

BIOCONTROL DE *Trichoderma* spp. HACIA PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)

BIOCONTROL OF *Trichoderma* spp. TO PATHOGENS OF SUGARCANE ROOT (*Saccharum officinarum*)

Lidia Concepción Gamboa-Villa¹, Edgar Martínez-Fernández², Patricia Martínez-Jaimes², Ramón Suárez-Rodríguez³, José Augusto Ramírez-Trujillo³

¹Maestría en Manejo de Recursos Naturales. ²Centro de Investigaciones Biológicas. (edgar@uaem.mx) ³Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa. 62209. Cuernavaca, Morelos.

RESUMEN

La marchitez de la caña de azúcar la produce un complejo de especies de *Fusarium*, como *F. andiyazi* y *F. sacchari* que inducen la pudrición de las raíces. Para controlar esta enfermedad y disminuir el uso de fungicidas se ha propuesto el control biológico por medio de antagonistas del género *Trichoderma*. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* y en plantas de caña de azúcar la capacidad antagonista de cepas de *Trichoderma* hacia *F. andiyazi* y *F. sacchari*. La hipótesis fue que al menos una cepa de *Trichoderma* inhibe el crecimiento *in vitro* de *Fusarium* y favorece el desarrollo de las plantas de caña. Dieciocho cepas de *Trichoderma* se aislaron y se determinó su porcentaje de inhibición sobre el crecimiento micelial de especies de *Fusarium* con la técnica de cultivo dual en medio de cultivo papa dextrosa agar. El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. El grado de antagonismo de *Trichoderma* se evaluó a los 13 d. Las cepas T2 y T8 que mostraron las características mejores de antagonismo se eligieron para el bioensayo *in vivo*. Para la evaluación *in vivo* el sustrato estéril se inoculó con *F. andiyazi* y *F. sacchari* y las raíces de plantas de caña con las cepas T2 y T8 de *Trichoderma* en un diseño de bloques al azar, con tres bloques y tres repeticiones para cada tratamiento. Las variables evaluadas fueron altura de la planta (cm), biomasa húmeda y seca de la raíz (g), número y diámetro de tallos (mm) y longitud de la raíz (cm). Las cepas T2 y T8 se determinaron, con identificación morfológica y molecular, como *T. asperellum* y *T. koningiopsis*. El efecto de estas cepas en las plantas de caña fue benéfico; ya que incrementaron altura de planta, y longitud, biomasa húmeda y seca de raíces.

ABSTRACT

Wilting of sugarcane is produced by a complex of *Fusarium* species, such as *F. andiyazi* and *F. sacchari*, which induce rotting of roots. In order to control this disease and reduce the use of fungicides, biological control has been proposed by means of antagonists of the genus *Trichoderma*. The objective of this study was to evaluate *in vitro* and in sugar cane plants the antagonistic capacity of strains of *Trichoderma* against *F. andiyazi* and *F. sacchari*. The hypothesis was that at least one strain of *Trichoderma* inhibits the growth *in vitro* of *Fusarium* and favors the development of the sugarcane plants. Eighteen strains of *Trichoderma* were isolated and their percentage of inhibition was determined on the mycelial growth of *Fusarium* species with the technique of dual culture in potato dextrose agar culture medium. The experimental design was completely randomized, with four replicates per treatment. The degree of antagonism of *Trichoderma* was evaluated at 13 d. The strains T2 and T8 which showed the best characteristics of antagonism were selected for the *in vivo* bioassay. For the evaluation *in vivo*, the sterile substrate was inoculated with *F. andiyazi* and *F. sacchari*, and the roots of sugarcane plants with strains T2 and T8 of *Trichoderma* in a design of randomized blocks, with three blocks and three replicates for each treatment. The variables evaluated were plant height (cm), fresh and dry root biomass (g), number and diameter of stems (mm) and root length (cm). The strains T2 and T8 were determined with morphological and molecular identification as *T. asperellum* and *T. koningiopsis*. The effect of these species on the sugarcane plants was beneficial, given that they increased plant height, along with length, wet and dry biomass of roots.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2019. Aprobado: febrero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 955-966. 2020.

Keywords: *Saccharum officinarum*, biological control, *Fusarium*, antagonism, *Trichoderma asperellum*, *T. koningiopsis*

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, control biológico, *Fusarium*, antagonismo, *Trichoderma asperellum*, *T. koningiopsis*.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los cultivos agroindustriales importantes en regiones tropicales y México ocupa el sexto lugar de producción mundial. La superficie de siembra durante la zafra 2017-2018 fue 785 088 ha con una producción de azúcar de 6 318 424 Mg (CONADESUCA 2018). Las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos afectan el crecimiento vegetal y rendimiento del cultivo (Snyman *et al.*, 2011). Dentro del grupo de los hongos, géneros como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* se han aislado de suelos cultivados con caña de azúcar (El-Amin y Saadabi, 2007). Diversas especies del género *Fusarium* están asociadas a las enfermedades de marchitez en caña de azúcar. En la India se ha identificado a *Fusarium moniliforme* (Gawade *et al.*, 2012) y a *F. sacchari* como agentes causales de la marchitez (Viswanathan *et al.*, 2012).

La presencia de un complejo de especies de *Fusarium* se ha identificado en cultivos de caña del estado de Morelos, México, las cuales pueden provocar pérdidas en producción hasta de 50%. Rebollar *et al.* (2012) mencionaron para Morelos y Michoacán las especies *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. verticilloides*, *F. andiyazi*, *F. kyuyensi* y *F. brachigybbosum* asociadas a marchitez. Martínez-Fernández *et al.* (2014) registraron a *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sacchari*, *F. andiyazi*, *F. nygamai* y *F. solani* en raíces necróticas de caña de azúcar.

La aplicación de fungicidas como el tiofanato metílico, carbendazim, oxiclóruo de cobre y mancozeb, es el método más utilizado para el control de estos fitopatógenos (Vishwakarma *et al.*, 2013) por efectividad y rapidez debidas a toxicidad, característica que también afecta a los organismos benéficos y el ambiente. De modo que la búsqueda de alternativas para el control de fitopatógenos es necesaria. Dentro del control biológico, el uso de organismos antagónicos hacia diferentes fitopatógenos es un método común y destacan los hongos del género *Trichoderma* que poseen tres mecanismos de acción: competencia por espacio o nutrientes, antibiosis (producción de metabolitos secundarios) y micoparasitismo (Saba *et al.*, 2012). Además, pueden colonizar raíces,

INTRODUCTION

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) is one of the important agro-industrial crops in tropical regions, and Mexico occupies sixth place in world production. The sown surface during the 2017-2018 harvest was 785 088 ha with a sugar production of 6 318 424 Mg (CONADESUCA 2018). The diseases caused by fungi, bacteria, virus and nematodes affect the plant growth and yield of the crop (Snyman *et al.*, 2011). Within the group of fungi, genera such as *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Curvularia* and *Fusarium* have been isolated from soils cultivated with sugarcane (El-Amin and Saadabi, 2007). Diverse species of the genus *Fusarium* are associated with the wilting diseases in sugarcane. In India, *Fusarium moniliforme* (Gawade *et al.*, 2012) and *F. sacchari* have been identified as causal agents of wilting (Viswanathan *et al.*, 2012).

The presence of a complex of species of *Fusarium* has been identified in sugarcane crops in the state of Morelos, Mexico, which can cause losses in production by as much as 50%. Rebollar *et al.* (2012) mentioned for Morelos and Michoacán the species *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. verticilloides*, *F. andiyazi*, *F. kyuyensi* and *F. brachigybbosum* associated with wilting. Martínez-Fernández *et al.* (2014) registered *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sacchari*, *F. andiyazi*, *F. nygamai* and *F. solani* in necrotic roots of sugarcane.

The application of fungicides, such as thiophanate-methyl, carbendazim, copper oxychloride and mancozeb, is the method most widely used for the control of these phytopathogens (Vishwakarma *et al.*, 2013) because of their effectiveness and speed due to toxicity, a characteristic which also affects the beneficial organisms and the environment. Therefore, the search for alternatives for the control of phytopathogens is necessary. Within biological control, the use of antagonistic organisms to different phytopathogens is a common method, and the fungal genus *Trichoderma* is predominant. These fungi possess three action mechanisms: competition for space or nutrients, antibiosis (production of secondary metabolites) and mycoparasitism (Saba *et al.*, 2012). Furthermore, they can colonize roots, stimulate root growth, induce tolerance to stress, act as bio fertilizers, induce plant protection, stimulate germination, and bioremediation (Hermosa *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012).

estimulan el crecimiento del sistema radical, confieren tolerancia al estrés, actúan como biofertilizantes, inducen protección de las plantas, estimulan la germinación y biorremediación (Hermosa *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012).

El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* y en plantas de caña de azúcar la capacidad antagónica de *Trichoderma* hacia los patógenos *F. andiyazi* y *F. sacchari*. La hipótesis fue que al menos una cepa de *Trichoderma* inhibe el crecimiento de *Fusarium* en condiciones *in vitro* y favorece el desarrollo de las plantas de caña.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo

La recolección de las muestras de suelo de la rizósfera de la caña de azúcar se realizó en campos de los municipios de Ayala, Cuautla, Jojutla, Puente de Ixtla y Yauatepec en el estado de Morelos, México, según la metodología de El-Amin y Saadabi (2007).

Aislamiento de cepas de *Trichoderma*

Las 15 muestras de suelo recolectadas se procesaron por medio del método de dilución en placa (Khalili *et al.*, 2012). Los aislamientos se realizaron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon™) adicionado con ácido láctico. Las colonias seleccionadas fueron las que presentaron las características morfológicas de *Trichoderma*, como el tipo de crecimiento, forma y color de las colonias, de las cuales se obtuvieron cultivos monosporicos por medio de punta de hifa y se almacenaron en sílica gel (Rodríguez y Gato, 2010).

Fitopatógenos

Las especies *F. andiyazi* (cepa 51) y *F. sacchari* (cepa 9) se obtuvieron del almacén (cepario) de hongos fitopatógenos del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del estado de Morelos. Estas especies se aislaron antes de raíces necróticas de caña de azúcar del estado de Morelos y se comprobó su patogenicidad (Martínez-Fernández *et al.*, 2014).

Antagonismo *in vitro*

Los hongos evaluados se cultivaron de manera individual. Las especies patógenas crecieron en medio de cultivo PDA (Bioxon™) y las cepas de *Trichoderma* en medio extracto de malta

The objective of this study was to evaluate *in vitro* and in sugarcane plants the antagonistic capacity of *Trichoderma* against the pathogens *F. andiyazi* and *F. sacchari*. The hypothesis was that at least one strain of *Trichoderma* inhibits the growth of *Fusarium* under *in vitro* conditions and favors the development of sugarcane plants.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples

The collection of the soil samples of the rhizosphere of the sugarcane was carried out in fields of the municipalities of Ayala, Cuautla, Jojutla, Puente de Ixtla and Yauatepec in the state of Morelos, Mexico, according to the methodology of El-Amin and Saadabi (2007).

Isolation of strains of *Trichoderma*

The 15 soil samples collected were processed by the method of plate dilution (Khalili *et al.*, 2012). The isolations were made in potato dextrose agar culture medium (PDA) (Bioxon™) added with lactic acid. The colonies selected were those that presented the morphological characteristics of *Trichoderma*, such as type of growth, form and color of the colonies, from which monosporic colonies were obtained by means of a hyphae point, and were stored in silica gel (Rodríguez and Gato, 2010).

Phytopathogens

The species *F. andiyazi* (strain 51) and *F. sacchari* (strain 9) were obtained from the strain culture storage unit (ceparium) of phytopathogenic fungi of the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) (UAM, Biological Research Center, Mexico) under Universidad Autónoma de Morelos. These species were previously isolated from necrotic roots of sugarcane from the state of Morelos, and their pathogenicity was confirmed (Martínez-Fernández *et al.*, 2014).

Antagonism *in vitro*

The fungi evaluated were cultivated individually. The pathogenic species were grown in PDA culture medium (Bioxon™) and the strains of *Trichoderma* in malt extract agar (EMA) (Merck™) medium during 7 d. For the quantitative evaluation, the dual culture technique (Dolatadabi *et al.*, 2012) was used with some modifications. Discs of mycelia of 7 mm were sliced separately from each species of *Fusarium* and placed

agar (EMA) (Merck™) durante 7 d. Para la evaluación cuantitativa se utilizó la técnica de cultivo dual (Dolatadabi *et al.*, 2012) con algunas modificaciones, se cortaron discos de micelio de 7 mm de diámetro de cada especie de *Fusarium* por separado y se colocaron en un extremo de la caja Petri con medio de cultivo PDA. Transcurridas 48 h se colocaron discos de micelio de 7 mm de *Trichoderma* en el extremo opuesto de la caja Petri. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, cada repetición contenía una confrontación. Cada 24 h se tomó lectura del crecimiento de los micelios. El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de *Trichoderma* hacia las especies de *Fusarium* se calculó por medio de la fórmula:

$$\text{PIC} = \text{A-B/A} \times 100$$

donde A: crecimiento radial de *Fusarium* spp. como testigo; B: crecimiento radial de *Fusarium* spp. junto con *Trichoderma* spp.

La evaluación cualitativa se realizó a los 13 d y se evaluó el grado de antagonismo de acuerdo con la clasificación propuesta por Bell *et al.* (1982): grado 1, *Trichoderma* cubre completamente la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno; 2, *Trichoderma* ocupa al menos el 75% de la superficie del medio y limita el crecimiento del fitopatógeno; 3, *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno el 50% de la superficie del medio; 4, el fitopatógeno coloniza el 75% de la superficie del medio y limita el crecimiento de *Trichoderma*; 5, el fitopatógeno ocupa completamente la superficie del medio y crece sobre *Trichoderma*.

Los datos se analizaron por medio de ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Identificación morfológica y molecular de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* T2 y T8 que presentaron las características de antagonismo mejores hacia *Fusarium* spp. se identificaron morfológicamente con base en sus características macroscópicas y microscópicas (Samuels *et al.*, 1999; Samuels *et al.*, 2006). Para la identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* se realizó la extracción y purificación del ADN. Por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de 200 pb que comprende el quinto y parte del sexto intrón del gen que codifica para el factor de la traducción 1 (*tef1*) con el uso de los oligonucleótidos *tef1 fw*: GTG AGC GTG GTA TCA CCA y *tef1 rev*: GCC ATC CTT GGA GAC CAG C (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002), con el siguiente programa de PCR: 95 °C 3 min, 37 ciclos a 95 °C 40 s; 57 °C 50 s y 72 °C 30 s; 1 ciclo final a 72 °C 5 min. El producto de PCR se separó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%,

at one end of the Petri dish with PDA culture medium. After 48 h, discs of mycelia of 7 mm of *Trichoderma* were placed at the opposite end of the Petri dish. The experimental design was completely randomized with four replicates per treatment; each replicate contained a confrontation. A record of mycelial growth was taken every 24 h. The percentage of growth inhibition (PIC) of *Trichoderma* to the species of *Fusarium* was calculated with the following formula:

$$\text{PIC} = \text{A-B/A} \times 100$$

where A: radial growth of *Fusarium* spp. as control; B: radial growth of *Fusarium* spp. together with *Trichoderma* spp.

The qualitative evaluation was made at 13 d and the degree of antagonism was evaluated according to the classification proposed by Bell *et al.* (1982): degree 1, *Trichoderma* completely covers the surface of the medium and grows over the phytopathogen; 2, *Trichoderma* occupies at least 75% of the surface of the medium and limits the growth of the pathogen; 3, *Trichoderma* and the phytopathogen each colonize 50% of the surface of the medium; 4, the phytopathogen colonizes 75% of the surface of the medium and limits the growth of *Trichoderma*; 5, the phytopathogen completely occupies the surface of the medium and grows over *Trichoderma*.

Data were analyzed by ANOVA and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$), with the program Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Morphological and molecular identification of *Trichoderma* spp.

T2 and T8 strains of *Trichoderma* which presented the best antagonistic characteristics to *Fusarium* spp. were morphologically identified based on their macroscopic and microscopic features (Samuels *et al.*, 2006). For the molecular identification of strains of *Trichoderma*, extraction and purification of the DNA was performed. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used to amplify a fragment of 200 pb which comprises the fifth and part of the sixth introns of the gene that codifies for the factor of translation 1 (*tef1*) using the oligonucleotides *tef1 fw*: GTG ACG GTG GTA TCA CCA and *tef1 rev*: GCC ATC CTT GGA GAC CAG C (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002), with the following PCR program: 95 °C 3 min, 37 cycles at 95 °C 40 s; 57 °C 50 s and 72 °C 30 s; 1 final cycle at 72 °C 5 min. The product of PCR was separated by electrophoresis in an agarose gel at 1.5%, and afterwards was purified with the kit QIAEX II, Qiagen Agarose Gel Extraction. The purified products of PCR were quantified and sent to the

y después se purificó con el kit QIAEX II Agarose Gel Extraction de Qiagen. Los productos purificados de PCR se cuantificaron y se enviaron a la Unidad de Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias del fragmento correspondiente al gen *tefl* (-200 pb) se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (acrónimo inglés del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EEUU), con el uso de la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Evaluación de *Trichoderma* spp. en plantas de caña de azúcar.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp., hacia *F. andiyazi* y *F. sacchari* se seleccionaron las cepas T2 y T8 identificadas como *T. asperellum* y *T. koningiopsis*, respectivamente, para la evaluación *in vivo* con plantas de caña en maceta.

El inóculo de los hongos fitopatógenos *F. andiyazi* y *F. sacchari*, se obtuvo de colonias de 12 d de crecimiento en medio de cultivo PDA. Suspensiones de conidios se prepararon, ajustadas a 10^6 conidios mL⁻¹.

El sustrato se recolectó de un suelo de una parcela de caña de azúcar del municipio de Zacatepec, Morelos, y se esterilizó en autoclave. El suelo esterilizado se mezcló con agrolita y peat moss en una proporción de 2:1:1. Con este sustrato se llenaron macetas de 2 L al 80% de su capacidad.

Los tratamientos de la evaluación *in vivo* de *Trichoderma* spp. en las plantas de caña de azúcar fueron los siguientes: T1, *Trichoderma asperellum*; T2, *Trichoderma koningiopsis*; T3, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium andiyazi*; T4, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium sacchari*; T5, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium andiyazi*; T6, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium sacchari*; T7, *Fusarium andiyazi*; T8, *Fusarium sacchari*; T9, Testigo.

El sustrato de los tratamientos T3, T5 y T7 se inoculó con 100 mL de la suspensión de conidios de *F. andiyazi*. Para los tratamientos T4, T6 y T8 el sustrato de las macetas se inoculó con 100 mL de la suspensión de conidios de *F. sacchari*. En estos tratamientos la suspensión de conidios se combinó con el sustrato para producir una mezcla homogénea.

Las plantas de caña de azúcar sanas, obtenidas de cultivo de tejidos, se inocularon en las raíces con 20 mL de la suspensión de conidios de *T. asperellum* en los tratamientos T1, T3 y T4 y con *T. koningiopsis* en los tratamientos T2, T5 y T6. El tratamiento 9 fue el testigo absoluto, y no se aplicó *Fusarium* spp. a los sustratos ni *Trichoderma* a las plantas.

Las macetas con las plantas de caña se distribuyeron en un terreno en el municipio de Zacatepec, Morelos, en un diseño de bloque al azar, con tres bloques y tres repeticiones para cada

DNA Sequencing Unit of Instituto de Biotecnología, UNAM. The sequences of the fragment corresponding to the gene *tefl* (-200 pb) were compared with sequences available in the data base of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool).

Evaluation of *Trichoderma* spp. in sugarcane plants

According to the results obtained in the evaluation *in vitro* of *Trichoderma* spp. against *F. andiyazi* and *F. sacchari*, the strains T2 and T8 were selected, identified as *T. asperellum* and *T. koningiopsis*, respectively, for the *in vivo* evaluation with potted sugarcane plants.

The inoculum of the phytopathogenic fungi *F. andiyazi* and *F. sacchari* was obtained from colonies of 12 d growth in PDA culture medium. Suspensions of conidia were prepared, adjusted to 10^6 conidia mL⁻¹.

The substrate was collected from the soil of a sugarcane plot of the municipality of Zacatepec, Morelos, and was sterilized in an autoclave. The sterilized soil was mixed with perlite and peat moss in a proportion of 2:1:1. This substrate was used to fill 2 L pots at 80% of capacity.

The *in vivo* evaluation treatments of *Trichoderma* spp. in the sugarcane plants were as follows: T1, *Trichoderma asperellum*; T2, *Trichoderma koningiopsis*; T3, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium andiyazi*; T4, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium sacchari*; T5, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium andiyazi*; T6, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium sacchari*; T7, *Fusarium andiyazi*; T8, *Fusarium sacchari*; T9, Control.

The substrate of treatments T3, T5 and T7 was inoculated with 100 mL of the suspension of conidia of *F. andiyazi*. For treatments T4, T6 and T8 the substrate of the pots was inoculated with 100 mL of the suspension of conidia of *F. sacchari*. In these treatments, the suspension of conidia was combined with the substrate to produce a homogenous mixture.

The healthy sugarcane plants, obtained from tissue culture, were inoculated in the roots with 20 mL of suspension of conidia of *T. asperellum* in treatments T1, T3 and T4 and with *T. koningiopsis* in treatments T2, T5 and T6. Treatment 9 was the absolute control; thus, *Fusarium* spp. was not added to the substrates nor *Trichoderma* was applied to the plants.

Pots with the sugarcane plants were distributed in a plot in the municipality of Zacatepec, Morelos, in a randomized block design, with three blocks and three replicates for each treatment, giving a total of 81 plants evaluated. Plants were removed from the pots and the roots were washed with running water, three months after the inoculation. Variables evaluated were: plant height (cm), fresh and dry root biomass (g), number and diameter of stems (mm) and root length (cm). Data were

tratamiento, dando un total de 81 plantas evaluadas. Tres meses después de la inoculación las plantas se removieron de las macetas y las raíces se lavaron con agua corriente. Las variables evaluadas fueron: la altura de la planta (cm), biomasa húmeda y seca de la raíz (g), número y diámetro de tallos (mm) y longitud de la raíz (cm). Los datos se analizaron por medio de ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de *Trichoderma*

De las muestras de suelo se aislaron 18 cepas con las características típicas del género *Trichoderma*, como crecimiento rápido en medio de cultivo y desarrollo de conidios con coloración verde-amarilla, de acuerdo con Chaverri *et al.* (2015). *Trichoderma* es un género identificado por su morfología microscópica y las características que lo distinguen son la forma y el tamaño de los conidios filiales y conidióforos. En este estudio la colonia de la cepa T2 después de 7 d de crecimiento presentó un diámetro de 8 a 9 cm, formó de 2 a 3 anillos concéntricos, mostró producción densa de conidios, conidióforos ramificados, filiales ampuliformes, conidios globosos ligeramente ovalados con pigmentación verde amarilla, lo cual permitió identificarla como *T. asperellum* (Samuels *et al.*, 1999). La colonia de la cepa T8 a los 7 d de crecimiento presentó diámetro de 9 cm, formó de 2 a 3 anillos concéntricos, con conidióforos escasamente ramificados, filiales cortas y lageniformes, mostró producción densa de conidios elipsoidales en coloración verde-amarillo, lo cual permitió identificarla como *T. koningiopsis* (Samuels *et al.*, 2006).

La identidad de las cepas se confirmó por medio de la amplificación y secuenciación de una región de 200 pb del gen *tef1* (Kullning-Gradinger *et al.*, 2002). La secuencia de la cepa T2 mostró una identidad del 100% con *Trichoderma asperellum* strain TRS 746 (número de acceso: KP008926), mientras que la identidad de la cepa T8 fue 99% con *Trichoderma koningiopsis* GJS04-199 (número de acceso: FJ463268).

Antagonismo *in vitro*

En las evaluaciones en cultivos duales se observó el antagonismo de las 18 cepas de *Trichoderma* evaluadas hacia *F. sacchari* y *F. andiyazi*. El contacto

analizado usando ANOVA y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of *Trichoderma*

From the soil samples, 18 strains were isolated with the typical characteristics of the genus *Trichoderma*, such as fast growth in culture medium and development of conidia with green-yellow coloring, according to Chaverri *et al.* (2015). *Trichoderma* is a genus identified by its microscopic morphology and distinctive characteristics are the form and size of the conidia, phialides and conidiophores. In this study, the colony of T2 strain after 7 d of growth presented a diameter of 8 to 9 cm, formed 2 to 3 concentric rings, showed dense production of conidia, branched conidiophores, ampulliform phialides, rounded conidia that were slightly oval with greenish yellow pigmentation, which permitted identification as *T. asperellum* (Samuels *et al.*, 1999). The colony of T8 strain at 7 d of growth presented a diameter of 9 cm, formed 2 to 3 concentric rings, with scantily branched conidia, short and lageniform phialides, showed dense production of ellipsoidal conidia with green-yellow coloring, which identified it as *T. koningiopsis* (Samuels *et al.*, 2006).

Identity of the strains was confirmed by amplification and sequencing of a region of 200 pb of the gen *tef1* (Kullning-Gradinger *et al.*, 2002). The sequence of the T2 strain showed an identity of 100% with *Trichoderma asperellum* strain TRS 746 (access number: KP008926), while the identity of T8 strain was 99% with *Trichoderma koningiopsis* GJS04-199 (access number: FJ463268).

Antagonism *in vitro*

In the evaluations in dual cultures the antagonism was observed of the 18 strains of *Trichoderma* evaluated against *F. sacchari* and *F. andiyazi*. The contact between the evaluated colonies of *Trichoderma* and *F. andiyazi* occurred at 48 h and with *F. sacchari* at 72 h. In that area in which the mycelia made contact, a beige strip was formed, which indicates a possible incompatibility between them. Our results agree with those of Thangavelu *et al.* (2004), who found and evaluated change in coloration. Contact zone

entre las colonias de *Trichoderma* evaluadas y *F. andiyazi* ocurrió a las 48 h y con *F. sacchari* a las 72 h. En el área en la cual los micelios hicieron contacto se formó una franja color beige, lo que indica la posibilidad de incompatibilidad entre ellos. Estos resultados concuerdan con los de Thangavelu *et al.* (2004) quienes hallaron y evaluaron este cambio en la coloración. Esta zona de contacto indica claramente la secreción de metabolitos tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma*, los cuales se producen en respuesta al contacto (Sharma, 2011). *Trichoderma* tiene la capacidad de producir metabolitos volátiles y no volátiles (Patil *et al.*, 2012) así como enzimas hidrolíticas extracelulares y metabolitos antifúngicos secundarios que actúan sinérgicamente en la inhibición del crecimiento fúngico (Naglot *et al.*, 2015).

Las cepas de *Trichoderma* indujeron un PIC variable hacia cada patógeno evaluado. El análisis estadístico mostró que el crecimiento *in vitro* de *F. sacchari* disminuyó ($p \leq 0.05$) de 44.37% a 32.5% en la evaluación con las cepas de *Trichoderma* spp. (Cuadro 1). La cepa de *Trichoderma* T2 indujo la

clearly indicates the secretion of metabolites from both *Fusarium* and *Trichoderma*, which are produced in response to contact (Sharma, 2011). *Trichoderma* has the capacity of producing volatile and nonvolatile metabolites (Patil *et al.*, 2012), as well as extracellular hydrolytic enzymes and secondary antifungal metabolites, with synergic action on the inhibition of fungal growth (Naglot *et al.*, 2015).

The strains of *Trichoderma* induced a variable percentage of growth inhibition (PIC) against each pathogen evaluated. The statistical analysis showed that the *in vitro* growth of *F. sacchari* decreased ($p \leq 0.05$) from 44.3 to 32.5% in the evaluation with the strains of *Trichoderma* spp. (Table 1). The T2 strain of *Trichoderma* induced the highest inhibition (44.37%) of growth, followed by the T4, T8 and T11 strains with 40.65% inhibition. Furthermore, the growth *in vitro* of *F. andiyazi* decreased ($p \leq 0.05$) from 48.75 to 39.37%. In this case, the T8 strain of *Trichoderma* induced the highest inhibition (48.75%) of growth, followed by the T2 strain with 46.26%. The T6 strain induced the lowest PIC to the two species of *Fusarium* evaluated (Table 1).

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento (%) y sobrecrecimiento (%) de *Trichoderma* spp. hacia *F. sacchari* y *F. andiyazi*.

Table 1. Inhibition of growth (%) and overgrowth (%) of *Trichoderma* spp. against *F. sacchari* and *F. andiyazi*.

Tratamiento (cepa)	PIC en <i>Fusarium sacchari</i>	PIC en <i>Fusarium andiyazi</i>	Sobrecrecimiento en <i>F. sacchari</i>	Sobrecrecimiento en <i>F. andiyazi</i>
T1	38.12 bcd	43.12 bcd	100 c	75.0 b
T2	44.37 d	46.26 cd	75.0 b	68.75 b
T3	40.0 cd	41.25 bc	100 c	93.75 b
T4	40.62 cd	45.0 bcd	75.0 b	68.75 b
T5	35.62 b	41.87 bc	68.75 b	75.0 b
T6	32.5 b	39.37 b	75.0 b	75.0 b
T7	37.5 bc	43.12 bcd	100 c	87.5 b
T8	40.62 cd	48.75 d	100 c	81.25 b
T9	40.0 cd	45.0 bcd	100 c	68.75 b
T10	36.87 bc	40.62 bc	56.25 b	81.25 b
T11	40.62 cd	43.75 bcd	75.0 b	68.75 b
T12	35.62 b	43.12 bcd	75.0 b	50.0 b
T13	39.37 cd	42.50 bc	75.0 b	87.5 b
T14	37.5 bc	43.12 bcd	100 c	87.5 b
T15	38.75 bcd	40.0 b	75.0 b	75.0 b
T16	38.12 bcd	40.0 b	75.0 b	87.5 b
T17	38.75 bcd	41.87 bc	75.0 b	75.0 b
T18	38.12 bcd	43.75bcd	56.25 b	62.5 b
19 (testigo)	0 a	0 a	0 a	0 a

Valores con letras diferentes indica diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Values with different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

mayor inhibición (44.37%) del crecimiento, seguida de las cepas T4, T8 y T11 con 40.65% de inhibición; además, el crecimiento *in vitro* de *F. andiyazi* disminuyó ($p \leq 0.05$) de 48.75% a 39.37%. En este caso la cepa de *Trichoderma* T8 indujo la mayor inhibición (48.75%) de crecimiento, seguida de la cepa T2 con 46.26%. La cepa T6 indujo el menor PIC hacia las dos especies de *Fusarium* evaluadas (Cuadro 1).

Los resultados fueron superiores a lo documentado por Gawade *et al.* (2012) acerca del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* hacia el género *Fusarium*, pero resultaron menores a los observados por Naglot *et al.* (2015) con valores de PIC desde 60 a 75%. Es notable que *Trichoderma* puede mostrar una variabilidad en la inducción de PIC hacia los diferentes grupos de patógenos, por lo cual es necesario una selección específica para cada patógeno (Fernandes *et al.*, 2013) y pese a que los niveles de PIC son menores a lo informado en otros estudios, los aislamientos mostraron eficacia variable sobre las dos especies patógenas.

El grado de antagonismo de las 18 cepas de *Trichoderma* fue diferente ($p \leq 0.05$) hacia las dos especies de *Fusarium*. Las cepas T1, T3, T7, T8, T9 y T14 superaron en 100% el crecimiento sobre *F. sacchari* y las cepas T2, T4, T6, T11, T12, T13, T15, T16 y T17 en 75% (Cuadro 1). Por tanto, de acuerdo con Bell *et al.* (1982), se les clasifica dentro de los grados de antagonismo 1 y 2, respectivamente. La cepa T3 superó en 93.75% el crecimiento sobre *F. andiyazi* y las cepas T7, T13, T14 y T16 en 87.5%, y estas cepas se catalogan dentro del grado 1 de antagonismo; las cepas T8 y T10 crecieron 81.25% sobre *Fusarium* y las cepas T1, T5, T6, T15 y T16 75%, con un antagonismo grado 2.

Estos resultados concuerdan con lo citado por Fernandes *et al.* (2013), quienes indicaron que *Trichoderma* puede superar en crecimiento en 50-100% a diversos hongos fitopatógenos. El crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre las especies de *Fusarium* registrado en nuestro estudio, pudo ser favorecido por la producción de diversas enzimas que degradan a la pared celular, lo cual les permitió infectar las hifas de los patógenos (Schickler y Chet, 1997). Naglot *et al.* (2015) indicaron que *T. viride* secreta 1, 3, β glucanasa, pectinasas, proteasas, amilasas y quitinasas. Además, Michel-Aceves *et al.* (2005) documentaron la producción de quitinasas y glucanasas por *T. harzianum* y *T. koningii* cuando se enfrentan con *F. subglutinans* y *F. oxysporum*.

The results were superior to those reported by Gawade *et al.* (2012) of the antagonism of some species of *Trichoderma* to the genera *Fusarium*, but resulted lower than those observed by Naglot *et al.* (2015) with values of PIC from 60 to 75%. It is notable that *Trichoderma* can show a variability in the induction of PIC toward the different groups of pathogens, therefore it is necessary to have a specific selection for each pathogen (Fernandes *et al.*, 2013). Despite our observed levels of PIC were lower than those reported in other studies, these isolates showed variable efficacy over two species of pathogens.

The degree of antagonism of the 18 strains of *Trichoderma* was different ($p \leq 0.05$) toward the two species of *Fusarium*. Strains T1, T3, T7, T8, T9 and T14 surpassed by 100% the growth over *F. sacchari*, and strains T2, T4, T6, T11, T12, T13, T15, T16 and T17 were higher by 75% (Table 1). Therefore, according to Bell *et al.* (1982), they are classified as degree of antagonism 1 and 2, respectively. T3 strain growth surpassed by 93.75% over *F. andiyazi*, and the strains T7, T13, T14 and T16, by 87.5%, these strains are catalogued within degree 1 of antagonism. Strains T8 and T10 grew 81.25% over *Fusarium* and strains T1, T5, T6, T15 and T16, 75%, with an antagonism degree of 2.

These results concur with those cited by Fernandes *et al.* (2013), who indicated that *Trichoderma* can surpass in growth by 50-100% diverse phytopathogenic fungi. The registered growth of the strains of *Trichoderma* over the species of *Fusarium* in our study may have been favored by the production of diverse enzymes that degrade the cell wall, which would allow them to infect the hyphae of the pathogens (Schickler and Chet, 1997). Naglot *et al.* (2015) indicated that *T. viride* secretes 1, 3, β glucanase, pectinases, proteases, amylases and chitinases. In addition, Michel-Aceves *et al.* (2005) documented the production of chitinases and glucanases by *T. harzianum* and *T. koningii* when confronted *F. subglutinans* and *F. oxysporum*.

Biocontrol of *F. andiyazi* and *F. sacchari* with *Trichoderma* spp. in sugarcane plants

Sugarcane plants inoculated with the pathogens developed first visible symptoms at 15 d. Plants inoculated only with *F. andiyazi* (T7) and *F. sacchari* (T8) developed symptoms of wilting, scant development, flaccidity, curling, chlorosis and

Biocontrol de *F. andiyazi* y *F. sacchari* con *Trichoderma* spp. en plantas de caña de azúcar

Las plantas de caña de azúcar inoculadas con los patógenos desarrollaron los primeros síntomas visibles a los 15 d. Las plantas inoculadas solo con *F. andiyazi* (T7) y *F. sacchari* (T8) desarrollaron síntomas de marchitez, poco desarrollo, flacidez, enrollamiento, clorosis y malformación en algunos tallos. Asimismo, a 15 d después de la inoculación con los tratamientos 3, 6, 7 y 8 se indujo la necrosis de los tejidos de las raíces. Viswanathan *et al.* (2012) encontraron que el desarrollo de una sintomatología similar cuando se inoculan plantas de caña de azúcar con *F. sacchari*. Con respecto al efecto de los tratamientos en el número y diámetro de los tallos no hubo diferencias estadísticas. La altura fue diferente entre los tratamientos ($p \leq 0.05$); la altura mayor se obtuvo en las plantas inoculadas con las especies de *Trichoderma*, y la menor en las plantas inoculadas solo con *F. andiyazi* (T7).

En la longitud de las raíces, así como en la biomasa húmeda y seca de las mismas, las plantas presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 2). En aquellas inoculadas con las especies de *Trichoderma* (T1 y T2) presentaron una longitud mayor de las raíces en comparación con las plantas inoculadas solo con las especies de *Fusarium*, y la

malformation in some stems. Similarly, at 15 d after the inoculation with treatments 3, 6, 7 and 8, necrosis of root tissue was induced. Viswanathan *et al.* (2012) found the development of a similar symptomology when sugarcane plants were inoculated with *F. sacchari*. Regarding the effect of treatments on number and diameter of stems, there were no statistical differences. The height was different among the treatments ($p \leq 0.05$); the greatest height was obtained in plants inoculated with *Trichoderma* species, and the lowest in those inoculated with only *F. andiyazi* (T7).

In the length of the roots, as well as in fresh and dry root biomass, plants presented differences ($p \leq 0.05$) among treatments (Table 2). In those inoculated with the species of *Trichoderma* (T1 and T2), plants showed a greater length in the roots compared with those inoculated with species of *Fusarium*, and the length was shorter in the plants inoculated with *F. andiyazi*. Fresh and dry biomass of the roots was greater in the plants inoculated with *T. koningiopsis* (T2 and T5). In contrast, plants with lower fresh and dry biomass in roots were those inoculated only with *F. andiyazi* (T7).

In the plants of treatments 3, 4, 5 and 6, inoculated with *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp., the effect of the antagonists was evident, inducing the highest values in the evaluated variables compared

Cuadro 2. Efecto de la inoculación de *Trichoderma asperellum* y *T. koningiopsis* en las variables de crecimiento de caña de azúcar.

Table 2. Effect of inoculation of *Trichoderma asperellum* and *T. koningiopsis* in the growth variables of sugarcane.

Tratamiento	Número de tallos	Diámetro de tallos (cm)	Altura de tallos (cm)	Longitud de raíces (cm)	Biomasa húmeda raíces (g)	Biomasa seca raíces (g)
1 <i>Trichoderma asperellum</i>	6.0 a	0.89 a	22.96 ab	62.43 a	19.83 ab	5.0 ab
2 <i>Trichoderma koningiopsis</i>	5.6 a	0.86 a	21.3 ab	54.46 ab	26.48 ab	6.36 a
3 <i>Trichoderma asperellum-Fusarium andiyazi</i>	6.0 a	0.85 a	18.4 ab	50.43 ab	23.96 ab	5.33 ab
4 <i>Trichoderma asperellum-Fusarium sacchari</i>	5.6 a	0.63 a	14.23 ab	33.93 ab	19.40 ab	4.36 ab
5 <i>Trichoderma koningiopsis-Fusarium andiyazi</i>	4.6 a	1.02 a	27.86 a	43.73 ab	27.16 a	5.70 ab
6 <i>Trichoderma koningiopsis-Fusarium sacchari</i>	5.0 a	0.93 a	17.73 ab	50.16 ab	18.33 ab	4.16 ab
7 <i>Fusarium andiyazi</i>	2.67 a	0.43 a	9.73 b	25.73 b	9.86 b	2.0 b
8 <i>Fusarium sacchari</i>	4.33 a	0.74 a	19.73 ab	38.96 ab	20.23 ab	4.20 ab
9 Testigo	4.0 a	1.0 a	16.16ab	55.66 ab	16.16 ab	2.20 b

Valores con letras diferentes indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Values with different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

longitud fue menor en las plantas inoculadas con *F. andiyazi*. La biomasa húmeda y seca de las raíces fue mayor en las plantas inoculadas con *T. koningiopsis* (T2 y T5). En contraste, las plantas con biomasa húmeda y seca menores en raíces fueron las inoculadas solo con *F. andiyazi* (T7).

En las plantas de los tratamientos 3, 4, 5 y 6, inoculadas con *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. fue evidente el efecto de los antagonistas que indujeron los valores más altos en las variables evaluadas en comparación con los tratamientos en donde solo se aplicaron los patógenos. En el tratamiento 3 (*T. asperellum* - *F. andiyazi*) las plantas mostraron un desarrollo mayor en las variables evaluadas que las del tratamiento 7 inoculadas solo con *F. andiyazi*. En la interacción con *F. sacchari* (T4) solo indujeron valores más altos en número de tallos y biomasa seca de las raíces. En el tratamiento 5 (*T. koningiopsis* - *F. andiyazi*) los valores de las variables evaluadas en las plantas fueron superiores en comparación con las inoculadas solo con el patógeno *F. andiyazi* (T7) y se obtuvieron diferencias significativas en altura de los tallos, longitud de raíces, biomasa húmeda y seca de las raíces. Estos datos indican la participación de *T. koningiopsis* en limitar la infección de *F. andiyazi* en las raíces de estas plantas. En la interacción de *T. koningiopsis* con *F. sacchari* solo se presentaron valores altos en número y diámetro de tallos y longitud de raíces.

En relación con la aplicación de *Trichoderma* en plantas, algunas cepas ejercen un efecto benéfico al interactuar directamente con las raíces, e incrementan el crecimiento de las plantas y resistencia a enfermedades (Hermosa *et al.*, 2012). La aplicación de *T. asperellum* aumenta la longitud del tallo y la raíz de las plantas de jitomate y reduce la incidencia de la marchitez ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Patel y Saraf, 2017). *Trichoderma koningiopsis* influye en la disminución de la pudrición basal de la cebolla causada por *F. oxysporum* (Sánchez *et al.*, 2015), en la reducción de la fusariosis o pudrición del fruto de la piña, causada por *F. guttiforme* en cultivos de Brasil (Trocoli *et al.*, 2017). Además, esta especie induce la respuesta de defensa sistémica contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en plantas de tomate (Jaimes-Suárez *et al.*, 2009) y se han aislado compuestos antimicrobianos conocidos como koningioninas que tienen actividad contra *F. oxysporum* y *F. flocciferum* (Hu *et al.*, 2016).

with treatments in which only the pathogens were applied. In treatment 3 (*T. asperellum* - *F. andiyazi*), plants showed a greater development in the variables evaluated than those of treatment 7 inoculated only with *F. andiyazi*. In the interaction with *F. sacchari* (T4), higher values were induced only in number of stems and dry biomass of roots. In treatment 5 (*T. koningiopsis* - *F. andiyazi*), values of the evaluated variables in the plants were higher compared with those inoculated only with the pathogen *F. andiyazi* (T7), and significant differences were obtained in stem height, root length, and fresh and dry biomass of the roots. These data indicate the participation of *T. koningiopsis* in limiting the infection of *F. andiyazi* in the roots of these plants. On the interaction of *T. koningiopsis* with *F. sacchari*, high values were found only in number and diameter of stems and root length.

Regarding application of *Trichoderma* in plants, some strains exert a beneficial effect by interacting directly with the roots, increasing the growth of plants and resistance to diseases (Hermosa *et al.*, 2012). The application of *T. asperellum* increases the length of stem and root in tomato plants and reduces the incidence of wilting caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Patel and Saraf, 2017). *Trichoderma koningiopsis* influences decrease in basal rotting of onion caused by *F. oxysporum* (Sánchez *et al.*, 2015); also, in the reduction of fusariosis (rotting) of pineapple fruit, caused by *F. guttiforme* in crops of Brazil (Trocoli *et al.*, 2017). In addition, this species induces the systemic defense response against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants (Jaimes-Suárez *et al.*, 2009), as antimicrobial compounds known as koningionins, which have activity against *F. oxysporum* and *F. flocciferum*, were isolated (Hu *et al.*, 2016).

CONCLUSIONS

The 18 isolates of *Trichoderma* analyzed in this study showed differences in their antagonistic capacity to *Fusarium andiyazi* and *F. sacchari*. Two of the strains, identified as *T. asperellum* and *T. koningiopsis*, exhibited the best antagonistic characteristics under *in vitro* conditions and in the sugarcane plants against the root pathogens *F. andiyazi* and *F. sacchari*.

These two species of *Trichoderma* produced a beneficial effect on the development of the sugarcane

CONCLUSIONES

Los 18 aislamientos de *Trichoderma* analizados en este estudio mostraron diferencias en su capacidad antagonista hacia *Fusarium andiyazi* y *F. sacchari*. Dos de las cepas, identificadas como *T. asperellum* y *T. koningiopsis* presentaron las mejores características antagonistas en condiciones *in vitro* y en las plantas de caña de azúcar hacia los patógenos de la raíz *F. andiyazi* y *F. sacchari*.

Las dos especies de *Trichoderma* produjeron un efecto benéfico en el desarrollo de las plantas de caña de azúcar, que se demostró el incremento en el número de tallos, altura, diámetro de tallos, longitud de raíz, biomasa húmeda y seca de las raíces. De esta manera *Trichoderma asperellum* y *T. koningiopsis* tienen potencial como agentes de control biológico de patógenos de la raíz en cultivos de caña de azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado No. 422996 otorgada a L. C. Gamboa-Villa.

LITERATURA CITADA

- Bell, D. K., H. D. Well, and C. R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Chaverri, P., F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb, and G. J. Samuels. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.
- CONADESUCA (Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar). 2018. Balance nacional de azúcar y edulcorantes, ciclo 2018. <https://www.gob.mx/conadesuca/articulos> (Consulta: enero 2019).
- El-Amin A., and A. M. A. Saadabi. 2007. Contribution to the knowledge of soil fungi in Sudan rhizosphere mycoflora of sugarcane at Kenana Sugar Estate. *Int. J. Bot.* 3: 97-102.
- Fernandes, T., F. Cardoso, A. Stecca, R. Silva, R. Santos, and C. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.* 35:1461-1468.
- Gawade, D. B., B. H. Pawar, S. J. Gawande, and V. C. Vasekar. 2012. Antagonist effect of *Trichoderma* against *Fusarium moniliformae* the causal of sugarcane wilt. *Amer.-Euras. J. Agri. Environ.* 12: 1236-1241.
- Hermosa, R., A. Viterbo, I. Chet, and E. Monte. 2012. Plant beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.

plants, which was demonstrated in the increment in the number of stems, height, stem diameter, root length, and fresh and dry root biomass. Therefore, *Trichoderma asperellum* and *T. koningiopsis* have potential as biological control agents against root pathogens in sugarcane cultivation.

—End of the English version—

—*—

- Hu, M., L. Qi-Ling, Y. Ya-Bin, L. Kai, L. Cui-Ping, Z. Li-Xing, and D. Zhong-Tao. 2017. Koninginins R-S from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. *Nat. Prod. Res.* 31: 835-839.
- Jaimes-Suárez, Y., C. A. Moreno-Velandia, y A. M. Cotes-Prado. 2009. Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta Biol. Colomb.* 14: 111-120.
- Khalili, E., M. Sadravi, S. Naeimi, and V. Khosravi. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Braz. J. Microbiol.* 297-305.
- Kullning-Gradinger C. M., G. Szakacs, and C. P. Kubicek. 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* 106: 757-767.
- Martínez-Fernández E., P. Martínez-Jaimes, y J. C. García-Montalvo. 2014. Marchitez de la caña de azúcar en Morelos. Comité estatal de sanidad vegetal del estado de Morelos A.C. *Monitor Agríc.* 27: 11-14.
- Michel-Aceves A., M. Otero-Sánchez, O. Rebolledo-Domínguez, R. Lezama-Gutiérrez, y M. Ochoa-Moreno. 2005. Producción y efecto antagonista de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 11: 273-278.
- Naglot, A., S. Goswami, I. Rahman, D. Shrimali, K. Yadav, K. Vikas, A. Rabha, H. Gogoi, and V. Veer. 2015. Antagonistic potential of native *Trichoderma viride* strain against potent tea fungal pathogens in north east India. *Plant Pathol. J.* 31: 278-289.
- Patel, S., and M. Saraf. 2017. Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum* MSST against tomato wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Arch. Phytopathol. Plant Protec.* 50: 228-238
- Patil, A., A. Laddha, A. Lunge A, H. Paikrao, and S. Mahure. 2012. *In vitro* antagonistic properties of selected *Trichoderma* species against tomato root rot causing *Pythium* species. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 1: 302-315.
- Rebollar, A. A., J. R. Sánchez, y H. V. Silva. 2012. Manejo integrado de *Fusarium* spp. en variedades cultivadas y promotoras de caña de azúcar. *Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.* 19 p.
- Rodríguez, B. D., y C. Y. Gato. 2010. Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad.* 14: 241-246.

- Saba, H., D. Vibhash, M. Manisha, K. S. Prashant, H. Farhan, and A. Tauseef. 2012. *Trichoderma*- a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* 3: 524-531.
- Samuels, G. J., E. Lieckfeldt, and H. I. Nirenberg. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 51: 71-88.
- Samuels, G. J., S. L. Dodd, L. Bing-Shen, O. Petrini, S. Hans-Josef, and I. S. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Mycology* 56: 67-133.
- Sánchez, A. D., V. Barrera, G. E. Reybet, and M. C. Sosa. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Rev. Fac. Agron. La Plata* 114: 61-70.
- Schickler, H., and I. Chet. 1997. Heterologous chitinase gene expresión to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 19: 169-201.
- Sharma, P. 2011. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Aust. J. Crop Sci.* 5: 1027-1038.
- Snyman, S. J., G. M. Meyer, A. C. Koch, M. Banasiak, and M. P. Watt. 2011. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47: 234-249.
- Thangavelu, R., A. Palaniswami, and R. Velazhahanc. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agri. Ecos. Environ.* 103: 259-263.
- Trocoli, R. O., F. P. Monteiro, P. O. Santos, and J. T. De Souza. 2017. Field applications of *Trichoderma* reduce pineapple fusariosis severity and increase fruit weight. *J. Plant Pathol.* 99: 225-228.
- Viswanathan, R., M. Poongothai, P. Malathi, and A. R. Sundar. 2012. Sugarcane wilt: new insights into pathogen identity, variability and pathogenicity. *Funct. Plant Sci. Biotech.* 6: 30-39.
- Vishwakarma, S. K., P. Kumar, A. Nigam, A. Singh, and A. Kumar A. 2013. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. *Plant Pathol. Microbiol.* 4:170