to characterize *Trichoderma/Hypocrea*. Also, studies conducted by Ortiz-García *et al.* (2015) show that ITS sequences are useful to successfully identify *Trichoderma/Hypocrea* isolates.

The results obtained show that TL2, TF8, TT6, TX7 and TX8 identified by morphological traits as *T. asperellum* actually belong to this species. Strain TL4, which was initially classified as *T. asperelloides*, was reclassified as *T. asperellum* based on molecular studies. These results show that the molecular identification supports the morphological description and that these elements lead to an accurate and reliable taxonomic diagnosis. On the other hand, these results are similar to those obtained by Guigón *et al.*, (2010), who reported the presence of isolates of *T. asperellum* in horticultural crops. Isolates TJ6, TL5, TL6 y TF10, which were initially classified as *Hypocrea/Trichoderma*, were

de Toluca, son significativos, ya que *H. lixii* y *T. asperellum* son especies que no se habían reportado para esta región y son de uso importante como agentes de control biológico en cultivos hortícolas (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006; Hermosa *et al.*, 2012).

Análisis filogenético

El análisis se realizó de manera heurística y se obtuvieron 82 árboles filogenéticos igualmente parsimoniosos, con índice de consistencia de 0.97 y reescalado de 0.99, lo cual indica que están bien soportados (Figura 7). El estadístico bootstrap para el soporte de las ramas se obtuvo con 100 repeticiones y se consideraron valores de 60 y 100 % como indicadores de ramas estadísticamente fuertes. Esto es importante, ya que indica que los grupos analizados corresponden a las especies esperadas, lo que coincide con los estudios reportados por Sadfi-Zouaoui *et al.* (2009). El árbol filogenético indica que la especie más frecuente fue *T. asperellum* con una mayor distribución en la zona de estudio, ya que las cepas pertenecen a cuatro de las cinco localidades muestreadas (Figura 7). En Tenango del Valle se encontró *T. asperellum*, lo cual no coincide con estudios de Osorio *et al.*, (2005) quienes reportan la presencia de *T. harzianum* y *T. lignorum*. Sin embargo, dicho estudio solo se limitó a caracterización morfológica, lo cual pudo conducir a una determinación errónea. De aquí la importancia de rescatar las especies nativas con potencial de biocontrol hacia fitopatógenos, tales como *T. asperellum* e *H. lixii*. Este último se encontró en las localidades de San Francisco Putla (TF10), San Francisco Tetetla (TL5, TL6) y San Juan la Isla (TJ6). Al parecer las condiciones geográficas y ambientales establecieron este patrón de distribución, ya que estas localidades están geográficamente cercanas. Esto se muestra en el análisis filogenético, sustituyendo a los taxones por sus localidades, donde

taxonomically identified as *H. lixii/T.harzianum* through molecular analysis.

The results obtained from characterization of native isolates from the Toluca Valley horticultural zone are significant, since *T. harzianum/H. lixii* and *T. asperellum* are species that had not been reported before in this region, and they are important as biological control agents in horticultural crops (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006).

Phylogenetic analysis

In this case, we performed a heuristic analysis and obtained 82 phylogenetic trees; they were equally parsimonious with a consistency index of 0.97 and 0.99 retention index, which suggests that they were well supported (Figure 7). For statistical bootstraps to obtain branch support values, 1000 replications were used, and values of 60 and 100% were considered as indicators of statistically strong branches. This is important as it confirms

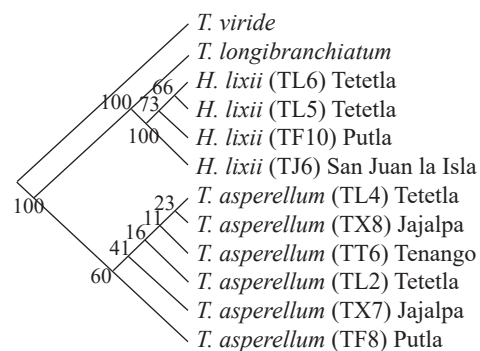


Figura 7. Relación filogenética de 10 cepas nativas de *Trichoderma/Hypocrea*, por el análisis de secuencias ITS1 e ITS4. La filogenia fue inferida por el método de máxima parsimonia con índice de consistencia de 0.97 y reescalado de 0.99.

Figure 7. Phylogenetic relation of 10 native strains of *Trichoderma/Hypocrea* obtained through ITS1 and ITS4 sequences analysis. Phylogenetic was inferred by the maximum parsimony method with a consistency index of 0.97 and 0.99 upscaling.

se observa una estrecha relación entre las especies encontradas en las tres localidades mencionadas. Por otra parte, es importante mencionar que aunque las 10 cepas corresponden a dos especies, en el árbol se agrupan de manera separada, lo que coincide con los resultados de la descripción morfológica macroscópica tan diversa, ya que aunque la pigmentación y la forma de crecimiento micelial son diferentes entre sí, pertenecen a una misma especie.

Pruebas de antagonismo

Los resultados de las pruebas de antagonismo entre los 10 aislados nativos de *Trichoderma* y *Phytophthora infestans* mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Para el caso de *T. asperellum*, TX8 y TF8 presentaron los porcentajes más altos de biocontrol hacia el patógeno, con 98 y 76 % respectivamente (Figura 8), mientras que TL4 presentó el valor más bajo (49 %). A pesar de esto, se puede afirmar que *T. asperellum* ejerció un mayor biocontrol sobre *P. infestans*. La variación de estos porcentajes coincide con los estudios *in vitro* reportados por Kerroum *et al.* (2015), quienes reportan

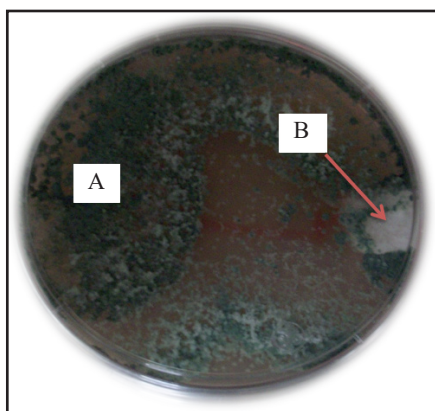


Figura 8. Actividad de antagonismo. (A) *Trichoderma asperellum* TX8, (B) *Phytophthora infestans*.

Figure 8. Antagonism activity. (A) *Trichoderma asperellum* TX8, (B) *Phytophthora infestans*.

that the analyzed groups relate to the expected species, which is similar to the results reported by Sadfi-Zouaoui *et al.* (2009). The phylogenetic trees show that the most frequently found species was *T. asperellum* with a wider distribution in the study zone, since the isolates belong to four of the five sampled locations (Figure 7). *T. asperellum* was found in Tenango del Valle, this finding is being in agreement with studies conducted by Osorio *et al.*, (2005), who reported the presence of *T. harzianum* and *T. lignorum*. However, the study was limited only to morphological characterization, and this may have led to a wrong determination. Therefore, it is important to rescue native species with potential as biocontrol agents against plant pathogens such as *T. asperellum* and *T. harzianum/H. lixii*. The latter was found in San Francisco Putla (TF10), San Francisco Tetetla (TL5, TL6) and San Juan la Isla (TJ6). It seems that the geographic and environmental conditions established this distribution pattern because of the geographic proximity of the three locations. This was shown by the phylogenetic analysis, replacing taxa by their locations, where a close relation among the species found in the three locations was observed. It is also important to mention that although the 10 isolates belong to the two species, in the tree they are individually grouped, which agrees with the results of the highly diverse macroscopic morphological description. Though their pigmentation and mycelia growth differ from each other, they belong to the same species.

Antagonism tests

The results from antagonism tests between the 10 native *Trichoderma* and *Phytophthora infestans* isolates showed significant differences ($p \leq 0.05$). In the case of *T. asperellum*, TX8 and TF8 had the highest percentages of biocontrol of

biocontrol de *T. harzianum* hacia *P. infestans* con un rango de 56 a 86 %. Los porcentajes de biocontrol encontrados en este estudio son similares a los reportados por Al-Mughrabi (2008), donde especies de *T. atroviride* evaluadas *in vitro* muestran un 92 % de control sobre *P. infestans*. Además superan a los obtenidos por Debebe *et al.*, (2011) donde el valor mínimo de biocontrol de *T. viride* fue de 36.7 % hacia este oomiceto. Por otra parte, a pesar de que *H. lixii* presenta los porcentajes más bajos de biocontrol, están por arriba del 50 %. Los resultados son consistentes con de los Santos *et al.* (2013), quienes reportan porcentajes de control mayores para *T. asperellum* comparado con *H. lixii* en estudios de antagonismos contra *Colletotrichum gloeosporoides*, causante de la antracnosis en mango. Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los realizados con las mismas cepas por García-Núñez *et al.* (2012), en los que los valores más altos de inhibición contra *Sclerotinia* sp corresponden a las cepas de *T. asperellum* TX8 y TL4, con 88 y 86 %, respectivamente (Cuadro 3). Sin embargo, en este estudio el aislado TL4 (*T. asperellum*) registró el valor más bajo de inhibición contra *P. infestans* (49 %). Este mismo caso lo presentó TF10 (*H. lixii*) que registró 80 % para el control de *Sclerotinia* sp. y un 66 % para *P. infestans*. TF8, TX7, TL2, TT6, TJ6, TL5 y TL6 registraron porcentajes menores de biocontrol para *Sclerotinia* sp., no así para *P. infestans*. Estos resultados coinciden con Matroudi *et al.*, (2013) quienes reportan especies de *Trichoderma* con un bajo efecto de biocontrol sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que no rebasan el 80%. Por otra parte, Aceves *et al.*, (2009) reportan especies de *Trichoderma* con un biocontrol del 5.35 % al 62.9 %. Por todo lo anterior, los resultados son interesantes, ya que *P. infestans* es un patógeno agresivo que tiene la capacidad de mutar con facilidad (López *et al.*, 2013), a pesar de lo cual se encontraron aislados de *T. asperellum* con poten-

the pathogen (98 and 76 %, respectively) (Figure 8), while TL4 had the lowest value (49 %). Despite of this, we can affirm that *T. asperellum* showed a higher biocontrol of *P. infestans*. The variation of these percentages is similar to the *in vitro* studies conducted by Kerroum *et al.* (2015), who reported biocontrol values of *T. harzianum* against *P. infestans* between 56 to 86 %. The biocontrol percentages obtained in this study are similar to those reported by Al-Mughrabi (2008), where the *T. atroviride* strain evaluated *in vitro* showed 92% of control of *P. infestans*. Furthermore, they exceeded the results obtained by Debebe *et al.*, (2011), where the minimum value of biocontrol of *T. viride* on the oomycete was 36.7 %. On the other hand, despite *T. harzianum/H. lixii* has the lowest percentages of biocontrol, these are higher than 50%. These results are in agreement with those obtained by Santos *et al.* (2013), who reported higher control percentages of *T. asperellum* compared to *T. harzianum/H. lixii* in antagonism studies against *Colletotrichum gloeosporoides*, which causes mango anthracnose.

The results obtained in this study differ from those obtained by García-Núñez *et al.* (2012) using the same isolates, where the highest inhibition values against *Sclerotinia* sp belong to isolates TX8 and TL4 of *T. asperellum*, with 88% and 86%, respectively (Table 3). However, in this study, isolate TL4 (*T. asperellum*) had the lowest inhibition value against *P. infestans* (49 %). TF10 (*H. lixii*) showed similar values with 80 % of control of *Sclerotinia* sp. and 66 % of *P. infestans*. Isolates TF8, TX7, TL2, TT6, TJ6, TL5 and TL6 had the lower percentages of biocontrol of *Sclerotinia* sp., but not for *P. infestans*. These results agree with those obtained by Matroudi *et al.*, (2013), who reported *Trichoderma* species with little biocontrol effect of *Sclerotinia sclerotiorum*, which do not exceed 80%. Also, Aceves *et al.*, (2009) reported *Trichoderma* species with 5.35 %

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de 10 cepas nativas de *Trichoderma* sobre *P. infestans*.

Table 3. Inhibition percentage of 10 native isolates of *Trichoderma* against *P. infestans*.

Cepa	Especie	Inhibición %
TL2	<i>T. asperellum</i>	*68.36bc
TL4	<i>T. asperellum</i>	49.74c
TL5	<i>H. lixii</i>	65.99bc
TL6	<i>H. lixii</i>	55.84c
TX7	<i>T. asperellum</i>	68.22bc
TX8	<i>T. asperellum</i>	98.12a
TT6	<i>T. asperellum</i>	56.92bc
TF8	<i>T. asperellum</i>	76.41b
TF10	<i>H. lixii</i>	66.43bc
TJ6	<i>H. lixii</i>	65.26bc

*Valores con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

cial para el control de este oomicete. Los aislados de *H. lixii* que registraron un potencial por arriba del 50 % se pueden potenciar en estudios posteriores para un biocontrol más efectivo, para realizar pruebas *in vivo* en una siguiente etapa con las cepas más virulentas.

CONCLUSIONES

La caracterización morfológica, molecular y el análisis filogenético generan un diagnóstico confiable, que permitió identificar a las cepas de *Trichoderma* aisladas de la zona hortícola del Valle de Toluca, México como *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea lixii*. Estas especies son consideradas con actividad biológica de amplio espectro de acción sobre fitopatógenos de cultivos. El análisis filogenético refleja la relación que existe entre la distribución geográfica de las dos especies encontradas, donde *T. asperellum* fue más frecuente. La

to 62.9 % of biocontrol. Based on this, the results are interesting, considering that *P. infestans* is an aggressive pathogen able to mutate easily (López *et al.*, 2013); however, we found *T. asperellum* isolates with potential to control such oomycete. The isolates of *T. harzianum/H. lixii* with potential higher than 50% can be strengthened to perform a more effective biocontrol and use them in *in vivo* tests in further stages, with more virulent isolates.

CONCLUSIONS

The morphological and molecular characterization, as well as the phylogenetic analysis performed, provided a reliable diagnosis to identify isolates of *Trichoderma* isolated in the horticultural zone of the Toluca Valley, Mexico, as *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum/Hypocrea lixii*. These species are considered to have biological activity of wide action spectrum on crop plant pathogens. The phylogenetic analysis shows the existing relation among the geographic distribution of the two species, where *T. asperellum* was more frequently found. Strain TX8 identified as *T. asperellum*, due to its high percentage of biocontrol of *P. infestans* and *Sclerotinia* sp., can be a candidate to control these plant pathogens. It can be an agroecological alternative to control the late blight disease in the State of Mexico, given that it is a native strain and may have greater chances of adaptability and success compared to isolates currently available in the market. For this reason, we recommend to conduct studies at greenhouse level and then in the field, including different application doses and methods. The isolates identified can be also be evaluated as biocontrol agents of other pathogens in further studies.

cepa TX8 identificada como *T. asperellum*, al presentar un alto porcentaje de biocontrol sobre *P. infestans* y *Sclerotinia* sp., puede ser candidata para el control de estos fitopatógenos, lo que representaría una alternativa agroecológica para el control del tizón tardío en el Estado de México, ya que se trata de una cepa nativa que puede tener mayores posibilidades de adaptabilidad y éxito en comparación con las cepas disponibles actualmente de manera comercial. Por ello es recomendable realizar estudios a nivel de invernadero y posteriormente en campo, incluyendo diferentes dosis y métodos de aplicación. Las cepas identificadas pueden evaluarse así mismo como agentes de biocontrol sobre otros patógenos en futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada a H. García-Núñez para la realización de sus estudios de Doctorado, a la Secretaria de Educación Pública por el financiamiento al programa PIFI para realizar este proyecto y al Instituto Hispano-Luso de Ciencias Agrarias de la Universidad de Salamanca, España por el apoyo en los estudios moleculares y a los revisores, especialmente a la Editora Asociada, quienes pacientemente contribuyeron a mejorar la estructura del documento.

LITERATURA CITADA

- Al-Mughrabi K. 2008. Biological Control of *Phytophthora infestans* of Potatoes using *Trichoderma atroviride*. Pest Technology. 2 (2): 104-108. <http://dx.doi.org/10.3923/PPJ.2005.5.7>
- Altieri A. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 74: 19-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Bailey A, Bae H, Strem M, Crozier J, Thomas S, Samuels G, Vinyard B and Holmes K. 2008. Antibiosis, mycoparasitism and colonization success for endophytic *Trichoderma*

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the National Council of Science and Technology (CONACyT) for the support scholarship granted to H. García-Núñez for her PhD studies; to the Secretariat of Public Education for funding the PIFI program to conduct this research project; to the Hispano-Luso Institute of Agricultural Sciences of the University of Salamanca, Spain, for its support to conduct the molecular studies and to the reviewers, especially the Associate Editor who patiently contributed to improve the structure of the document.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biocontrol 46(1):24-35. <http://doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Barnett H and Hunter B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. EE. UU. Burgess Publ. Co. 241pp. <http://dx.doi:10.2307/3757954>
- Chaverri and Samuels G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreae): species with green ascospores. Stud. Mycol.48:1-116. <http://dx.doi:10.2307/3761915>
- Chaverri P and Samuels G. 2002. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. Mycological Progress 1(3):283-286. <http://dx.doi:10.1007/s11557-006-0025-8>
- De la Cruz-Pérez, D., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 86 (4), 947-961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- De los Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D. A., Gómez-Lim, M. A., Délano-Frier, J. P., de-Folter, S., Sánchez-García, P., and Peña-Cabriales, J. J. (2013). 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006>
- Debebe Z, Amutha S, Dereje G, Mesfin T and Bekele K. 2011. Biocontrol activity of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* under greenhouse conditions. Journal of Agricultural Technology. 7(6): 1589-1602. <http://dx.doi:10.5423/PPJ.2004.20.1.075>
- Druzhinina S. and Kubicek P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate

- species to species clusters? Journal of Zhejiang University Science. 6(2):100-112. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3065-3059.1998.00179.x>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2010. *Perspectivas Agrícolas OCDE-FAO*. [http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2010-2-es](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2010-2-es)
- García-Núñez H., Romero G, González E, Nava B y Martínez C. 2012. Isolation of Native Strains of *Trichoderma* spp. from horticultural soils of the Valley of Toluca, for potential biocontrol of Sclerotinia. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 15:357-365. Disponible en línea: <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/890>.
- Guigón-López C, Guerrero P, Vargas A, Carvajal M, Ávila Q, Bravo L, Ruocco L, Lanzuise S, Woo S. y Lorito M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp., su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 28:87-96. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61218468002.pdf>
- Hall T. 2004. Biological sequence alignment editor. Ibis bioscience. Carlsbad Ca. Hammer O, Harper D. and Ryan P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontology electronic 4(1):9. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470750711>
- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56. Disponible en línea: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035008](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035008). <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harman G, Obregon M, Samuels G and Lorito M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developed and developing world. *Plant Disease* 94: 928-939. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0928>
- Harris I. J. 1986. Modified method for fungal slide culture. *Journal of clinical microbiology.* 24(3): 460-461. Disponible en línea: <http://jcm.asm.org/content/24/3/460.full.pdf>
- Hermosa R, Grondona I, Iturriaga E, Díaz M, Castro C, Monte E y García A. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology.* 66: 1890-1898. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>.
- Jaklitsch W, Komon M, Kubicek C, and Druzhinina I. 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. Nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia.* 97 (6): 1365-1378. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1365>
- Kerroum F, Karkachi N, Jamal E y Kihal M. 2015. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* in the North-west of Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR).* 6 (4): 44-53. Disponible en línea: <http://www.inns.pub.net>
- Kredics L, Hatvan L, Naeimi S, Körmöczy P, László M, Casaba V y Druzhinina I. 2014. Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. En: Gupta G. et al. (eds.) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam. pp. 3-24. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1>
- Larralde C, Santiago M, Sifuentes R, Rodríguez L, Rodríguez P, Shirai K, and Narváez Z. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 80: 167-177. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1532-0>
- López C, Martínez A, Peñuelas G., Arteaga T, Ruiz A, Gómez T y Palmero D. 2013. Presencia de aislamientos homotéticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México. *ITEA.* 109 (4):408-414. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0962-PDN>.
- Lorito M, Woo S, Harman G and Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 395-417. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114314>.
- Martínez, B., Solano T. 1994. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. *Revista Protección Vegetal,* 10: 221-22. Disponible en línea: [http://ecology.nottingham.ac.uk/~plzfg/EBBSoc/ejb11/5-Matroudi\\_et\\_al\\_2009.pdf](http://www.sidalc.net/cgi-Matroudi S, Zamani M and Motallebi M. 2009. Antagonistic effects of three species of <i>Trichoderma</i> sp. on <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, the causal agent of canola stem rot. <i>Egyptian Journal of Biology.</i> 11: 37-44. Disponible en línea: <a href=)
- Michel A, Otero S, Solano P, Ariza F, Barrios A y Rebolledo M. 2009. Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp., *Fusarium subglutinans*, (Wollenweb y Reinking) Nelson, Tousoun y Marasas y *F. oxysporum Schlecht.*, agentes causales de la “Escoba de bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología,* 27. 18-26. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01853309200900010](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01853309200900010)
- Miller J and Johnson D. 2000. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. *Phytopathology* 90: 220-227. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.3.220>
- Mohammad S, Mukesh S, Kumar V, Singh A, Sharma A, Sonika P, Rastogi S, Neelam P and Srivastava A. 2014. Phylogenetic diversity analysis of *Trichoderma* species based on internal transcribed spacer (ITS) marker. *African Journal of Biotechnology* 13(3):449-455. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2013.13075>
- Monte G. (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology.* 4 (1): 1-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s101230100001>
- Morrone J. 2001. Sistemática, biogeografía y evolución. México: UNAM. <http://dx.doi.org/10.1086/421671>
- Osorio-Concepción M., Casas F. S., Cortés P. C. 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología* 37: 41-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2011.11.002>
- Osorio-Nila, M. A., Vázquez-García, L. M., Salgado-Siclán, M. L., González-Esquivel, C. E (2005). Efecto de dos

- enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. para controlar *Sclerotinia* spp. en lechuga. Revista Chapingo Serie Horticultura. 11(3):203-208. <http://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2013.07.023>
- PHC (Plant, Health Care Mex.) Disponible en [www.agroquimicos-organicosplm.com/phc-t-22-1645-9](http://www.agroquimicos-organicosplm.com/phc-t-22-1645-9) (Consulta, septiembre 2016). <http://dx.doi.org/10.7748/phc.13.10.7.s7>
- Sadfi Z, Hannachi I, Rouaissi M, Hajlaoui M, Rubio M, Monte E, Boudabous A. and Hermosa R. 2009. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. Canadian Journal of Microbiology. 55:154-162. <http://dx.doi.org/10.1139/w08-101>.
- Samaniego-Gaxiola, J.A. 2008. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg.) Hennebert expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. Revista Mexicana de Fitopatología, 26: 32-39. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.37737>.
- Samuels G. J., Adnan I., Marie C. B., Sophie De R., Orlando P. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycologia. 102(4). 944-966. <http://dx.doi.org/10.3852/09-243>
- Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(3), 787-799. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. [http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2011-es](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2011-es)
- Taghdi Y, Hermosa R, Domínguez S, Rubio M, Essalmani H, Nicolás C. and Monte E. 2015. Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains in the control of Fusarium wilt of tomato. Phytopathology Mediterranea, 54(2), 232-240. [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-15226](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15226)
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology. 22: 837-845. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-71-282>
- Woo S, Scala F, Ruocco M, and Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology 96:181-185. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-96-0181>.