

In vitro* control of *Fusarium* sp. associated with onion crop through *Trichoderma harzianum

Control *in vitro* de *Fusarium* sp. asociado al cultivo de cebolla mediante *Trichoderma harzianum*

Saira J. Martínez-Salgado, Petra Andrade-Hoyos, Omar Romero-Arenas*, Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Pedro Zacachimalpa, CP. 72960, Puebla, México; **Nemesio Villa-Ruano, Gerardo Landeta-Cortés**, CONACyT, Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología-DITCo; **José Antonio Rivera-Tapia**, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla CP. 72570, México. *Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Recibido: 25 de Enero, 2021.

Aceptado: 02 de Marzo, 2021.

Martínez-Salgado SJ, Andrade-Hoyos P, Romero-Arenas O, Villa-Ruano N, Landeta-Cortés G and Rivera-Tapia JA. 2021. *In vitro* control of *Fusarium* sp. associated with onion crop through *Trichoderma harzianum*. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 314-328

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-4>

Primera publicación DOI: 22 de Marzo, 2021.

First DOI publication: March 22, 2021.

Resumen. La cebolla es la segunda hortaliza de mayor producción en el mundo. En México constituye un cultivo de gran importancia económica en diversos estados. El objetivo de la presente investigación fue identificar y caracterizar morfológicamente la cepa CFbC asociada a la podredumbre basal del cultivo de cebolla, así como determinar

Abstract. Onion is the second largest production vegetable in the world. In Mexico it is a crop of great economic importance in various states. The objective of this research was to identify and morphologically characterize the CFbC strain associated with basal rot of onion crops, as well as to determine the *in vitro* antagonistic capacity of *Trichoderma harzianum* T-H4 on the isolate. Vegetable tissue samples showing rot at the stem and bulb level of the onion crop were collected and monosporic cultures were generated for their characterization and identification by the ITS1 and ITS4 regions. A 533 bp sequence of CFbC strain was obtained, which presented 100% identity with *Fusarium* sp., Associated with basal rot. The *T. harzianum* strain presented a percentage of radial growth inhibition (PICR) of 76.24% antagonistic level *in vitro* and a class II on the Bell scale. It is suggested to carry out biological control

la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* T-H4 sobre *Fusarium* sp. Se colectaron muestras de tejido vegetal que presentaban pudrición a nivel de tallo y bulbo del cultivo de cebolla y se generaron cultivos monospóricos para su caracterización e identificación por las regiones ITS1 e ITS4. Se obtuvo una secuencia de 533 pb de cepa CFbC, que presentó 100% de identidad con *Fusarium* sp., asociada a la podredumbre basal. La cepa *T. harzianum* presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de 76.24% de nivel antagónico *in vitro* y una clase II en la escala de Bell. Se sugiere realizar evaluaciones de control biológico con la cepa T-H4 en invernadero y a campo abierto, así como su identificación a nivel especie con técnicas moleculares complementarias.

Palabras clave: Antagonismo, identificación molecular, crecimiento micelial, PICR.

La cebolla (*Allium cepa*) es considerada uno de los ingredientes indispensables en la dieta y cultivada alrededor del mundo (Joaheer *et al.*, 2019). En México es el tercer cultivo de mayor importancia en las hortalizas, con una producción de 85,104 t para el año 2018 en un área sembrada aproximada de 7,329 ha, dejando una derrama económica de 26,029,376 millones de dólares (FAO, 2020). Baja California es el principal estado productor de cebolla con superficie sembrada de 3,443 ha, mientras que Puebla ocupa el quinto lugar con 2,480 ha con un rendimiento de 21,371 t ha⁻¹ (SIAP, 2020).

Las enfermedades causadas por hongos que se presentan con mayor frecuencia en esta hortaliza, y pueden afectar follaje, raíz y fruto durante las etapas de precosecha y postcosecha (Ji *et al.*, 2018). Algunas de las enfermedades con mayor incidencia en el género *Allium* son causadas por *Rhizoctonia solani*, *Brotrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum*

evaluations with the T-H4 strain in the greenhouse and in the open field, as well as its identification at the species level.

Keywords: Antagonism, molecular identification, mycelial growth, PICR.

Onion (*Allium cepa*) is considered one of the basic ingredients in human diets and as a crop around the world (Joaheer *et al.*, 2019). In Mexico, it is the third most important vegetable, with a production of 85,104 t for the year 2018, planted in approximately 7,329 ha, leaving a revenue of de 26,029,376 dollars (FAO, 2020). Baja California is the state that produces the most onion, with a surface of 3,443 ha, and the state of Puebla is fifth, with 2,480 ha and a yield of 21,371 t ha⁻¹ (SIAP, 2020).

The most frequent diseases caused by fungi in this vegetable can affect foliage, roots and fruits during the stages of harvest and postharvest (Ji *et al.*, 2018). Some of the diseases with the highest incidence on the *Allium* species are caused by *Rhizoctonia solani*, *Brotrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum circinans* and *Fusarium* spp. (Montes-Belmont *et al.*, 2003), the latter being the main devastator of this crop in recent years (Abdalla *et al.*, 2019). Basal rot caused by the genus *Fusarium* spp. is widely distributed around the globe and has become a limitation in onion and garlic producing areas (Kiehr y Delhey, 2015). The main species within the genus *Fusarium* that harms the onion crop around the world are *F. proliferatum*, *F. solani* and *F. oxysporum*, reducing its yield by up to 50% (Haapalainen *et al.*, 2016), and it produces symptoms in the onion plant that include wilting, rotting of the roots and the basal lamina of the bulb (Sanogo and Zhang, 2015). In Mexico, the genus *Fusarium* is responsible for diverse diseases in

circinans y *Fusarium* spp. (Montes-Belmont *et al.*, 2003), este último es considerado como el principal devastador de este cultivo durante los últimos años (Abdalla *et al.*, 2019). La pudrición basal ocasionada por el género *Fusarium* spp., se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, convirtiéndose en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo (Kiehr y Delhey, 2015). Las principales especies del género *Fusarium* que daña al cultivo de cebolla alrededor del mundo son *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. oxysporum* reduciendo hasta un 50% su rendimiento (Haapalainen *et al.*, 2016), donde los principales síntomas de las plantas de cebolla son: marchitamiento, pudrición de raíces y de la placa basal del bulbo (Sanogo y Zhang, 2015). En México, el género *Fusarium* es responsable de diversas enfermedades en cultivos de cebolla (Montes-Belmont *et al.*, 2003). Por eso su importancia en la presente investigación.

Los productos de síntesis química se han empleado por décadas para el control de estas enfermedades (Gan y Wickings, 2017). Sin embargo, el uso de éstos está relacionado con la generación de resistencia, daños al ambiente y la salud humana (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Por lo tanto, el control biológico se considera una de las prácticas eficientes y ecológicamente viables para el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* contiene especies antagonistas capaces de controlar un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola (Romero-Arenas *et al.*, 2017). El éxito y su uso en la agricultura se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio, micoparasitismo, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018), y la producción de compuestos volátiles (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron caracterizar morfológicamente aislados fúngicos del género *Fusarium* asociados a bulbos de cebolla en la comunidad rural La Soledad,

onion plantations (Montes-Belmont *et al.*, 2003). Hence its importance in this investigation.

Chemically synthesized products have been used for decades in the control of these diseases (Gan and Wickings, 2017). However, their use is related to the generation of resistance, environmental damage and the deterioration of human health (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Therefore, biological control is considered an efficient and environmentally feasible practice for the development of sustainable agriculture (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

The genus *Trichoderma* contains antagonistic species capable of controlling a wide number of fungi that affect plants of agricultural interest (Romero-Arenas *et al.*, 2017). Its success and use in agriculture are due to its action mechanisms such as the competition for space, mycoparasitism, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018), and the production of volatile compounds (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Consequently, the aims of this investigation were to morphologically characterize fungal isolations of the genus *Fusarium* relates to onion bulbs in the rural town of La Soledad, Chietla, Puebla-Mexico and to determine the *in vitro* antagonistic ability of *T. harzianum* T-H4 on fungal isolations of the onion crop.

Isolation area. Plant tissues with rotting of the stem (basal lamina) or bulb and scarce radicle development were collected from a 3,144.3 m² “Crystal white” onion field with a background of high fungal incidence during the summer-autumn 2019 production season (18° 27' 39.3258" N and -98° 37' 11.2614" W). The field belongs to the town of La Soledad, in the municipal area of Chietla in the state of Puebla, with a warm desert weather (Bwh) and a mean rainfall of 700 mm (García, 2004). Sampling was aimed at individuals with symptoms related to the genus *Fusarium*; all samples were kept in an ice box until they were transferred to the laboratory.

Chietla, Puebla-México y determinar la capacidad antagonista *in vitro* de *T. harzianum* T-H4 sobre aislados fúngicos del cultivo de cebolla.

Zona del aislamiento. Se colectaron muestras de tejido vegetal con pudrición a nivel de tallo (disco basal) o bulbo, y poco desarrollo radicular en una parcela de 3 144.3 m² de cultivo de cebolla variedad “Crystal white” con antecedentes de alta incidencia fúngica durante la producción verano-otoño 2019 (18° 27' 39.3258" y -98° 37' 11.2614"). La parcela agrícola corresponde a la comunidad La Soledad, perteneciente al municipio de Chietla del estado de Puebla, con un clima desértico cálido (Bwh) y precipitación media de 700 mm (García, 2004). El muestreo fue dirigido hacia individuos con síntomas asociados al género *Fusarium*; todas las muestras se mantuvieron en bolsas de plástico dentro de una hielera hasta su traslado al laboratorio.

Aislamiento de *Fusarium* sp. de tejidos vegetales. Se seleccionaron 30 bulbos para ser desinfectados con agua corriente e hipoclorito de sodio al 10%. Se colocaron porciones de bulbos en cámaras húmedas; para esto se utilizaron cajas de polietileno y papel filtro estéril húmedo, finalmente las cajas de polietileno se incubaron a 28 °C, por 10 días. Una vez terminado el tiempo de incubación, el tejido muerto de los bulbos se cortó en secciones de 0.5 cm², se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% y se lavaron tres veces con agua destilada. Se secaron con papel estéril y finalmente se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a una temperatura de 28 °C con luz ambiental, por tres días. Las colonias desarrolladas fueron aisladas y purificadas mediante cultivos monospóricos, siguiendo las indicaciones de Morales *et al.* (2020).

Isolation of *Fusarium* sp. from plant tissues.

Thirty bulbs were selected to be disinfested with tap water and sodium hypochlorite at 10%. Pieces of bulb were placed in wet chambers, using polyethylene boxes and moist filter paper; the polyethylene boxes were incubated at 28 °C for 10 days. After the incubation time, the dead bulb tissue was cut into 0.5 cm² sections, disinfested with sodium hypochlorite at 1.5% and washed three times with distilled water. They were dried using sterilized paper and finally planted in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA) at a temperature of 28 °C with ambient light for three days. The cultures developed were isolated and purified using monospore cultures, following indications by Morales *et al.* (2020).

Morphological characterization. The fungal cultures obtained were identified with an analysis of morphological characteristics related to the genus *Fusarium* with taxonomic identification keys by Barnett and Hunter (2006), in a microcultivation system under an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000x (Samson *et al.*, 2014). To evaluate the mycelial development, pieces of the promissory isolations were inoculated in Petri dishes with PDA, incubated in the dark at 28 °C for 10 days and the mycelial diameter was measured every 12 h to estimate the growth speed (cm), which was measured with the linear growth function $y=mx + b$ (where ‘y’ is the distance, ‘x’ is time and ‘b’ is the constant factor) and expressed in centimeters per day (cm d⁻¹) (Zeravakis *et al.*, 2001). The diameter was measured using a digital caliper (CD-6 Mitutoyo), always in the same direction—in triplicate—which was established at random for each repetition. Only the average was used to calculate the speed of mycelial growth per day.

Caracterización morfológica. La identificación de las colonias fúngicas obtenidas se realizó mediante el análisis de características morfológicas asociadas al género *Fusarium* con claves taxonómicas de identificación de Barnett y Hunter (2006), en un sistema de micro cultivo en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones (Samson *et al.*, 2014). Para la evaluación del desarrollo micelial, se inocularon fragmentos de los aislados promisorios en cajas Petri con PDA, se incubaron bajo oscuridad a 28 °C por 10 días y se midió el diámetro micelial cada 12 h para estimar la velocidad de crecimiento (cm), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal $y=mx + b$ (donde 'y' es la distancia, 'x' es el tiempo y 'b' el factor constante) y se expresó en centímetros por día (cm d^{-1}) (Zeravakis *et al.*, 2001). El diámetro se midió con un vernier digital (CD-6 Mitutoyo), siempre en la misma dirección -por triplicado-, la cual fue establecida al azar para cada repetición, se usó solo el promedio para calcular la velocidad de crecimiento micelial por día.

Identificación molecular. Se extrajo ADN de conidios, conidióforos y micelio de los aislados obtenidos con características morfológicas asociadas a *Fusarium*, mediante el método CTAB 2% (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018). El ADN se re-suspendió en 100 mL de agua HPLC estéril y se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop 2 000 C, Thermo Scientific). Posteriormente, se diluyó a 20 ng mL^{-1} y se almacenó a -20 °C. Para la amplificación se utilizó los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), y 15 μL de mezcla de reacción que contenían 0.18 μL de cada cebador, 0.18 μL de dNTP, 0.9 μL de ADN polimerasa GoTaqVR (Promega), 3 μL de suspensión de ADN y 10.56 μL de agua destilada. La amplificación se realizó en un termociclador de ADN Peltier (PTC-200, Bio-Rad), 95 °C por 1 min; 35 ciclos a 95 °C por 30 s; 55 °C por 1 min;

Molecular identification. DNA was extracted from conidia, conidiophores and mycelia from the isolations obtained with morphological characteristics related to *Fusarium*, using the CTAB 2% method (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018). The DNA was resuspended in 100 mL of sterilized HPLC water and quantified using spectrophotometry (Nanodrop 2 000 C, Thermo Scientific). Next, it was diluted to 20 ng mL^{-1} and stored at -20 °C. For the amplification, primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990) were used, along with 15 μL of the reaction mixture containing 0.18 μL of each primer, 0.18 μL of dNTP, 0.9 μL of GoTaqVR (Promega) polymerase DNA, 3 μL of DNA suspension and 10.56 μL of distilled water. Amplification was carried out in a Peltier (PTC-200, Bio-Rad) DNA thermocycler at 95 °C for 1 min; 35 cycles at 95 °C for 30 s; 55 °C for 1 min; an extension of 72 °C for 45 s; and finally, 72 °C for 5 min (Salazar-González *et al.*, 2016). The amplified PCR products were verified by electrophoresis in agarose gel at 1.5% (Seakem) and were purified with ExoSAP-IT (Affymetrix). Both chains were sequenced in the Colegio de Posgraduados with BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) in a 3 130 $\times\text{L}$ genetic analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the software Bioedit 7.0.4.1, following instructions by the manufacturer. The sequence obtained was deposited in the Gen Bank's National Center for Biological Information (NCBI) database and compared with five accessions (Table 1) available in the NCBI database to confirm its identity (Nei and Kumar, 2000).

In vitro pathogenicity tests. Koch's postulates were implemented to confirm the pathogenicity of *Fusarium* sp. Certified onion seeds of the variety Crystal white with a percentage of germination of 90% were used after disinfecting. Six seeds were placed in each Petri dish and after germinating,

extensión de 72 °C por 45 s; finalmente 72 °C por 5 min (Salazar-González *et al.*, 2016). Los productos de PCR amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Seakem) y se purificaron con ExoSAP-IT (Affymetrix); ambas cadenas se secuenciaron en el Colegio de posgraduados con BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador analizador genético 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el software Bioedit 7.0.4.1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) del Gen Bank, y se comparó con cinco accesos (Cuadro 1) disponibles en la base de datos del NCBI para corroborar su identidad (Nei y Kumar, 2000).

Pruebas de patogenicidad *in vitro*. Se implementaron los postulados de Koch para confirmar la patogenicidad de *Fusarium* sp. Se utilizaron semillas certificadas de cebolla variedad Crystal white con un porcentaje de germinación del 90%, las cuales fueron desinfectadas previo a su uso. Se colocaron seis semillas por caja Petri y una vez germinadas se colocaron discos de 5 mm de diámetro con micelio de *Fusarium* sp., en el centro de la caja Petri por triplicado con dos repeticiones; como grupo control se utilizó un disco de 5 mm de diámetro de agar-agua estéril. Las semillas se incubaron dentro de

discs, 5 mm in diameter with *Fusarium* sp. mycelia were placed in the center of the Petri dish, in triplicate with two repetitions; a disc, 5 mm in diameter with sterile agar-water was used as a control. The seeds were incubated inside a controlled-temperature (22 ± 2 °C) environmental chamber in complete darkness until 90% of the control group germinated. After this moment, a radicle length of over 5 mm was used as a germination criterion; the growth or elongation of the radicles were recorded in both groups (OECD, 1984; USEPA, 1996). The data recorded underwent the Shapiro and Wilk test of normality ($p < 0.05$) and were compared based on Student's *t* test for paired samples ($p < 0.05$) (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). Finally, small sections (approx. 1×1 cm) were taken from radicles with disease symptoms, sterilized on the surface with sodium hypochlorite at 1% for 10-30 s and rinsed three times with sterile distilled water for reisolation; the segments were then placed in a PDA medium and incubated in the dark at 28 °C for 10 days. Next, the isolation was observed under the optical microscope to confirm that it was strain CFbC using taxonomic identification keys (Barnett and Hunter, 2006).

Evaluation of the antagonism of *T. harzianum* with *Fusarium* sp. in dual culture. The evaluation of the antagonism was carried out using strain

Cuadro 1. Especies del complejo de *F. incarnatum-equiseti* y secuencias del GenBank para corroborar identidad de la cepa CFbC.
Table 1. Species of the *F. incarnatum-equiseti* complex and GenBank sequences to confirm the identity of strain CFbC.

No. Acceso	Complejo de especie	Lugar	Hospedante	Pb	Identidad
KP026922	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	USA	<i>Citrullus lanatus</i>	550	100%
HM999942	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	Ecuador	<i>Piper reticulatum</i>	519	100%
HQ625642	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	Nicaragua	<i>Phaseolus vulgaris</i>	399	100%
KX375792	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	Colombia	<i>Musa paradisiaca</i>	440	100%
KY461086	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	Brasil	<i>Schinus terebinthifolia</i>	363	100%

una cámara ambiental con temperatura controlada (22 ± 2 °C) y en total oscuridad, hasta que el 90% de las semillas del grupo control hubieran germinado. Después de ese periodo, se utilizó como criterio de germinación una longitud de radícula mayor de 5 mm, se registra el crecimiento o alargamiento de la radícula de ambos grupos (OECD, 1984; USEPA, 1996). Los datos registrados se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk ($p < 0.05$), así mismo, se compararon en base a la prueba *t* de student para muestras apareadas ($p < 0.05$) (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). Finalmente, se tomaron secciones pequeñas (aprox. 1×1 cm) de radículas con síntomas de enfermedad, se esterilizaron en la superficie con hipoclorito de sodio al 1% durante 10-30 s y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para el re-aislamiento, los segmentos fueron colocados en medio PDA, se incubaron bajo oscuridad a 28 °C por 10 días. Posteriormente el aislado se observó en el microscopio óptico para confirmar que se tratara de la cepa CFbC a través de claves taxonómicas de identificación (Barnett y Hunter, 2006).

Evaluación de antagonismo de *T. harzianum* ante *Fusarium* sp. en cultivos duales. La evaluación del antagonismo se realizó con la cepa T-H4 de *T. harzianum*, aislada de la raíz de *Persea americana*, cuya secuencia se incluyó en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MK779064.1, misma que está en el laboratorio de Eco-Campus Valsequillo, del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). Se utilizó la técnica de cultivo dual de acuerdo con Andrade-Hoyos *et al.* (2019) -por triplicado- para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial con la fórmula $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$ para cada ensayo evaluado por un lapso de 10 días. Los datos registrados se

T-H4 of *T. harzianum*, isolated from the root of *Persea americana*, the sequence of which was included in the data base of the National Center for Biological Information (NCBI) with accession number MK779064.1, which is in the laboratory of the Eco-Campus Valsequillo, of the Institute of Science, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). The dual culture technique was used, following Andrade-Hoyos *et al.* (2019) -in triplicate- to determine the percentage of radial growth inhibition with the formula $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$ for each trial evaluated for a 10-day period. The data recorded underwent the Shapiro Wilk test ($p < 0.05$) and compared based on Student's *t* test for paired samples ($p < 0.05$) in the IBM SPSS Statistics statistical package, version 25 (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). The experiment was performed twice for its validation. In order to complement the evidence of antagonism, each trial was compared and classified with the scale established by Bell *et al.* (1982): I) the growth of *T. harzianum* covered the entire surface of the medium and reduced the *Fusarium* sp. culture, II) the growth of *T. harzianum* covered at least two-thirds of the medium, III) *T. harzianum* and *Fusarium* sp. grew over 1/2 and 1/2 of the medium's surface, without superposing each other, IV) *Fusarium* sp. grew over at least 2/3 of the medium and resisted the invasion of *T. harzianum* and V) the growth of *Fusarium* sp. covered the entire surface of the medium.

Identification. Using the proposed isolation strategy, only one culture related to the genus *Fusarium* was obtained. Strain CFbC displayed a radial growth with a speed of growth of 0.5294 ± 0.0833 cm d⁻¹, a range which agrees with the study by Groenewald *et al.* (2006). The culture of strain CFbC was abundant aerial mycelia, initially white, but after maturing they turned slightly cinnamon-

sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk ($p < 0.05$), así mismo, se compararon en base a la prueba t de student para muestras apareadas ($p < 0.05$) en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25 (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). El experimento se repitió dos veces para su validación. Para complementar las evidencias del antagonismo, se comparó y clasificó cada ensayo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982): I) crecimiento de *T. harzianum* cubrió toda la superficie del medio y redujo la colonia de *Fusarium* sp., II) crecimiento de *T. harzianum* cubrió al menos 2/3 partes del medio, III) *T. harzianum* y *Fusarium* sp., crecieron 1/2 y 1/2 de la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro, IV) *Fusarium* sp., creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de *T. harzianum* y V) crecimiento de *Fusarium* sp., cubrió toda la superficie del medio.

Identificación. Utilizando la estrategia propuesta de aislamiento, sólo una colonia asociada al género *Fusarium* fue obtenida. La cepa CFbC se caracterizó por presentar un crecimiento radial con una velocidad de crecimiento de 0.5294 ± 0.0833 cm d⁻¹, rango que concuerda con el estudio de Groenewald *et al.* (2006). El aspecto de la colonia de la cepa CFbC fue abundante micelio aéreo, al principio de color blanco, pero al madurar se tornan ligeramente color café canela, al reverso de la placa, se muestra una coloración ligeramente naranja (Figura 1a y b). La cepa CFbC presentó hifas septadas, hialinas, macroconidios tabicados con cinco septos, falcados, con una curvatura distintiva de longitud de 60-120 μ m aprox. (Figura 1c), con pared gruesa que en su parte ventral se arquea ligeramente y en la parte dorsal se arquea abruptamente, con una célula basal en forma de pie y la parte apical filamentosa. Las características morfológicas mencionadas anteriormente, coincidieron con las descritas por Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium* sp.

brown, and on the reverse of the dish, a slightly orange color can be noticed (Figure 1a and b). Strain CFbC presented septated hyphae, hyalines, septated macroconidia with five septa, with a distinct curvature, a length of approximately 60-120 μ m (Figure 1c), with a thick wall, slightly arched in the ventral part, and abruptly arched in the dorsal part, with a foot-shaped basal cell and a filamentous apical section. The morphological characteristics mentioned above coincided with those described by Barnett and Hunter (2006), and Leslie and Summerell (2006) for *Fusarium* sp.

The amplification of the ribosomal ITS region gave a product of 533 pb of strain CFbC, which displayed an identity of 100% with the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (Table 1) according to the Gen Bank data base. This sequence was included in the NCBI data base with accession number MN612793.1.

Pathogenicity tests. Eight days after the *in vitro* inoculation with strain CFbC, all plants began showing symptoms, with a percentage of germination of 95%. The pathogenicity test results are shown in Figure 2, where a radicle growth below 5 mm (Figure 2a) is presented, along with apical strangulation, necrosis in the radicle (Figure 2b), and colonization in seedlings at the seed germination level in dishes with agar-water (Figure 2c), results which are positive for the inoculation of *Fusarium* sp. In seedlings used as controls, no symptoms were observed (Figure 2d), which proves Koch's postulates.

In the pathogenicity test, radicle growth decreased by 42.02%, displaying significant differences. Koch's postulates were confirmed with the re-isolation of *Fusarium* sp. from rhizomes of seedlings germinated 10 days after inoculation. This pathogen has been reported by Dauda *et al.* (2018), who first reported the regressive death of onion plants caused by *Fusarium equiseti* in Nigeria.

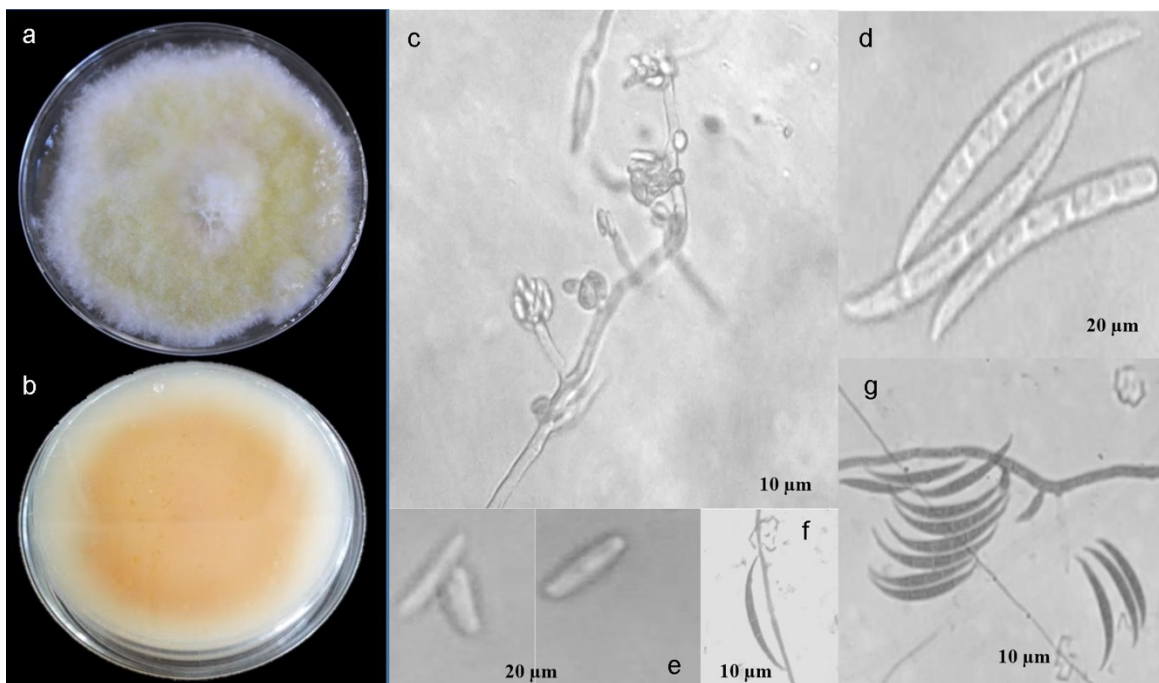


Figura 1. a) Colonia de *Fusarium* sp. en medio PDA, b) Reverso de colonia en PDA, coloración naranja, c) Monofialides cortas y microconidios agrupados en falsas cabezas, d) Macroconidios tabicados con cinco septos, e) Microconidias, f y g) Macroconidias con curvatura distintiva, 40 X.

Figure 1. a) Culture of *Fusarium* sp. in a PDA medium, b) Reverse of culture in PDA, orange coloring, c) Short monophyllids and microconidia grouped into false heads, d) Septated macroconidia with five septa, e) Microconidia, f and g) Macroconidia with distinctive curvatures, 40 X.

Con la amplificación de la región ITS ribosomal se obtuvo un producto de 533 pb de la cepa CFbC, que presentó 100% de identidad con el complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (Cuadro 1) de acuerdo con la base de datos del Gen Bank, esta secuencia se incluyó en la base de datos NCBI con el número de acceso MN612793.1.

Pruebas de patogenicidad. Ocho días después de la inoculación *in vitro* con la cepa CFbC todas las plantas comenzaron a mostrar síntomas, presentando un porcentaje de germinación del 95%. Los resultados de las pruebas de patogenicidad se presentan en la Figura 2, donde se observa un crecimiento radicular menor a 5 mm (Figura 2a), ahorcamiento

Evaluation of the antagonism of *T. harzianum* on *Fusarium* sp., in a dual culture. Areas of interaction were observed between *T. harzianum* (T-H4) and *Fusarium* sp. (CFbC), in the form of competition for space and nutrients. The reduction in the growth rate in dual cultures is an indicator of the antagonistic capacity of *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). In this study, the growth of *Fusarium* sp. in confrontation of strain T-H4 was clearly inhibited as of five day (Figure 3a). When evaluating the PICR, significant differences ($p \leq 0,0001$) were found in Student's *t* test, with a value of $t=92.57$. The PICR was 76.24% (Figure 4b), a value which falls into class II (Figure 4a) according to the scale established



Figura 2. Germinación de semillas inoculadas con *Fusarium* sp. a) Crecimiento raíz mínimo y necrosis, b) Ahorcamiento y necrosis, c) Colonización en parte apical, d) Testigo sin síntomas.

Figure 2. Germination of seeds inoculated with *Fusarium* sp. a) Minimal root growth and necrosis, b) Strangulation and necrosis, c) Colonization in the apex, d) Control without symptoms.

apical, necrosis en la radícula (Figura 2b), y colonización en las plántulas a nivel de germinación de semilla en placas con agar agua (Figura 2c), resultados positivos para la inoculación de *Fusarium* sp. En las plántulas empleadas como testigos no se observaron síntomas (Figura 2d), comprobando con ello los postulados de Koch.

En la prueba de patogenicidad, se observó una reducción del 42.02% en el crecimiento radicular, mostrando diferencias significativas. Los postulados de Koch se confirmaron mediante el re-aislamiento de *Fusarium* sp. de rizomas de plántulas germinadas a los 10 días pos-inoculación. Este patógeno ha sido reportado por Dauda *et al.* (2018) quienes realizaron un primer reporte sobre la enfermedad de muerte regresiva de la cebolla causada por *F. equiseti* en Nigeria.

Evaluación del antagonismo de *T. harzianum* sobre *Fusarium* sp., en cultivo dual. Se presentaron zonas de interacción entre *T. harzianum* (T-H4) y *Fusarium* sp. (CFbC), donde se observó competencia

by Bell *et al.* (1982). Michel-Aceves *et al.* (2005) report an inhibition of 73% in radicle growth when evaluating the antagonistic effect of native isolations of *Trichoderma* spp. on the growth of *F. subglutinans*, similar to the results of this study. On the other hand, Jagraj *et al.* (2018) reported 75.9% for *F. oxysporum* against *T. harzianum*, higher than *T. viride* and *T. koningii*, with 67.7 and 55.6% respectively for strains isolated from tomato plants.

Reyes *et al.* (2008) noted that one of the significant characteristics of *Trichoderma* is its high growth rate, and the secretion of secondary metabolites of a different nature, which slow down the growth rates of other competitors. In addition, mycoparasitism is another action mechanism of the genus *Trichoderma*. In this case, swellings were observed in macroconidia and hyphae, as well as the breaking of septum, the presence of granulations and the vacuolization of hyphae by *T. harzianum* (Figure 4b), reaffirming the high mycoparasitic capacity of strain T-H4. Duarte-Leal *et al.* (2018) observed mycoparasitism between the

de espacio y nutrientes. La reducción en la tasa de crecimiento en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagonista de *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). En el presente estudio, el crecimiento de *Fusarium* sp. en confrontación con la cepa T-H4 fue claramente inhibido a partir del día 5 (Figura 3a). Al evaluar el PICR se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,0001$) en la prueba de *t* de student, con un valor de $t = 92.57$. El PICR fue de 76.24% (Figura 4b), valor que se clasifica en la clase II (Figura 4a) de acuerdo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982). Michel-Aceves *et al.* (2005), reportan el 73% de inhibición de crecimiento radicular al evaluar el efecto antagonista de aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *F. subglutinans*, resultados similares en el presente estudio. Por otro lado, Jagraj *et al.* (2018) reportan un valor de 75.9% para *F. oxysporum*

hyphae of *T. asperellum* (Ta.25), where it penetrated and caused the lysis of the hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50), as reported in the present investigation. The results confirmed the notifications by González *et al.* (2012) and Hyder *et al.* (2017) regarding the enzymatic degradation of the cell wall of the phytopathogenic fungi during the mycoparasitic action, which causes lysis and thus the disorganization of the cytoplasmic content which, according to these authors, is related to the action of the enzymes chitinase, β -1,3-glucanases, β -1,6-glucanases, α -1,3-glucanases and proteases excreted by *Trichoderma* spp. Additionally, León *et al.* (2012) observed strangulation and the lysis of the walls of the hyphae, followed by a disintegration and degradation of the cell walls of *Fusarium* sp. when confronting strains *Tb111* and *Tc241* of *Trichoderma* spp.

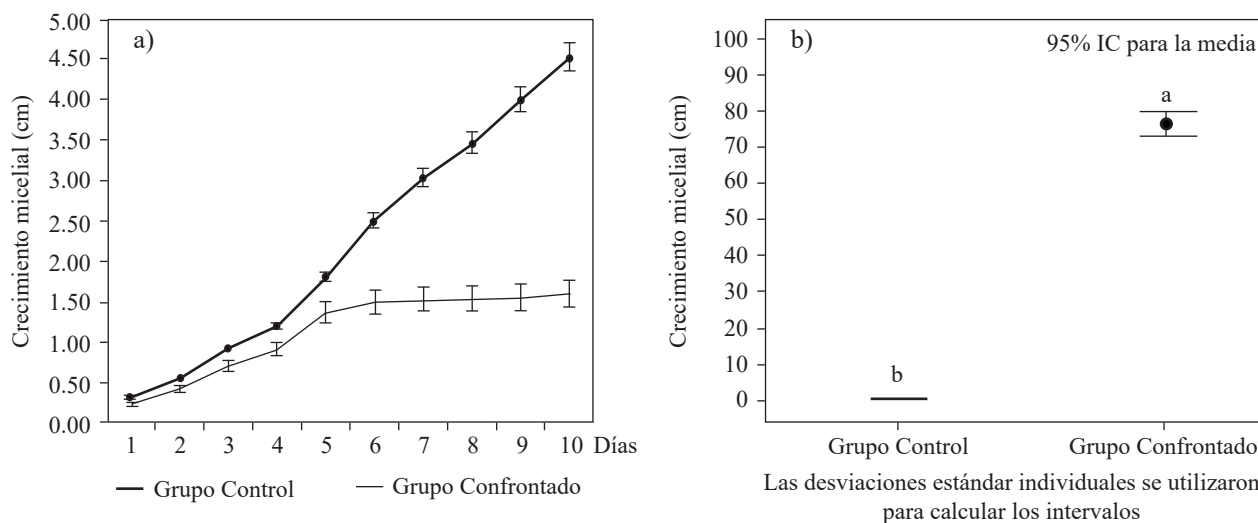


Figura 3. Comparación del crecimiento micelial y PICR. a) Crecimiento de *Fusarium* sp. en presencia y ausencia de *T. harzianum* b) Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *Fusarium* sp. a 10 días de la inoculación en presencia y ausencia de *T. harzianum*. *Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de *t* de student ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Comparison of mycelial growth and PICR. a) Growth of *Fusarium* sp. in the presence and absence of *T. harzianum* b) Percentage of inhibition of radial growth (PICR) of *Fusarium* sp. 10 days after inoculation in the presence and absence of *T. harzianum*. *Means with different letters indicate significant differences with the Student's *t* test ($p \leq 0.05$).

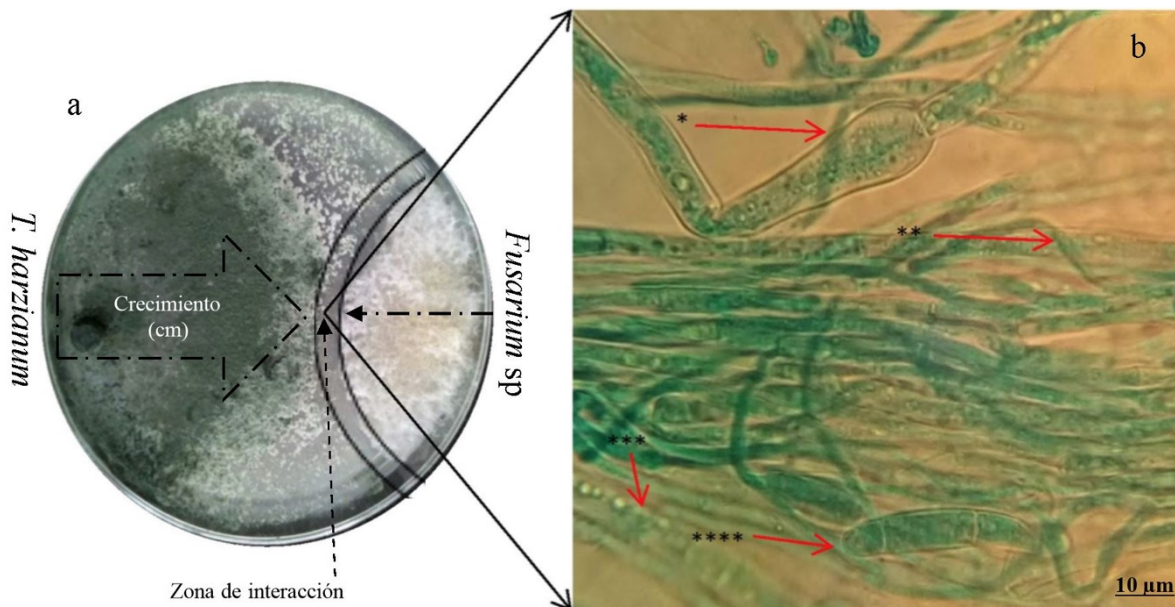


Figura 4. a) Antagonismo de la cepa T-H4 de *T. harzianum* frente a *Fusarium sp.*, donde se observa una clase II en la escala de Bell *et al.* (1982), b) Micoparasitismo de *T. harzianum* sobre las hifas y conidios de *Fusarium sp.*, * hinchamiento de hifa, ** enrollamiento de hifa, *** granulaciones dentro de hifa, **** hinchamiento de macroconidio.

Figure 4. a) Antagonism of strain T-H4 of *T. harzianum* against *Fusarium sp.*, showing type II in the scale by Bell *et al.* (1982), b) Mycoparasitism of *T. harzianum* on the hyphae and conidia of *Fusarium sp.*, * swelling of the hypha, ** curling of the hypha, *** granulations inside the hypha, **** swelling of the macroconidia.

frente a *T. harzianum*, mayor a *T. viride* y *T. koningii* con 67.7 y 55.6% respectivamente, esto para cepas aisladas de plantas de jitomate.

Reyes *et al.* (2008), notificaron que una de las características significativas de *Trichoderma* es su elevada velocidad de crecimiento, y la secreción de metabolitos secundarios de diferente naturaleza, que frenan el crecimiento de otros competidores. Asimismo, el micoparasitismo es otro de los mecanismos de acción del género *Trichoderma*. En este caso se logró observar hinchamientos en macroconidias e hifas, así como ruptura de septos, presencia de granulaciones y vacuolización de hifas por *T. harzianum* (Figura 4b), esto reafirma la elevada capacidad micoparasítica de la cepa T-H4. Duarte-Leal *et al.* (2018) observaron micoparasitismo entre hifas de *T. asperellum* (Ta.25), donde penetró y causó lisis en hifas de *Fusarium oxysporum* f.

The hyphal interactions that intervene in the parasitism are measured by the enzymatic activity of the antagonist, which allows the penetration, deformation, disintegration and death of the hyphae of the pathogen (León *et al.*, 2012), and therefore the strains with a high enzymatic potential tend to have a greater mycoparasitic effect (González *et al.*, 2012); herein lies the importance of the selection of strains with various types of hyphal interactions.

Antagonism tests reflect the capacity and genetic variability of the antagonist and the phytopathogen to resist antagonism and perform a preliminary selection of the most efficient antagonistic strains to be evaluated under field conditions, as well as to complement and determine its ability exercised for the biocontrol (Morales *et al.*, 2020).

Fusarium sp. was identified as being related to basal rot in bulbs from onions (*Allium cepa*) of the

sp. *ciceri* (F-50) como lo reportado en la presente investigación. Los resultados corroboraron lo notificado por González *et al.* (2012) y Hyder *et al.* (2017), sobre la degradación enzimática de la pared celular de los hongos fitopatogénicos durante la acción micoparasítica, que causa lisis y con ello la desorganización del contenido citoplasmático que, según estos autores, está relacionada con la acción de las enzimas quitinasas, β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, α -1,3-glucanasas y proteasas excretadas por *Trichoderma* spp. Además, León *et al.* (2012) observaron presencia de estrangulamiento y lisis de las paredes de las hifas, seguidas de una desintegración y degradación de las paredes celulares de *Fusarium* sp., al enfrentarse a las cepas Tb111 y Tc241 de *Trichoderma* spp.

Las interacciones hifales que intervienen en el parasitismo son mediadas por la actividad enzimática del antagonista, que permite la penetración, deformación, desintegración y muerte de las hifas del patógeno (León *et al.*, 2012), por lo que aquellas cepas que exhiben un alto potencial enzimático tienden a poseer un mayor efecto micoparasítico (González *et al.*, 2012); de ahí la importancia de la selección de cepas con varios tipos de interacciones hifales.

Las pruebas de antagonismo reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista y del fitopatógeno para resistir el antagonismo y realizar una selección preliminar de las cepas antagónicas más eficientes para ser evaluadas en condiciones de campo, así como para complementar y determinar su capacidad biocontroladora (Morales *et al.*, 2020).

Se logró identificar a *Fusarium* sp. asociado a la podredumbre basal, proveniente de bulbos del cultivo de cebolla (*Allium cepa*) variedad Crystal white, ubicada en La Soledad, perteneciente al municipio de Chietla del estado de Puebla, México. La cepa de *T. harzianum* T-H4 mostró adecuada

Crystal white variety, found in La Soledad, which belongs to the municipal area of Chietla, in the state of Puebla, Mexico. The *T. harzianum* strain T-H4 displayed an adequate antagonistic ability *in vitro* against *Fusarium* sp., with a PICR of 76.24%. It is necessary to verify the antagonistic capacity of *T. harzianum* T-H4 in the field against strain CFbC as well as its identification with the elongation factor of translation (EF1 α) in order to recommend its use as an alternative for the onion farmers of the area.

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

capacidad antagónica *in vitro* frente a *Fusarium* sp., con un PICR de 76.24%. Es necesario verificar en campo la capacidad antagonista de *T. harzianum* T-H4 frente a la cepa CFbC, así como su identificación por el factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), para así recomendar su uso como alternativa a los productores de cebolla de la región.

## LITERATURA CITADA

- Abdalla SA, Abdelkhalek AA, Khaled AE, Abdelsalam NR and Hafez EE. 2019. Screening of fungal diseases infecting onion plants in Lower Egypt. Middle East Journal of Agriculture Research 8 (1): 200-210. <http://www.cu-rresweb.com/mejar/mejar/2019/200-210.pdf>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Hernández EO, Gayosso EM, Valenzuela NL and Cureño HJB. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV and Romero-Arenas O. 2020. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado. Plants e1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>
- Barnett HL and Hunter BB. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. USA. 241 p.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>

- Dauda WP, Alao SEL, Zarafi AB and Alabi O. 2018. First report of die-back disease of onion (*Allium cepa* L.) induced by *Fusarium equiseti* (Mart) Sacc in Nigeria. International Journal of Plant and Soil Science 21(3): 2320-7035. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2018/38339>
- Duarte-Leal Y, Pozo-Martínez L and Martínez-Coca B. 2018. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt and Nirenberg frente aislados de *Fusarium* spp. Revista de Protección Vegetal 33(1): 1-10. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S1010-27522018000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&id=S1010-27522018000100005)
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2020. Agriculture production and Trade Statistics. In Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Gan and Wickings K. 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. Agriculture, Ecosystems and Environment 246: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.014>
- García E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de geografía. Universidad Autónoma de México. México. 170 p.
- González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I and Peteira B. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. Biotecnología Aplicada 29(1): 12-16. <https://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2012/ba121b.pdf>
- Groenewald S, Van den Berg N, Marasas WF and Viljoen A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Australasian Plant Pathology 35(4): 1-40. <https://doi.org/10.1071/AP06041>
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Roucco M, Lanzuise S, Woo S and Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28(2): 87-9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61218468002>
- Haapalainen M, Latvala S, Kuivainen E, Qiu Y, Segerstedt M and Hannukkala AO. 2016. *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. Plant Pathology 65(8): 1310-1320. <https://doi:10.1111/ppa.12521>
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R and Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences 35(1): 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hyder S, Inam-ul-Haq M, Bibi S, Humayun A, Ghuffar S and Iqbal S. 2017. Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent. Journal of Entomology and Zoology Studies 5(4): 214-222. <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartC/5-3-244-140.pdf>
- Iturbide-Zuñiga AS, Colinas-León MTB, Lozoya-Saldaña H, Medina-Moreno SA and Ayala-Arreola J. 2017. Evaluación *in vitro* de extractos del género *Lilium* para el control de *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 611-622. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1609-6>
- Jagraj S, Kumar V, Srivastava S, Kumar A and Singh VP. 2018. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing Tomato wilt. Plant Pathology Journal 17(2): 59-64. <https://doi.org/10.3923/ppj.2018.59.64>
- Ji SH, Kim TK, Keum YS and Chun SC. 2018. The major post-harvest disease of onion and its control with Thymol fumigation during Low Temperature Storage. Mycobiology 46(3): 242-253. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1505245>
- Joaher DT, Aumeeruddy M, Zakariyyah TZ, Gokhan Z, Kannan RR, Shunmugiah KP and Mahomoodally MF. 2019. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review, Critical Reviews. Food Science and Nutrition 59 (sup1): S39-S70. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1499074>
- Kiehr M and Delhey R. 2015. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano, Argentina, 2005, p. HV13. Ciudad General Roca, Argentina.
- León RA, Pino SC, Martínez B, Liriano R and Núñez DB. 2012. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* y su efecto antagonista frente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. Centro Agrícola 39(2): 43-48. <http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/html/v39n2/body/cag08212.htm>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. 387 p.
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Darío R, Rebollo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R and Ariza-Flores R. 2005. Actividad micoparasítica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) P. E. Nelson, T. A. Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr. Revista Mexicana de Fitopatología 23(3): 253-261. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/FullTextPDF/2007/20073103350.pdf>
- Montes-Belmont R, Nava-Juárez RA, Flores-Moctezuma HE and Mundo-Ocampo M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 300-304. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221309>
- Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia de Ita, MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2019. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. Revista Mexicana de Fitopatología 38(3): 434-449. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-7>
- Nawrocka J, Szczech M and Malolepsza U. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. Plant Protection Science 54(1): 17-23. <https://doi:10.17221/126/2016-PPS>
- Nei M and Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. USA. 352 p.
- Organization of Economical Co-operation and Development (OECD). 1984. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 15 p.

- Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S and Montegudo-Hernández O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30(1): 17-26. <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2707/1690>
- Reyes Y, Martínez B and Infante D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista Protección Vegetal* 23(2): 112-117. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99652008000300010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000300010&lng=en&tlng=es).
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-de-los-Santos G, Vaquera-Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress* 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>
- Romero-Arenas O, Amaro LJ, Damián HM, Valencia de Ita MA, Rivera A and Huerta LM. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *ITEA* 113(4): 313-324. <http://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Salazar-González C, Serna-Cock L and Gómez-López E. 2016. Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana* 27(2): 277-285. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Samson RA, Visagie CM and Houbraken J. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sanogo S and Zhang J. 2015. Resistance sources, resistance screening techniques and disease management for *Fusarium* wilt in cotton. *Euphytica* 207(2): 255-271. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1532-y>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2020. Atlas Agroalimentario. 1080-2020.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. USEPA 712-C-96-154; OPPTS 850.4200. 17 pp.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press 38: 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zeravakis G, Philippoussis A, Ioannidou S and Diamantopoulou P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia microbiológica* 46(3): 231e. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>