

# Antagonismo de cepas de *Trichoderma* aisladas en Tanaxuri, Michoacán, México contra patógenos postcosecha del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill)

Antagonism of *Trichoderma* strains isolated from Tanaxuri, Michoacan, Mexico against postharvest pathogens of avocado fruits (*Persea americana* Mill)

María Estela López-López<sup>1</sup>, Carmen Lizette Del-Toro-Sánchez<sup>2</sup>, Salvador Ochoa-Ascencio<sup>3</sup>, José Antonio Aguilar-López<sup>4</sup>, Oliviert Martínez-Cruz<sup>2</sup>, Jaime Alberto Madrigal-Pulido<sup>1</sup>, Miguel Angel Robles-García<sup>1</sup>, Ariadna Thalia Bernal-Mercado<sup>2</sup>, María Guadalupe Ávila-Novoa<sup>1</sup>, Pedro Javier Guerrero-Medina<sup>1</sup>, Melesio Gutiérrez-Lomelí<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Microbiana y Alimentaria, Departamento de Ciencias Básicas. Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad, No.1115, Col. Lindavista, C.P. 47810, Ocotlán, Jalisco. México

<sup>2</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

<sup>3</sup> Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Campus Uruapan. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán, México.

<sup>4</sup> Coordinación de Genómica Alimentaria, Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCM). Avenida Universidad 3000, Col. Lomas de la Universidad, C.P. 59103, Sahuayo, Michoacán, México.

## RESUMEN

Algunas especies del género *Trichoderma* poseen la capacidad de parasitar hongos patógenos de plantas. Esta característica propicia un alto potencial de uso en el control de las enfermedades (antracnosis) causadas por hongos en el fruto de aguacate postcosecha. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue el aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* de cultivos de aguacate con potencial antagonista *in vivo* e *in vitro* contra patógenos de este fruto. Las cepas fueron aisladas de raíz y suelo del huerto de aguacate en la localidad de Tanaxuri, Michoacán. Se obtuvieron seis cepas y se caracterizaron como TSONM1 (*Trichoderma* spp.), TRONM2 (*Trichoderma* spp.), TSONM3 (*Trichoderma* spp.), TSONM4 (*Trichoderma* spp.), TSONM5 (*Trichoderma* spp.) y TSONM6 (*Trichoderma harzianum*). Posteriormente, las cepas aisladas fueron confrontadas con *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *Phomopsis perseae* observándose inhibiciones *in vitro* mayores al 80 %. Mientras que en la evaluación *in vivo*, la cepa TSONM6 (*Trichoderma harzianum*) presentó mayor actividad antagónica contra *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*. Adicionalmente, los frutos de aguacate tratados con TSONM6, presentaron mínimos porcentajes (< 2 %) de pudrición de la pulpa y pedúnculo. Por lo tanto, *Trichoderma harzianum* podría ser una buena alternativa para el control biológico del aguacate en postcosecha.

**Palabras clave:** Antracnosis, control biológico, frutos de aguacate, *Trichoderma harzianum*.

## ABSTRACT

Some species of the genus *Trichoderma* have the ability to parasitize fungal plant pathogens. This characteristic provides a high potential for use in the control of diseases (anthracnose) caused by fungi in post-harvest avocado fruit.

Therefore, the objective of this research was the isolation and identification of native *Trichoderma* strains from avocado cultures with antagonistic potential *in vivo* and *in vitro* against pathogens of this fruit. The strains were isolated from the root and soil of the avocado in the town of Tanaxuri, Michoacán. Six strains were obtained and characterized as TSONM1 (*Trichoderma* spp.), TRONM2 (*Trichoderma* spp.), TSONM3 (*Trichoderma* spp.), TSONM4 (*Trichoderma* spp.), TSONM5 (*Trichoderma* spp.) and TSONM6 (*Trichoderma harzianum*). Subsequently, the isolated strains were confronted with *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. and *Phomopsis perseae*, observing *in vitro* inhibitions greater than 80 %. In the *in vivo* evaluation, the TSONM6 strain (*Trichoderma harzianum*) showed greater antagonistic activity against *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. and *P. perseae*. Additionally, the avocado fruits treated with TSONM6, presented minimum percentages (< 2 %) of pulp and peduncle rotting. Therefore, *Trichoderma harzianum* could be a good alternative for postharvest biological control of avocado.

**Key words:** Anthracnose, avocado fruits, biological control, *Trichoderma harzianum*.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) variedad Hass, es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria en México. En los últimos años la demanda mundial de este fruto se incrementado considerablemente (SIAP, 2021). Los frutos de aguacate son susceptibles a enfermedades postcosecha como la antracnosis y a la pudrición peduncular causada por varias especies de hongos incluyendo a *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *Phomopsis perseae* (Hartill y Everett, 2002; Santos et al., 2011; Twizeyimana et al., 2013). Las enfermedades de los frutos en postcosecha se manifiestan principalmente

durante el proceso de maduración y se potencian debido a los daños mecánicos, desórdenes fisiológicos, temperatura inadecuada de almacenamiento, largos periodos de refrigeración, época de cosecha y edad del fruto, entre otros (Arpaia *et al.*, 2018; Bowen *et al.*, 2018).

La antracnosis es la fuente principal de pérdidas pre y postcosecha ya que ocasiona una reducción en la calidad y cantidad de los productos, y ocurre en la mayoría de las zonas productoras de aguacate del mundo (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011). Las pérdidas pueden llegar hasta el 100 % dependiendo del patógeno y las condiciones climáticas (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016). El principal método se basa en la aplicación de fungicidas químicos no biodegradables (Everett *et al.*, 2011). Sin embargo, el empleo excesivo de plaguicidas sintéticos está ocasionando daños en la salud humana, el medio ambiente, la biodiversidad y la seguridad alimentaria, lo que ha provocado un rechazo generalizado hacia el control químico de plagas en la producción agrícola (Kniss y Coburn, 2015; Sarwar, 2015; Ibrahim, 2016). Esta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades de plantas, que sean ecológicas y económicamente viables (Rios *et al.*, 2016), y con ello, reducir el impacto negativo de los agroquímicos al medio ambiente (Companiononi *et al.*, 2019).

El control biológico de enfermedades de plantas, incluyendo patógenos fúngicos, ha sido considerado como un método alternativo viable para el control químico (Heydari y Pessarakli, 2010). En este sentido, varias especies del género *Trichoderma* son utilizadas como agentes de control biológico, debido a su adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Druzhinina *et al.*, 2011), así como a su habilidad antagónica, conocida como hiperparasitismo necrotrófico o micoparasitismo contra fitopatógenos (Kubicek *et al.*, 2011). Además de los efectos beneficiosos que ocurren en las interacciones con agentes patógenos, especies de *Trichoderma* spp. presentan un efecto positivo en plantas mejorando sus propiedades como la biomasa, rendimiento y calidad, en la mayor parte de cultivos agrícolas en donde se utilizan (Mesa-Vanegas *et al.*, 2019). Por otro lado, las especies del género *Trichoderma* muestran un alto nivel de diversidad genética y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de productos de interés comercial y ecológico (Lorito *et al.*, 2010).

Por todo lo anterior, el objetivo de esta investigación fue caracterizar e identificar cepas de *Trichoderma* aisladas directamente del cultivo de aguacate en huertos comerciales en la localidad de Tanaxuri, Michoacán, así como determinar su efectividad en el control biológico de hongos causantes de pudriciones postcosecha de aguacate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y fitopatógenos

Se usaron frutos de aguacate Hass cosechados en estado de madurez fisiológica (21.5 % de materia seca, de acuerdo con los límites establecidos de la Norma Mexicana NMX-FF-016-SCFI-2006) en el año 2018 obtenidos del huerto orgánico Negrete, ubicado en la localidad de Tanaxuri, Mi-

choacán (Latitud 19° 25' 2" Norte, Longitud 102° 3' 0" Oeste). Los fitopatógenos utilizados en la presente investigación (*Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *Phomopsis perseae*), fueron obtenidos del cepario del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo campus Uruapan Michoacán; aislados a partir de frutos de aguacate postcosecha colectados en huertos aguacateros en Uruapan Michoacán.

### Aislamiento de cepas de *Trichoderma*

El aislamiento de cepas se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Ceja-Torres *et al.* (2000). Se colectaron muestras de 150 g de suelo y raíz (tomando de los primeros 15 cm de profundidad). De las raíces se realizaron cortes de 1 cm<sup>2</sup> y, se desinfectaron con un lavado con hipoclorito de sodio al 2 % por 3 min, posteriormente los cortes se lavaron dos veces con agua destilada estéril agitando hasta lograr una mezcla homogénea y se colocaron en cajas petri con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés, BD Bioxon) suplementado con 0.025 mg/mL de cloranfenicol (Sigma) y se incubaron a 28 °C durante 2 a 4 días. Los crecimientos obtenidos se transfirieron en nuevas cajas Petri con medio PDA, utilizando un asa de platino, posteriormente, se realizó el aislamiento de colonias individuales a través de cultivos monospóricos. Para los aislamientos a partir de muestras de suelo, se pesaron 10 g y se suspendieron en 90 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se efectuaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 1 x 10<sup>3</sup> conidios por mL. Se tomaron 20 µL de la dilución y se sembraron en cajas de Petri con medio PDA con 0.025 mg/mL de cloranfenicol. Para asegurar la autenticidad y pureza de las cepas obtenidas, se realizaron cultivos monoconidiales como indica Samuels *et al.* (2006).

### Caracterización e identificación de las cepas aisladas de *Trichoderma*

A) Caracterización morfológica. Tradicionalmente se examinaron i) características macroscópicas de la colonia (crecimiento radial, color del micelio, presencia de pigmentos difusibles, anillos concéntricos), y ii) características microscópicas (forma y tamaño de conidióforos, fialides, conidios y clamidosporas), basadas en Samuels *et al.* (2002 y 2012).

B) Identificación molecular. La identificación molecular se basó en la amplificación por PCR de fragmentos de la región del ADN (regiones ITS) y del factor de elongación 1-alfa (*Tef 1-α*). La extracción del ADN genómico se realizó empleando el protocolo descrito por Cenís (1992). Para la amplificación por PCR se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Chakraborty *et al.* (2010) para la región del ADNr [ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')], y los reportados por Komon-Zelazowska *et al.* (2007) para el gen *Tef 1-α* [*tef 728f* (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y *tef 1R* (5'-GCCATCCTGGGAGATACCAGC-3')]. En cada reacción de PCR se utilizaron 20 ng de ADN, buffer 1 X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs,

0.6 µM de cada iniciador, 0.2 U de Taq polimerasa (Platinum® Taq DNA polymerase, Invitrogen), para un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación para ambos fragmentos incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos de ADN amplificados se recuperaron por electroforesis en gel agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio y visualizado en transiluminador (marca: Labnet; modelo: TM-26) posteriormente los fragmentos se purificaron utilizando el kit "PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification" (Invitrogen). Se obtuvo la secuencia en ambas direcciones de los fragmentos purificados (Laboratorio LANGE BIO – CINVESTAV Irapuato, Gto.) y las secuencias se compararon, con las secuencias nucleotídicas de hongos de la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI) empleando la herramienta BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de *Trichoderma*

Para conocer la capacidad de inhibición las cepas de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos empleados, se realizaron pruebas de confrontación, usando el protocolo descrito por Ibarra-Medina *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. Se activaron las cepas monoconidiales a 28 °C durante 96 h en medio PDA. Para la confrontación, se colocaron discos de micelio de (5 mm de diámetro) de *Trichoderma* creciendo en PDA en un extremo de una caja de Petri y del hongo fitopatógeno en el extremo opuesto. Posteriormente, se incubaron a 28 °C durante 7 días. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron lecturas cada 12 h para determinar el número de horas al primer contacto entre las hifas del antagonista y el fitopatógeno, así como el comportamiento en general. Se midió el crecimiento de ambas colonias (cm) y se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial (ICR), basándose en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ICR} = \frac{\text{CREC. DE LA CEPA ANTAGONISTA (CM)}}{6.5} * 100$$

Donde: CREC= crecimiento radial de la cepa antagonista (cm), 6.5 = distancia en cm entre los puntos de siembra de las cepas de *Trichoderma* y el fitopatógeno.

### Evaluación *in vivo* de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* (TSONM6)

Con el fin de realizar estudios de inhibición en el fruto de aguacate, se obtuvieron los conidios de la cepa que presentó mayor capacidad *in vitro* e identificada molecularmente *T. harzianum* y se procedió de acuerdo a la metodología propuesta por Ibarra-Medina *et al.* (2010). Se cultivó *T. harzianum* en medio PDA a 28 °C por siete días y se verificó la producción de conidios. Posteriormente, a la placa de Petri se le añadieron 10 mL de tween 80 estéril a una concentración al 0.1 % y se estrió con una espátula de Drigalsky para la recupe-

ración de los conidios. Seguido de esto, se filtró la suspensión de conidios, recuperándose en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, a través de una fibra de poliéster para eliminar restos de micelio. Los conidios se contabilizaron en cámara Neubauer y se mantuvieron en tween 80 a una concentración de 0.01 % a 4 °C hasta su uso. Los hongos fitopatógenos se cultivaron en PDA, a 25 °C por 7 días.

Posteriormente, para realizar el ensayo *in vivo* (frutos) se siguió el protocolo descrito por Janisewicz *et al.* (1988), con algunas modificaciones. En condiciones controladas y en frutos uniformes en cuanto a tamaño y madurez fisiológica, se llevó a cabo la inoculación de una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por mL de *T. harzianum* en el área peduncular del fruto de aguacate con madurez fisiológica, previamente desinfectado (por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron por escurrimiento). Se realizó la inoculación de cada uno de los fitopatógenos colocando un disco de PDA de 5 mm con crecimiento activo en la misma zona en donde se inocularon los conidios de *Trichoderma*. Posteriormente, se incubaron por 7 días a  $18 \pm 2$  °C a 95 % de humedad relativa. El experimento se dividió en cuatro grupos por triplicado. Tratamiento 1: Testigo (conidios de *T. harzianum*); Tratamiento 2: Testigo del fitopatógeno (disco de PDA con micelio de fitopatógeno); Tratamiento 3: Confrontación (conidios de *T. harzianum* más disco de PDA con micelio de fitopatógeno) y Tratamiento 4: Agua destilada estéril.

Al concluir el periodo de incubación se evaluó el efecto de los inóculos en las áreas pedunculares a través de la comparación de cortes longitudinales en los frutos y se determinó el porcentaje de daños basados en escalas de pudriciones de pedúnculo y cuerpo del fruto (Figura 1; Ochoa, 2014). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

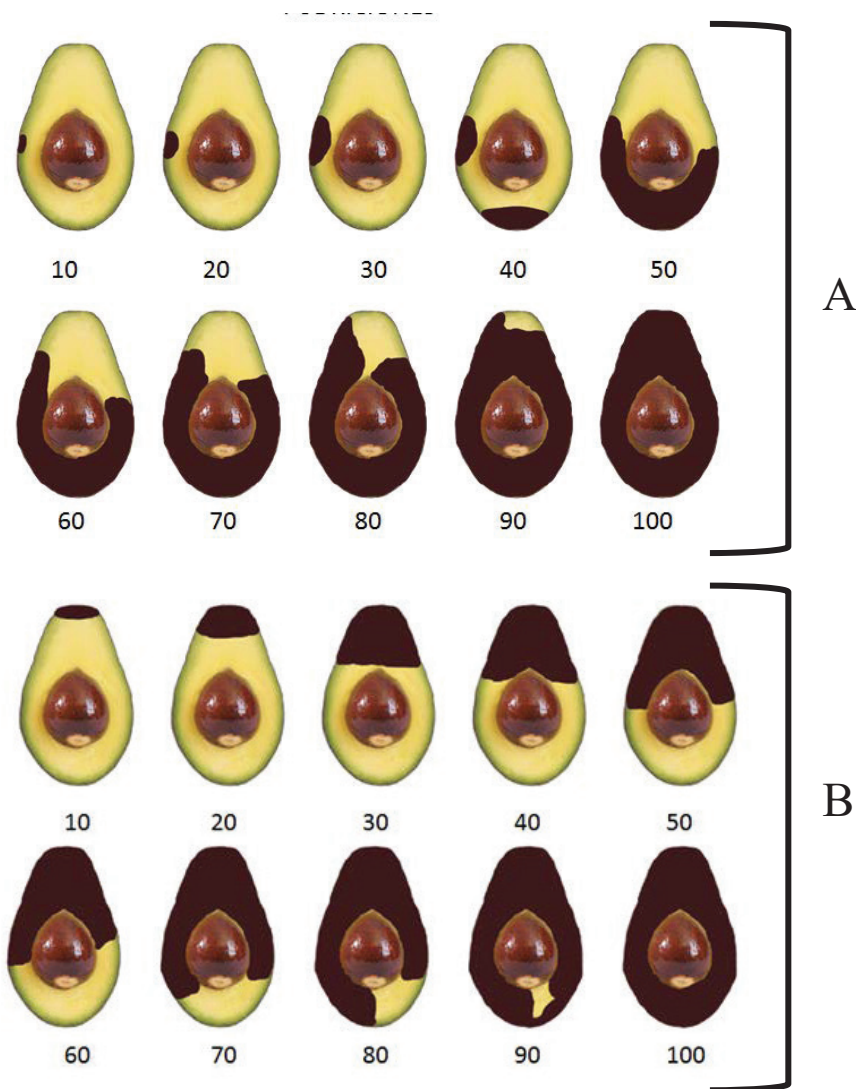
### Análisis estadístico.

Se llevó a cabo un diseño factorial. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA), seguidos de la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) con un nivel de confianza del 95 %, usando el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación de las cepas de *Trichoderma*

Se obtuvieron seis aislamientos de cepas nativas de suelo y raíz, de acuerdo con las características morfológicas (micro y macroscópicas) se identificaron como de *Trichoderma* sp. (Tabla 1). Se analizaron los conidios, fálides, hifas y conidióforos presentes en el soma vegetativo. De acuerdo con la velocidad de crecimiento observada en cada aislado, se seleccionó la cepa TSONM6, para ser identificada molecularmente y utilizada en el ensayo *in vivo*. Al efectuar el análisis de la secuencia, se identificó como *Trichoderma harzianum*, mostrando un amplicón de 600 pb para ambos fragmentos,



**Figura 1.** Escala de porcentaje de pudrición del cuerpo del fruto (A) y del pedúnculo (B) del fruto de aguacate. Imagen adaptada del compilado de la guía realizada por Ochoa (2014).  
**Figure 1.** Rottage percentage scale of fruit body (A) and peduncle (B) of avocado fruit. Image adapted from the compilation of the guide made by Ochoa (2014).

evidenciando una identidad del 99.59 y 96.43 % con ambos marcadores (ITS y gen *Tef 1-a*, respectivamente) (Tabla 2).

#### Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma*

Los aislados de *Trichoderma* TSONM1, TRONM2, TSONM3, TSONM4, TSONM5 y *T. harzianum* presentaron diferentes niveles de actividad antagonista contra los fitopatógenos ensayados (*N. parvum*, *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*). La confrontación, permitió evidenciar a la cepa de *T. harzianum* con mayor capacidad antagonista frente a *N. Parvum* con 88.8 % de inhibición, misma que fue estadísticamente significativa al igual que la cepa TSONM3 Y TSONM5. Por otro lado, el resto de las cepas se mantuvieron en el rango del 73.8 al 77.2 % (Tabla 3), no observándose diferencias significativas entre ellas.

En la confrontación de las cepas aisladas contra *C. gloeosporioides* (Tabla 3), se determinó que las cepas de mayor actividad antagonista fueron TSONM1, TRONM2 y TSONM3 con 75.0 % de inhibición, no mostrando diferencias significativas entre ellas al igual que las cepas TSONM5 y *T. harzianum* que formaron el mismo grupo pero que presentaron un 72.7 y 73.8 % de inhibición, respectivamente. En tanto a las cepas que dieron mayor inhibición en la confrontación de *Diaporthe* sp. (Tabla 3) fue *T. harzianum* con un 82.2 %, y de acuerdo al análisis estadístico fueron estadísticamente similares a las cepas TSONM1, TSONM3 y la TSONM5 al no mostrar diferencias significativas. Por último, en la confrontación con *P. perseae* (Tabla 3), las cepas TSONM1, TSONM3, TSONM4, TSONM5 y *T. harzianum* fueron estadísticamente iguales en cuanto a su actividad de inhibición, presentando porcentajes de inhibición entre 80.0 – 84.4 %. Se encontró

**Tabla 1.** Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* de Tanaxuri, Michoacán.**Table 1.** Isolation and identification of native *Trichoderma* strains from Tanaxuri, Michoacán.

Código	Material	Cepa identificada	Características microscópicas	Características macroscópicas
TSONM1	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.	Forma y color de la hifa fúngica típica, fiálide (largas, delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas), forma y color de los conidióforos (diversas ramificaciones con aspecto piramidal), forma y color de los conidios (citriformes y subglobosos) y clamidosporas de forma individual.	Velocidad de crecimiento rápido, color del micelio que es eventualmente blanco y se torna verde intenso y abundante, con la formación de masas conidiales en anillos concéntricos.
TRONM2	Raíz	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM3	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM4	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM5	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM6	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i> *		

\*Caracterizado molecularmente.

**Tabla 2.** Identificación molecular de la cepa de *Trichoderma harzianum*.**Table 2.** Molecular identification of the *Trichoderma harzianum* strain.

Código	Cepa identificada	Región ITS		Gen <i>Tef 1-a</i>	
		% Identidad	Número de accesión (GenBank)	% Identidad	Número de accesión (GenBank)
TSONM6	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.59	ON407085	96.43	ON423614

Accesado el 6 de junio de 2022.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* contra los fitopatógenos.**Table 3.** *Trichoderma* strains *in vitro* inhibition percentage against phytopathogens.

Cepa aislada	Porcentaje de inhibición			
	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Phomopsis perseae</i>
TSONM1	76.6 ± 1.6 <sup>b</sup>	75.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	77.2 ± 2.5 <sup>ab</sup>	80.0 ± 2.9 <sup>ab</sup>
TRONM2	73.8 ± 3.4 <sup>b</sup>	75.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	75.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	77.7 ± 2.5 <sup>b</sup>
TSONM3	78.8 ± 4.2 <sup>ab</sup>	75.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	78.3 ± 1.7 <sup>ab</sup>	84.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
TSONM4	75.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	71.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	76.1 ± 3.8 <sup>b</sup>	81.1 ± 2.5 <sup>ab</sup>
TSONM5	77.2 ± 8.6 <sup>ab</sup>	72.7 ± 1.9 <sup>ab</sup>	80.0 ± 4.4 <sup>ab</sup>	83.3 ± 5.0 <sup>ab</sup>
TSONM6 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	88.8 ± 5.4 <sup>a</sup>	73.8 ± 1.9 <sup>ab</sup>	82.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	82.2 ± 5.4 <sup>ab</sup>

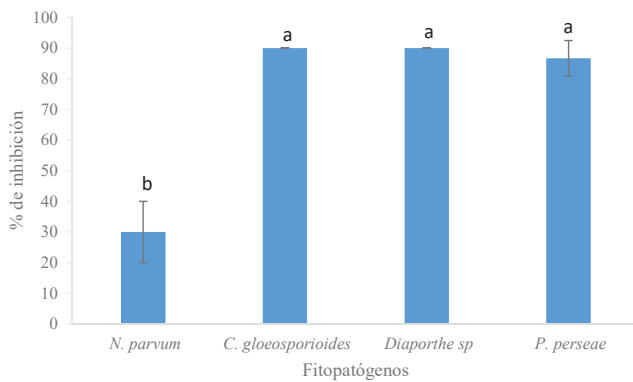
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

que todas las cepas nativas de *Trichoderma* fueron efectivas al controlar a los cuatro hongos fitopatógenos. Sin embargo, es importante destacar que la cepa de *T. harzianum* mostró actividades de inhibición superiores al 80 % contra *N. parvum*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*, aunado a esto, al ser la cepa que se caracterizó molecularmente, se seleccionó para continuar con los estudios *in vivo* en el fruto de aguacate.

#### Evaluación *in vivo* de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* (TSONM6)

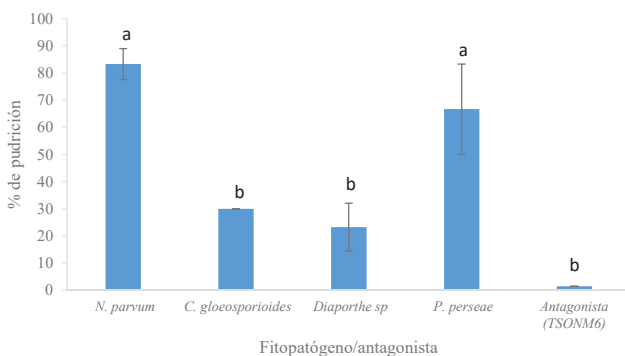
De acuerdo a la escala de porcentaje de pudrición del cuerpo del fruto y del pedúnculo del fruto de aguacate (Figura 1). Los hongos fitopatógenos mejor inhibidos por la cepa antagónica de *T. harzianum* a siete días de incubación

fueron *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae* con aproximadamente 90 % de inhibición, no habiendo diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ) (Figura 2). La cepa de *T. harzianum* mostró menor eficiencia para inhibir a *N. parvum* cuyo porcentaje de inhibición fue de 30 %. Por otro lado, al comprobar el comportamiento de la cepa de *T. harzianum* y los fitopatógenos en frutos de aguacate, se demostró que *N. parvum* y *P. perseae* presentaron mayor agresividad en la forma de colonizar la pulpa en los frutos con pudrición de 83.3 y 66.7 %, respectivamente (Figura 3), y en menor medida *C. gloeosporioides* y *Diaporthe* sp. mostraron entre un 30 y 23.3 % de pudrición, respectivamente (Figura 3). Por el contrario, en los frutos testigos en el cual se inoculó la cepa de *T. harzianum*, no se desarrollaron síntomas de pudrición.



**Figura 2.** Inhibición *in vivo* de la cepa nativa *Trichoderma harzanium* (TSONM6) contra los diferentes fitopatógenos. Letras diferentes entre los distintos patógenos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** *In vivo* inhibition of the native strain *Trichoderma harzanium* (TSONM6) against the different phytopathogens. Different letters between the different pathogens indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Porcentaje de pudrición en frutos de aguacate inoculados con fitopatógenos y la cepa antagonista TSONM6 (*Trichoderma harzanium*). Letras diferentes entre los distintos patógenos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** Rottage percentage in avocado fruits inoculated with phytopathogens and the antagonistic strain TSONM6 (*Trichoderma harzanium*). Different letters between the different pathogens indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

### Aislamientos de *Trichoderma*

El aislamiento del género *Trichoderma* obtenido de los sitios de interés para este estudio, prevaleció en suelo como material de procedencia. Al igual que en el estudio de Zafari *et al.* (2013), se aislaron cepas de *Trichoderma* lo cual sugiere que hay un amplio dominio de este género sin importar el cultivo ni las condiciones bióticas y abióticas. *Trichoderma* es fácilmente aislado del suelo por métodos convencionales, en gran parte debido a su rápido crecimiento, abundante conidiación, formación de clamidosporas y colonización de sustratos orgánicos, lo que facilita un rápido desarrollo en varios sustratos (Gupta *et al.*, 2014). Sin embargo, el aislamiento de *Trichoderma*, puede deberse a varios factores limitantes, por lo que se puede atribuir a la época de invierno en que se efectuaron los muestreos, los cuales se caracterizan por temperaturas bajas y humedades relativas altas. Sin embargo, *Trichoderma* puede ser afectado por la interacción con diversos factores bióticos y abióticos (actividad de agua,

temperatura, oxigenación y pH), mismos que comprometen su desempeño como biocontrolador (Santamarina *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013). Aunado a lo anterior, la cantidad de materia orgánica, así como las condiciones climáticas, edáficas y geográficas que se tienen en la región de Michoacán, pueden afectar el desarrollo y desempeño de *Trichoderma*. Wang *et al.* (2016), mencionan que la ocurrencia de la especie de *Trichoderma* es modulada por varios factores incluyendo microclima, la disponibilidad de sustratos, así como también interacciones de complejos ecológicos.

### Identificación de las cepas aisladas de *Trichoderma*

Aunque los microorganismos pueden ser identificados basados en sus caracteres morfológicos, las técnicas moleculares son hoy en día, más ampliamente utilizadas, y en general, son herramientas más aceptadas para la identificación ya que ofrecen información rápida y confiable para el estudio de identidad (Gajera y Vakharia, 2010). Las secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y regiones como el factor de elongación 1- $\alpha$  (*Tef 1-a*) son las más utilizadas en la identificación, las cuales actúan como huellas dactilares en la identificación de los hongos (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010).

La amplificación del segmento de interés fue similar a lo obtenido por Alvarado-Marchena y Rivera-Méndez (2016), quien aisló e identificó molecularmente cepas *Trichoderma* en áreas de producción de ajo y cebolla. Por la alta similitud obtenida en el alineamiento múltiple de las secuencias, se comprueba que los marcadores ITS y *Tef 1-a* son técnicas confiables para la identificación de *Trichoderma* spp. (Rios *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). El uso de la base de datos (GenBank NCBI) demostró que, a través de la región amplificada de ADN de las cepas estudiadas, fue factible determinar la identidad que oscilaron entre 99.59 y 96.43 % con las especies identificadas como *Trichoderma harzianum* en la base de datos. Esta especie es usada ampliamente para el control biológico de patógenos de plantas (Steindorff *et al.*, 2014; Troian *et al.*, 2014).

### Capacidad antagonista *in vitro* de las cepas de *Trichoderma*

El aislamiento de hongos por sí solo no es una garantía de que estos aislados sean buenos antagonistas, por lo que es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar su capacidad antagónica frente al fitopatógeno de interés (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Además, evaluar su efectividad biológica en plantas bajo diferentes condiciones. Lo anterior, permitirá validarlos al momento de aplicarlos en ensayos en condiciones de campo (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). El crecimiento del antagonista de *T. harzianum* reflejó la habilidad de adaptarse a condiciones de crecimiento *in vitro* y de colonizar rápidamente un espacio determinado, resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Singh *et al.* (2014) con cepas de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum falcatum* Went. Lo que favoreció la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos, situación que se demostró en las primeras horas del enfrentamiento.

Krauss *et al.* (2010) mencionan que los bioensayos realizados con *Trichoderma* han sido efectivos y que, por su naturaleza, el control biológico no elimina, sino que reduce las poblaciones del patógeno y, como consecuencia, reduce la incidencia de la enfermedad. No obstante, a pesar de las potencialidades de estos antagonistas autóctonos, profundizar en el conocimiento de los mecanismos específicos a través de los cuales ejercen su acción, ayudará a mejorar su efectividad cuando sean aplicados como inoculantes microbianos (Villamil *et al.*, 2015). Las propiedades antagónicas de *Trichoderma* hacia hongos patógenos se basan en la activación de múltiples mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo, la antibiosis, la promoción del crecimiento vegetal, e inducción de respuestas de defensa vegetal (Albes-de-Aguiar *et al.*, 2014; Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015). La aplicación de *Trichoderma* es basada en el entendimiento de estos mecanismos de acción contra un largo set de bacterias y hongos, en ciertos casos infecciones virales (Keswani *et al.*, 2014), lo que le permite ser un buen candidato para el control biológico debido a los diferentes modos de acción que tienen para inhibir el crecimiento de otros hongos.

Se ha reportado que *Trichoderma* excreta una variedad de metabolitos secundarios con la finalidad de inducir la comunicación molecular mediante la inducción de las señalizaciones químicas, contribuyendo al establecimiento de interacciones con otros microorganismos en diversas vías para el control de los patógenos (Keswani *et al.*, 2014). Algunos de los metabolitos secundarios de importancia agrícola sintetizados por especies de *Trichoderma* se relacionan con compuestos volátiles y no volátiles con actividad antimicrobiana y defensa vegetal, destacando diterpenos tetracíclicos (harziandiona), sesquiterpenos (tricotecenos y tricodermina), y el triterpeno viridin (Zeilinger *et al.*, 2016), que confieren sus propiedades como agente de biocontrol hacia organismos fitopatógenos (Asad *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

#### Capacidad antagónica *in vivo* de *Trichoderma harzianum* (TSONM6)

La cualidad natural que ejercen los antagonistas sobre los diversos fitopatógenos en la actualidad a ganado utilidad, no obstante, para aplicarlos de forma exitosa es primordial discernir los diversos mecanismos de acción que presentan las cepas. Uno de los principales mecanismos es que, *Trichoderma* parasita las células del patógeno y degrada su pared celular, la retracción de la membrana plasmática y desorganización de citoplasma (Romero-Cortes *et al.*, 2015), por la acción hidrolítica de enzimas como quitinasas y glucanasas; otro mecanismo reportado para este hongo es la antibiosis. Cabe mencionar que los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* dependen del tipo de cepa y se han clasificado en tres categorías: 1) antibióticos volátiles como 6-pentil- $\alpha$ -pirona y aquellos derivados del isocianuro; 2) compuestos solubles en agua (ácido heptenoico) y 3) oligopéptidos ricos en ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Khan *et al.*, 2020; Thapa *et al.*, 2020).

El daño ocasionado por los patógenos fúngicos en frutos postcosecha fue observado a diferentes grados, lo que se relaciona con una dependencia de factores extrínsecos tales como tiempo de exposición, temperatura y humedad. Aunado a estos factores se encuentra el ciclo vital propio de cada patógeno. No siempre se ha observado consistencia al extrapolar los resultados del laboratorio a condiciones *in situ*. Se han obtenido respuestas contradictorias cuando se trata de relacionar el daño celular en el fruto con el compuesto producido por el antagonista (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

Domínguez-Guerrero *et al.* (2012), encontraron que las diferentes especies de *Colletotrichum* spp. tienen gran variabilidad genética y molecular, causando que el grado de daño sea variable entre ellas. Por esta misma razón, Trinidad-Angel *et al.* (2017) observaron que los primeros signos de la antracnosis en la evaluación *in vivo* comenzaron a aparecer entre el tercer y cuarto día de incubación y el daño fue en aumento al comenzar la maduración del fruto. Lo que puede deberse a que se trata de una enfermedad latente; es decir, la infección se presenta en estados tempranos del desarrollo del fruto e incluso desde la floración, y se mantiene latente hasta que el fruto alcanza las condiciones óptimas como son la máxima producción de etileno, misma que desencadena eventos enzimáticos que estimulan el desarrollo del hongo, así como la disminución de la concentración de algunos compuestos que inhiben el desarrollo del mismo (Alarcón-Restrepo y Chavarriaga-Montoya, 2007).

Por otro lado, en este estudio se visualizó una mayor susceptibilidad a la infección por *N. parvum*. Ochoa (2014) menciona que, durante la maduración, los niveles de compuestos antifúngicos en el fruto declinan, lo que permite que se active el crecimiento del hongo. Las células más externas de la cutícula y de la pulpa son colonizadas, llevando el desarrollo de los síntomas. Considerando que la inoculación de fitopatógeno sobre los frutos tuvo una concentración de  $1 \times 10^6$  de esporas por mL, sería importante considerar lo mencionado por Gupta *et al.* (2014), donde describe que, en su mayoría, los productos comerciales del mercado se formulan con una concentración de antagonista entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  UFC esporas viables/gramo de producto formulado. Por lo que *T. harzianum* (TSONM6) podría ser una buena alternativa para el control biológico del aguacate en postcosecha.

#### CONCLUSIONES

Se logró aislar e identificar a nivel género seis cepas de *Trichoderma* de raíz y suelo de cultivos de aguacate, con la capacidad de inhibir *in vitro* a los patógenos *N. parvum*, *P. perseae*, *C. gloeosporioides* y *Diaporthe* sp. La cepa TSONM6, identificada molecularmente como *Trichoderma harzianum*, mostró la mayor capacidad antagónica principalmente contra los patógenos del aguacate *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*. Por lo tanto, esta cepa puede utilizarse en frutos de aguacate postcosecha para el control de la antracnosis y así aumentar la calidad y cantidad de este cultivo, impactando significativamente en la economía. Sin embargo, aún

falta discernir los mecanismos de acción precisos implicados en la actividad de esta cepa en el control biológico, lo que permitirá seleccionar cepas nuevas, eficaces y que a la vez facultará un uso adecuado en el cultivo de aguacate.

## REFERENCIAS

- Alarcón-Restrepo, J.J. y Chavarriaga-Montoya, W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agronomía*. 15: 89-102.
- Alvarado-Marchena, L. y Rivera-Méndez, W. 2016. Molecular identification of *Trichoderma* spp. in garlic and onion fields and *in vitro* antagonism trials on *Sclerotium cepivorum*. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 40(2016): 1-9. doi:10.1590/18069657rbcs20150454.
- Arpaia, M.L., Collin, S., Sievert, J. y Obenland, D. 2018. 'Hass' avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 140: 76-84. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.02.015.
- Asad, S.A., Tabassum, A., Hameed, A., Afzal, A., Khan, S.A. y Ahmed, R. 2015. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(4): 1053-1064. doi: 10.1590/S1517-838246420140787.
- Bowen, J., Billing, D., Connolly, P., Smith, W., Cooney J. y Burdon J. 2018. Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 146: 43-50. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.08.005.
- Ceja-Torres, L.F., Téllez-Ortiz, D., Osada-Kawasoe, S. y Morales-García, J.L. 2000. Etiología, distribución e incidencia del chancro del aguacate *Persea americana* Mill en cuatro municipios del Estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2): 79-86.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20(9): 2380. doi: 10.1093/nar/20.9.2380.
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Saha, A., Dey, P.L. y Sunar, K. 2010. Molecular characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from soils of North Bengal based on rDNA markers and analysis of their PCR-RAPD Profiles. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 5(1): 55-61.
- Chen, J.L., Sun, S.Z., Miao, C.P., Wu, K., Chen, Y.W., Xu, L.H., Guan, H.L. y Zhao, L.X. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*. 40(4): 315-324. doi: 10.1016/j.jgr.2015.09.006.
- Companioni, G.B., Domínguez, A.G. y García, V.R. 2019. *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biología Vegetal*. 19(4): 237-248.
- Albes-de-Aguiar, R., Gomes-da-Cunha, M. y Lobo-Junior, M. 2014. Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control*. 74: 1-5. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.03.009.
- Domínguez-Guerrero, I.P., Mohali-Castillo, S.R., Marín-Montoya, M.A. y Pino-Menesini, H.B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de pal aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*. 37(2): 108-122. doi: 10.1590/S1982-56762012000200003.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. y Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*. 9(10): 749-759. doi: 10.1038/nrmicro2637.
- Everett, K.R., Pak, H.A., Pushparajah, I.P.S., Taylor, J.T., Astill, M.S., King, D.B. y Chee, A.A. 2011. Field evaluation of fungicides to control postharvest rots of avocados in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*. 64: 112-118. doi: 10.30843/nzpp.2011.64.5971.
- Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E., Atkins, S.L. y Fraaije, B.A. 2010. The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 144(2): 301-309. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.013.
- Gajera, H.P. y Vakharia, D.N. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74(3-4): 274-282. doi: 10.1016/j.pmpp.2010.04.005.
- Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I. y Tuohy, M.G. 2014. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier Science. pp 1-650.
- Hartill, W.F.T. y Everett, K.R. 2002. Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots 'Hass' avocado (*Persea americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 30(4): 249-260. doi: 10.1080/01140671.2002.9514221.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Baustista-Baños, S., Velázquez-del-Valle, M.G. y Hernández-Rodríguez, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(1): 66-74.
- Hernández-Melchor, D.J., Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*. 35(1): 98-112.
- Heydari, A. y Pesarakli, M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273-290. doi: 10.3923/jbs.2010.273.290.
- Ibarra-Medina, V.A., Ferrera-Cerrato, R., Alarcon, A., Lara-Hernández, M.E. y Valdez-Carrasco, J.M. 2010. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotia sclerotium* y *Sclerotia minor*. *Revista Mexicana de Micología*. 31: 53-63.
- Ibrahim, Y.A. 2016. Health and environmental impacts of pesticides: A responsibility principle and two novel systems for hazard classification and external cost determination. *Journal of Toxicology and Health*. 3: 1-9. doi: 10.7243/2056-3779-3-1.
- Janisewicz, W.J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology*. 78(2): 194-198. doi: 10.1094/Phyto-78-194.



- Keswani, C., Mishra, S., Kumar-Sarma, B., Pratap-Singh, S. y Bahadur-Singh, H. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied Microbiology and Biotechnology. 98(2): 533-544. doi: 10.1007/s00253-013-5344-5.
- Khan, K.A.A., Najeeb, S., Hussain S., Xie, B. y Li, Y. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp against phytopathogenic fungi. Microorganisms 8(6): 817. doi: 10.3390/microorganisms8060817.
- Kniss, A.R. y Coburn, C.W. 2015. Quantitative evaluation of the environmental impact quotient (EIQ) for comparing herbicides. PLoS One. 10(6): 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0131200.
- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P. y Druzhinina, I.S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause worldwide green mold disease in oyster mushroom farms. Applied and Environmental Microbiology. 73(22): 7416-7426. doi: 10.1128/AEM.01059-07.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N.A., Hoopen, G.M. y Holmes, K. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). Biological Control. 54: 230-240. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.05.011.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., *et al.* 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome Biology. 12(4): 2-15. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F.M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L.A. y Aguado-Rodríguez, G.J. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7(5): 1189-1198. doi: 10.29312/remexca.v7i5.245.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. y Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. Annual Review of Phytopathology. 48: 395-417. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314.
- Martínez, B., Infante D. y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. 28(1): 1-11.
- Mesa-Vanegas, A.M., Marín, A. y Calle-Osorno, J. 2019. Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. Actualidades Biológicas. 41(111): 32-44. doi: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02.
- Norma Mexicana (NMX-FF-016-SCFI-2006). 2006. Productos alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca-Aguacate (*Persea americana* Mill.). Especificaciones. Diario Oficial de La Federación. Secretaría de Economía. SINEC-20161020174655704.
- Ochoa, A.S. 2014. Enfermedades y desordenes fisiológicos más comunes del fruto de aguacate en poscosecha. APEAM AC-UMSNH. Primera edición. pp 92.
- Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J.M., Berlanga-Reyes, D.I., Ruiz-Cisneros, M.F., Ornelas-Paz, J.J., Salas-Marina, M.A., Villalobos-Pérez, E. y Guerrero-Prieto, V.M. 2016. Identification and antagonistic activity in vitro of Bacillus spp. and Trichoderma spp. isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología. 34(1): 84-99. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1507-1.
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P.A., Ramírez-Lepe, M. y Cuervo-Parra J.A. 2015. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 32(1): 32-45.
- Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. y Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia. 94(1): 146-170. doi: 10.2307/3761854.
- Samuels, G.J., Ismaiel, A., De Souza, J. y Chaverri, P. 2012. *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. Mycological Progress. 11: 215-254. doi: 10.1007/s11557-011-0743-4.
- Samuels, G.J., Suarez, C., Solis, Z.K., Holmes, K.A., Thomas, S.E., Ismaiel, A., y Evans, H.C. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species from South America. Mycological Research. 110(Pt 4): 381-392. doi: 10.1016/j.mycres.2006.01.009.
- Santamarina, M.P. y Roselló J. 2006. Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. Crop Protection. 25(10): 1130-1134. doi: 10.1016/j.cropro.2006.02.006.
- Santos, J.M., Vrandečić, K., Čosić, J., Duvnjak, T. y Phillips, A.J.L. 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. Persoonia. 27: 9-19. doi: 10.3767/003158511X603719.
- Sarwar, M. 2015. The killer chemicals as controller of agriculture insect pests: The conventional insecticides. International Journal of Chemical and Biomolecular Science. 1: 141-147.
- SIAP. 2021. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Aguacate. Accesado el 21 de febrero de 2021. <https://www.gob.mx/siap/documentos/brochure-aguacate>
- Silva-Rojas, H.V. y Ávila-Quezada, G.D. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant Pathology. 60: 899-908. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x.
- Singh, R.K., Kumar, P., Tiwari, N.N., Singh, S.P., Tiwari, A.K., Vishwakarma, S.K., Singh, A. y Kumar, A. 2014. Role of endochitinase gene and efficacy of *Trichoderma* against *Colletotrichum falcatum* Went., causing red rot disease in sugarcane. Sugar Technology. 16: 180-188. doi: 10.1007/s12355-013-0254-5.
- Steindorff, A.S., Ramada, M.H.S., Coelho, A.S.G., Miller, R.N.G., Pappas, G.J., Ulhoa, C.J. y Ferreira-Noronha, E. 2014. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. BMC Genomics. 15: 204. doi: 10.1186/1471-2164-15-204.
- Thapa, S., Sotang, N., Kumari-Limbu, A., Joshi, A. 2020. Impact of *Trichoderma* sp. in agriculture: A minireview. Journal Biology Today's World. 9(7): 227. doi: 10.35248/2322-3308.20.09.225.
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F.J., Ulloa, J.A., Ramírez-Ramírez, J.C., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M. y Bautista-Rosales, P.U. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 19: 3953-3964. doi: 10.29312/remexca.v0i19.664.

- Troian, R.F., Steindorff, A.S., Ramada, M.H., Arruda, W. y Ulhoa, C.J. 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*. 36: 2095-2101. doi: 10.1007/s10529-014-1583-5.
- Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D.H., Adaskaveg, J.E. y Eskalen, A. 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*. 97(12): 1580-1584. 10.1094/PDIS-03-13-0230-RE.
- Vargas-Hoyos, H.A. y Gilchrist-Ramelli, E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*. 42: 9-16.
- Villamil-Carvajal, J.E., Viteri-Rosero, S.E. y Villegas-Orozco, W.L. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 68(1): 7441-7450. doi: 10.15446/rfnam.v68n1.47830.
- Wang G., Cao, X., Ma, X., Gou, M., Liu, C., Yan, L. y Bian, Y. 2016. Diversity and effect of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease on *Lentinula edodes* in China. *Microbiology Open*. 5(4): 709-718. doi: 10.1002/mbo3.364.
- Zafari, D., Karimi, S. y Mohammadi, R. 2013. Identification of *Trichoderma* spp. related to root and rhizosphere of walnut in hamedan province. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 26(3): 330 -340. doi: 20.1001.1.2383259 2.1392.26.3.10.5.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. y Mukherjee, P.K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2): 74-90. doi: 10.1016/j.fbr.2016.05.001.