



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE *Trichoderma* EN EL
AGROECOSISTEMA CACAO (*Theobroma cacao*) EN
TABASCO Y EL NORTE DE CHIAPAS, MÉXICO.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

INGENIERO AGRÍCOLA

Presenta:

Héctor Osvaldo Ahedo Quero

Asesores: **Dr. Magdiel Torre de la Cruz.**

Dr. Carlos Fredy Gómez Ortiz.

Coasesor: **M.C. Oscar Horacio Guillén Ayala.**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

"Contribución al estudio de Trichoderma en el agroecosistema cacao (Theobroma cacao) en Tabasco y el Norte de Chiapas, México"

Que presenta el pasante: **HECTOR OSVALDO AHEDO QUERO**
Con número de cuenta: **40804979-5** para obtener el Título de: Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Ing. Juana Vázquez Robles	
VOCAL	Dr. Sergio Jiménez Ambríz	
SECRETARIO	M.C. Oscar Horacio Guillén Ayala	
1er SUPLENTE	Ing. Ángel Cipriano López Cortés	
2do SUPLENTE	M.C. Judith Hernández Alfonsina	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/yrf

Este trabajo va dirigida a mi familia Edgar, Bacilides, Dalia y Alex quienes siempre han apoyado mis sueños y deseos, quienes han estado en todo momento en este largo y sinuoso camino, a ellos que nunca dejaron de creer en mí aun cuando me encontraba vencido....

ÍNDICE

	Página
I. Índice de cuadros	
II. Índice de imágenes	
III. Índice de figuras	
1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS	12
3. HIPÓTESIS	13
4. REVISIÓN DE LITERATURA	14
4.1.El cacao, origen e importancia	14
4.2.Clasificación taxonómica del cacao	16
4.3.Limitantes fitosanitarias del cacao en Tabasco y Chiapas	17
4.4.Importancia económica de la moniliasis	18
4.5.Control biológico	19
4.6.Organismos útiles para el control biológico de fitopatógenos	20
4.7. <i>Trichoderma</i> spp	22
4.7.1. - Importancia	22
4.7.2.- Distribución de <i>Trichoderma</i> spp	25
4.7.3.- Clasificación de <i>Trichoderma</i> spp	27
4.7.4.- Morfología de <i>Trichoderma</i> spp	28
4.7.5.- Características de las colonias de <i>Trichoderma</i> spp	29
4.7.6.- Identificación de <i>Trichoderma</i> spp	30
4.7.6.1.- Identificación morfológica	30

4.7.6.2.- Identificación por métodos moleculares	31
5. METODOLOGÍA	33
5.1.Área de estudio	33
5.2.Colecta de muestras	35
5.3.Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp	37
5.4.Identificación morfológica	38
5.5.Identificación molecular	40
5.6.Análisis de secuencias	40
6. RESULTADOS	41
6.1.Obtención de especies nativas de <i>Trichoderma</i> spp	41
6.2.Descripción de las especies de <i>Trichoderma</i> spp encontradas en las áreas de muestreo de Tabasco y Chiapas México	44
6.2.1. <i>Trichoderma hamatum</i>	44
6.2.2. <i>Trichoderma koningii</i>	45
6.2.3. <i>Trichoderma harzianum</i>	46
6.2.4. <i>Trichoderma brevicompactum</i>	47
6.2.5. <i>Trichoderma virens</i>	48
6.2.6. <i>Trichoderma longibracheatum</i>	49
6.2.7. <i>Trichoderma asperellum</i>	50

6.3.Distribución de <i>Trichoderma</i> spp	51
6.4.Medición de la biodiversidad	52
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	56
9. RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen		Página
1	Penetración de haustorio y formación de la hifa de <i>Trichoderma virens</i> a lo largo de hifa de <i>Rhizoctonia</i> sp	24
2	<i>Trichoderma</i> spp, estructuras	28
3	Diferencia en colonias de <i>Trichoderma</i> spp	29
4	Morfología de <i>Trichoderma</i> spp	30
5	Región en la cual se llevó acabo la toma de muestras	33
6	Preparación de equipo para el muestreo	36
7	Imagen de mazorca de cacao infectada	36
8	Homogenización de suelo	37
9	Dilución en placa	38
10	Microscopio y preparados	39
11	Estructuras de <i>Trichoderma</i> spp	39
12	<i>Trichoderma hamatum</i>	44
13	<i>Trichoderma koningii</i>	45
14	<i>Trichoderma harzianum</i>	46
15	<i>Trichoderma berricompactum</i>	47
16	<i>Trichoderma virens</i>	48
17	<i>Trichoderma longibracheatum</i>	49
18	<i>Trichoderma asperellum</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Producción de cacao en grano por municipio en Tabasco, México, 2009</i>	15
2	<i>Producción de cacao en grano por municipio en Chiapas, México, 2009</i>	15

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Lugares de muestreo donde se aislaron las cepas de <i>Trichoderma</i> spp	34
2	Especies a las cuales pertenecen los aislamientos en áreas de muestreo.	42
3	Referencia con la cual se presentó la secuencia en las bases de datos de Trichokey	43
4	Diversidad y abundancia de especies en Jalapa de Méndez	51
5	Diversidad y abundancia de especies en H. Cárdenas	51
6	Diversidad y abundancia de especies en Pichucalco	51
7	Diversidad y abundancia de especies en Comalcalco	51

1. INTRODUCCIÓN.

Los cacaotales (plantaciones de cacao), se caracterizan por ser agroecosistemas arbolados de sombra, que forman un paisaje heterogéneo por la riqueza florística a ellos asociada. Por las condiciones climáticas donde se cultiva y por establecerse bajo un dosel diversificado en especies de sombra, este agroecosistema tiene similitud con las selvas tropicales (Greenberg *et al.*, 2000 y Pérez-de la Cruz *et al.*, 2009). Ecológicamente, este agroecosistema es un elemento determinante en el mantenimiento del equilibrio ambiental.

Las plantaciones de cacao en Tabasco y Chiapas forman un ecosistema altamente favorable para el desarrollo de las enfermedades fungosas las cuales forman parte de los factores limitantes de la producción (Torre de la cruz, 2011). Hasta el año 2005, la enfermedad del cacao más importante en Tabasco y Chiapas era la mancha negra causada por *Phytophthora capsici* (Ortiz, 1996). En Marzo del 2005 se reporto por primera vez en Chiapas la moniliasis del cacao (MC) en la ranchería Ignacio Zaragoza, Municipio de Pichucalco, al norte del estado (Phillips-Mora *et al.*, 2006).

La presencia de la moniliasis representa una amenaza muy seria. La monilia o pudrición de la mazorca por *Moniliophthora roreri*, es un hongo que ataca directamente al grano dentro de la mazorca ocasionando su pudrición. Los frutos jóvenes en desarrollo son los más susceptibles.

En la búsqueda de métodos de control sobre la MC en Tabasco, Torres-de la Cruz *et al.* (2011) han demostrado la eficiencia de acciones integradas de manejo con *Trichoderma* sp junto con acciones culturales y químicas. Krauss y Soberanis

(2001) mencionan que el control biológico ofrece potencial en el manejo sostenible de esta enfermedad mediante el uso de antagonistas, donde especies del género *Trichoderma* han mostrado potencial sobre *Moniliophthora roreri* (Phillips-Mora, 2004; Krauss *et al.*, 2006); sin embargo, este método de control no ha sido explorado contra *Moniliophthora roreri* en las entidades mencionadas. De acuerdo con De Bach (1969) una de las estrategias básicas en control biológico es la exploración inicial de los enemigos naturales nativos antes de introducir cepas exóticas. *Trichoderma* spp ha tenido resultados positivos en el control de diferentes fitopatógenos. Sin embargo en el estado de Tabasco se carece de estudios sobre la diversidad de *Trichoderma* spp en las plantaciones de cacao, que puedan ser utilizadas en pruebas de control biológico de *M. roreri*.

Los estudios de diversidad realizados en plantaciones de cacao en la entidad, están relacionados a la vegetación, aves e insectos (Greenberg *et al.*, 2000; Córdova *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2005; Pérez-de la Cruz *et al.*, 2009); sin embargo, la diversidad de hongos ha sido poco estudiada.

Es por esto que el presente trabajo está enfocado al estudio del género *Trichoderma* en cuanto a características y diversidad se refiere y obtener especies del género *Trichoderma* en Tabasco y norte de Chiapas que nos permitan en un futuro tener organismos que sean útiles para el control biológico.

2. OBJETIVOS

General:

- Conocer la diversidad de las cepas de *Trichoderma* spp que se presenten en los suelos de Tabasco y norte de Chiapas.

Particular:

- Aislar cepas de *Trichoderma* spp presentes en suelos de plantaciones de cacao en Tabasco y norte de Chiapas, México.
- Identificación morfológica y molecular de las especies de *Trichoderma* spp presentes en suelos de plantaciones de cacao en el estado de Tabasco y Norte de Chiapas, México.

3. HIPÓTESIS.

- La identificación morfológica y molecular de las especies de *Trichoderma* spp encontradas en suelo nos presentará una diversidad de especies en el cultivo del cacao.
- En los suelos de plantaciones de cacao de Tabasco y Chiapas, existen diferentes especies del género *Trichoderma* spp.

4. REVISIÓN DE LITERATURA.

4.1. El cacao, origen e importancia.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol tropical de la familia Sterculiaceae que forma parte de los recursos florísticos de la cuenca amazónica (Whitlock *et al.*, 2001), de las regiones donde confluyen los ríos Orinoco y Amazonas en la vertiente Atlántica de los Andes (Rangel, 1982). El cacao se cultivó exclusivamente en el continente Americano hasta 1890, cuando comenzó a plantarse en el continente Africano (Ogata, 2007), y en la actualidad, los países africanos obtienen los mayores volúmenes de producción de grano (Cueto *et al.*, 2007).

Según datos estadísticos de la FAO (2009) se cosecharon 8 733 093 ha de cacao en el mundo, con una producción de 4 082 270 ton. Costa de Marfil es el principal productor, con una producción total de 1 221 600 ton en una superficie de 2 000 000 ha y un rendimiento de 610.8 kg ha⁻¹. En América, el principal productor es Brasil con una producción de 218 487 ton en una superficie de 635 975 ha, y un rendimiento de 343.5 kg ha⁻¹. México ocupa el décimo tercer lugar a nivel mundial con una producción de 22 661 ton en una superficie de 61 317 ha, con un rendimiento de 369.5 kg ha⁻¹. En México, la producción de cacao se encuentra concentrada en tan solo cuatro estados: Tabasco (70%), Chiapas (29%), Oaxaca y Guerrero (1.0%). En Tabasco, el cacao es uno de los principales recursos agrícolas. Se cultiva en 41 024. 58 ha, distribuidas en diez municipios y una producción de 39 320. 45 toneladas (**Figura 1**).

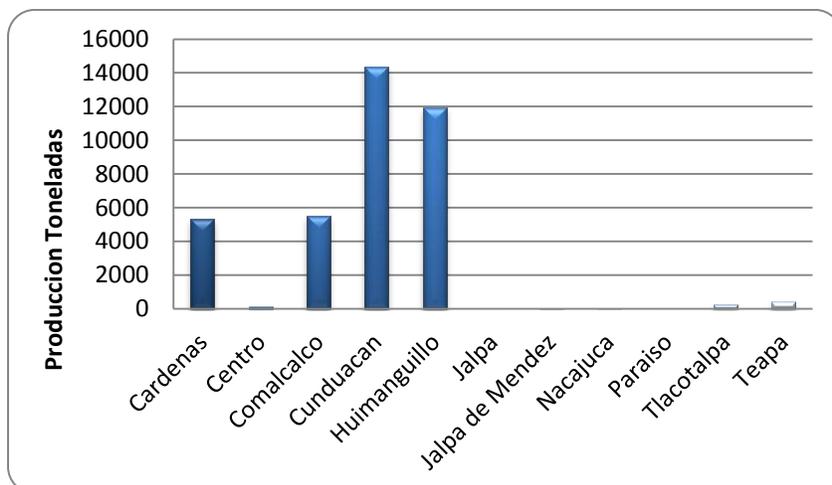
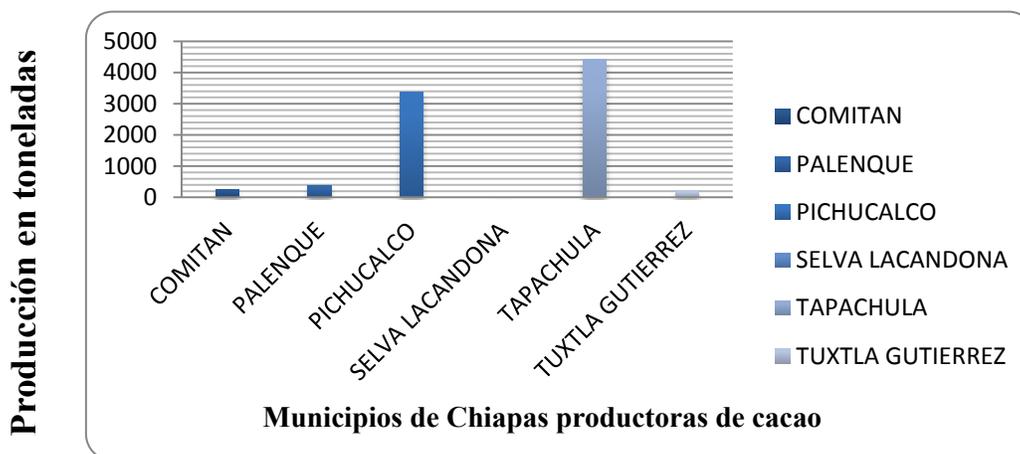


Figura 1. Producción de cacao en grano por municipio en Tabasco, México, 2009. Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (2009).

En Chiapas se tienen 20 057.67 ha sembradas las cuales se distribuyen en 6 municipios (OEIDRUS, 2009) (**Figura 2**).



2. Figura Producción de cacao en grano por municipio en Chiapas, México, 2009. Fuente: OIEDRUS (2009)

El cacao en Tabasco y Chiapas es catalogado como un cultivo tradicional, de subsistencia familiar y altamente diversificado (Scherr, 1983). A lo largo de su historia en las entidades, en donde diversos factores han propiciado su crisis, el

cultivo de cacao ha permanecido como una opción económica regional y ha mantenido su importancia aun cuando se han introducido otros cultivos rentables como caña de azúcar, plátano, entre otros y actividades económicas sustantivas como la ganadería y la explotación petrolera (Scherr, 1983). Económicamente el sector cacaotero representa el 18.1% respecto al valor que aporta el sector agropecuario al PIB del Estado de Tabasco.

4.2. Clasificación taxonómica del cacao.

Inicialmente, Linneo en 1753, ubicó el género *Theobroma* en la familia Tiliaceae. Después consideró que podría ser incluida en la familia *Sterculiaceae*, clasificación aceptada hasta nuestros días. *Theobroma cacao* (*T. cacao*) es una de las 22 especies del género *Theobroma* (Hardy, 1960) y de acuerdo con Font Quer (1974), la clasificación taxonómica de *T. cacao* L. es la siguiente:

División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Dilleniida
Orden: Malvales
Suborden: Malvina
Familia: Sterculiaceae
Género: *Theobroma*
Especie: *cacao*

De la especie *T. cacao* se han descrito dos subespecies: *T. cacao cacao*, la cual presenta frutos alargados con surcos pronunciados y granos blancos (cacao criollo) y *T. cacao sphaerocarpum* la cual presenta frutos redondeados con surcos escasamente evidentes y granos de color púrpura (cacao forastero) (Cheesman, 1944); sin embargo, la clasificación cualitativa de *T. cacao* en dos subespecies no se apoya en bases genéticas (Motamayor *et al.*, 2002).

4.3 Limitantes fitosanitarias del cacao en Tabasco y Chiapas.

El cacao es un agroecosistema altamente favorable para el desarrollo de las enfermedades fungosas (Fulton, 1989). La enfermedad con mayor distribución es la mancha negra causada por *Phytophthora* spp. la cual se encuentra en todos los países productores (Gregory, 1974 y Ortiz, 1996). Otra enfermedad restrictiva es la escoba de bruja, causada por *Crinipellis pernicioso* (Aimé y Phillips-Mora, 2005), la cual se considera una de las enfermedades más destructivas del cacao, causando pérdidas que varían del 50 al 80% de la producción potencial en Sudamérica (Rugard *et al.*, 1993). La moniliasis del cacao, causada por *Moniliophthora roreri* es otra de las enfermedades importantes del cacao (Phillips-Mora, 2004). Mal del machete o marchitez es causada por *Ceratocystis fimbriata*, la cual puede ser transmitida por insectos, pero la transmisión mecánica es más importante (Thurston, 1998).

De las enfermedades anteriormente mencionadas, aquellas causadas por *Phytophthora palmivora* Butl. y *Phytophthora capsici* (mancha negra), *C. pernicioso* (escoba de bruja) y *M. roreri*, (moniliasis) son las enfermedades más importantes que limitan la producción de cacao en América y en los estados de Tabasco y Chiapas (Leach *et al.*, 2002).

4.4 Importancia económica de la moniliasis.

La moniliasis, causada por *M. roreri*, es una de las enfermedades más destructivas del cacao (Phillips-Mora, 2004). Ha sido reportada como dos veces más destructiva que la causada por *Phytophthora* spp. (Desrosiers y Díaz, 1957) y

más dañina y difícil de controlar que la enfermedad escoba de la bruja (Aránzazu, 2000), debido a que el primer síntoma de infección es a menudo la ocurrencia de lesiones con abundante esporulación externa que facilita su dispersión (Maddison *et al.*, 1995). Las pérdidas son altamente variables, desde un 10 a un 100% (Rorer, 1926; Katip, 1994), y dependen de factores como el tiempo de que la enfermedad esté presente en el sitio o parcela, edad de la plantación, manejo del cultivo y de la enfermedad, presencia de plantaciones colindantes afectadas y condiciones ambientales (Phillips-Mora *et al.*, 2006). Pérdidas mayores al 30% y al 90% se han reportado bajo condiciones favorables, lo que en algunos países ha conducido al total abandono de las plantaciones (Krauss y Soberanis, 2001; Enríquez *et al.*, 1982). En Venezuela se distribuye en los estados de Táchira, Mérida, Apure y Barinas, entidades en las cuales ocasionan pérdidas de cosechas que oscilan entre 20 y 80% de la producción (Sánchez *et al.*, 2003). En los años 1979 y 1980 se reporta en Costa Rica el impacto de la MC del cacao con pérdidas del 80 y 90% (Sánchez y Porrás, 1991) en donde existía una producción cerca de 40 mil toneladas métricas con una reducción del 60% a causa de la enfermedad (Sánchez, 1982). En Ecuador y Colombia se ha informado sobre pérdidas que van desde el 16 hasta el 80% y aún más, con promedios que fluctúan del 20 al 30% anual (Enríque, 2004). De acuerdo con Torres de la Cruz *et al.*, (2011), en Tabasco y Chiapas, las pérdidas por moniliasis superan el 75 % y pueden alcanzar el 100% en plantaciones abandonadas. En un período de cuatro años (2007-2011) la disminución fue del 32.1% de la producción nacional, por lo que bajó de 36 400 ton (toneladas) de grano seco en 2005, a 24 700 ton en 2009.

Antes la media de producción anual era de 500 Kg ha⁻¹ y a partir de ésta fecha ha

disminuido a 200 Kg ha⁻¹. En algunas fincas donde empezó la monilia, el rendimiento promedio actual es de 20-30 Kg ha⁻¹

4.5 Control biológico.

El control biológico es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos plaga. Una plaga es cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano. Actualmente el control biológico es una opción para el control de muchas plagas y enfermedades, siendo una opción favorable y hasta cierto punto natural de ofrecer al mercado productos libres de pesticidas y al mismo tiempo una mejor economía al productor. (Hajek, 2004).

El control biológico se basa en la inserción de algún ser vivo antagonista de la plaga o enfermedad con el cual contamos. El estudio del control biológico clásico se basa en la búsqueda de los enemigos naturales de las plagas o enfermedades que puede suscitarse en la región durante ciertos ciclos, para esto es importante identificar cuáles son los factores que limitan a la población de enemigos naturales o que influyen de manera negativa su acción reguladora y de este modo manipular su hábitat en consecuencia.

Trichoderma spp ha sido una opción de control biológico en diferentes partes del mundo por su diversidad y adaptación se ha presentado en diversos suelos; no sólo su capacidad como biocontrolador sino también su capacidad para mejorar el crecimiento radicular y mejorar la resistencia a ciertas enfermedades han hecho de este hongo un buen objeto de estudio.

El control biológico con *Trichoderma* spp. se ha hecho notar a lo largo de estos

últimos 30 años con el nacimiento la agricultura orgánica así también con la finalidad de utilizar menos pesticidas agrícolas ya que estos son riesgosos para la salud humana (Plengue-Tellechea., *et al.* 2007)

Trichoderma ha generado excelentes resultados *in vitro* así como en campo dentro de ellos tenemos los ejemplos de Humeres (2004), quien evaluó *in vitro* la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. sobre aislados de hongos Basidiomicetes asociados a la muerte de brazos en kiwi y donde obtuvo excelentes resultados con una de las cepas de *Trichoderma* spp.

Jiménez (2012) utilizó *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningiopsis* bajo condiciones de campo con lo que pudo obtener un mayor rendimiento y menor incidencia de la enfermedad de la pudrición blanca en ajo ocasionada por *Sclerotium cepivorum* Berk.

En cuanto respecta al cacao, tenemos el ejemplo de Rivas., *et al.* (2010) quien evaluó *in vitro* el antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Crinipellis pernicioso*, obteniendo resultados favorables en el uso de éste.

4.6 Organismos útiles para el control biológico de fitopatógenos.

Existe un importante grupo de hongos y bacterias que presentan la capacidad de suprimir poblaciones de otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. De acuerdo a Fernández (2001), entre los organismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y los hongos de los géneros *Gliocladium*, *Fusarium* y *Trichoderma*; siendo este último el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo y partes

aéreas.

Actualmente se está empezando a investigar sobre la diversidad de especies en cuanto a hongos nos referimos ya sean macro o microscópicos ya que la obtención de metabolitos y enzimas son potenciales de uso agrícola como los estimuladores de crecimiento para plántulas (Capull *et.al.* 2003) que han propiciado el interés por diferentes rubros alrededor del agroindustria e investigación.

En el caso de hongos en cacao con potencial entomopatógeno, Rojas y Goitia (2004) hablan de la riqueza de hongos que se presentan en las hojas de cacao dentro del agroecosistema cacao en Venezuela donde se pudo observar la acción de los microorganismos *Aegerita webberi*, y *Aschersonia basicystis* infectando a mosquita blanca.

Con respecto al agroecosistema cacao en México, tenemos a Cuervo-Parra *et al.*, (2014) quienes identificaron a *Trichoderma viride* en una parcela de Huimanguillo en el estado de Tabasco y utilizándolo como biocontrolador de *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora capsici*, donde consiguen resultados alentadores para el uso del control biológico utilizando *Trichoderma viride*.

Otro trabajo dedicado a observar el potencial agronómico de *Trichoderma* spp es el de Sánchez-Pérez (2011) quien trabajó en Tamaulipas con la finalidad de realizar la caracterización genética y conocer su efectividad biológica como antagonista de los fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* y *Aspergillus parasiticus*.

4.7 *Trichoderma* spp.

4.7.1 Importancia.

El hienomycete género *Trichoderma* se caracteriza por tener especies notables por su capacidad de rápido crecimiento, por la utilización de sustratos y la resistencia a diversos productos químicos nocivos (Klein y Eveleigh, 1998). A menudo son componentes predominantes de la microflora de los suelos de los diversos ecosistemas, tales como campos agrícolas, praderas, bosques, pantanos y desiertos, en todas las zonas climáticas (Danielson y Davey, 1973; Roiger *et al.*, 1991; Smith, 1995; Wardle *et al.*, 1993). Estos hongos hacen una contribución significativa a la descomposición de los materiales leñosos y herbáceos (Rossman, 1996). Algunas especies de este género tienen importancia económica debido a su producción de enzimas y antibióticos o el uso como agentes de control biológico (Kubicek y Penttila, 1998; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998). Los hongos del género *Trichoderma* son habitantes naturales de suelos, son cosmopolitas (Jensen y Wolffhechel, 1995) y recientemente, especies de este género han sido descritas como oportunistas, interactuando simbióticamente con plantas, presentando potencial en el control de enfermedades (Harman *et al.*, 2004). Hace más de 200 años que se estudia la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp sobre microorganismos y aún se continúan descubriendo nuevas especies y por lo tanto interacciones nuevas (Druzhinina *et al.*, 2006). El éxito de *Trichoderma* spp como agente de control biológico es debido a su alta capacidad reproductiva y gran esporulación, al igual que su habilidad para sobrevivir bajo condiciones adversas, eficiencia en la

utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizosfera, gran agresividad contra hongos fitopatógenos, y eficiencia en promover el crecimiento y los mecanismos de defensa de las plantas (Benítez *et al.*, 2004). Su distribución está asociada a condiciones de pH, temperatura, humedad, materia orgánica y presencia de otros hongos del suelo (Papavizas, 1985).

La aplicación de *Trichoderma* spp como agente de control biológico se debe a las relaciones antagonistas que establece contra otros hongos fitopatógenos que viven en el suelo, además, ha mostrado influencia en la promoción del crecimiento de algunas plantas de importancia económica, ya que facilita la absorción de nutrientes (Capull *et al.*, 2003). Otro efecto favorable es que induce resistencia a plantas contra Fitopatógenos (Hermosa *et al.*, 2000; Harman, 2006; Vera *et al.*, 2005; Alfano *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2008). El antagonismo que se presenta contra fitopatógenos, se debe a diversos mecanismos, como el de la competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, parasitismo (**Imagen 1**) e hipovirulencia, los cuales no son excluyentes entre sí, y pueden actuar de forma sinérgica. Las especies de *Trichoderma* spp más utilizadas como agentes de control biológico son: *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. reesei* y *T. koningii* (Hajieghrari *et al.*, 2008). *T. harzianum* es efectivo contra *M. phaseolina*, *P. capsici*, *C. graminícola* en cultivos de ajonjolí, pimiento y en maíz, respectivamente (Ezziyyani *et al.*, 2004., Harman *et al.*, 2004b., Cardona y Rodríguez, 2003). *T. viride* es un eficiente antagonista de *R. solani* en cafetos (Cupull *et al.*, 2003). *T. virens* controla *C. graminícola*, *P. ultimátum*, *R. solani* en cultivos de algodón (Hanson y Howell., 2004., Djonovic *et al.*, 2006., Djonovic *et al.*, 2007) y en pruebas *in vitro* muestra actividad contra *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* (Mukherjee *et*

al., 2004) y *T. asperellum* altamente eficaz contra *Gibberella fujikuroi* (Nagayama et al., 2007).



Imagen 1. Penetración de haustorio y formación de la hifa de *Trichoderma virens* a lo largo de hifa de *Rhizoctonia*. Tomada de C. R. Howell, Mecanismos empleados por las especies de *Trichoderma* spp en el control biológico de las enfermedades de las plantas., Enfermedades de las Plantas, Junio 2003.

Existen diversos productos comerciales basados en *Trichoderma* spp el primer agente de control biológico en ser registrado y comercializado fue en Israel, con la cepa T39 *T. harzianum*-T39 aplicado en invernaderos y en viñedos; existen otros más en la India, Europa, Estados Unidos, entre otros (Hajieghrari et al., 2008).

4.7.2 Distribución de *Trichoderma* spp.

Se ha calculado que la magnitud de la biodiversidad en el planeta podría oscilar entre los 5 y 50 millones de especies en cuanto a hongos microscópicos. La considerable variación de estos datos es una evidencia de nuestra ignorancia ante el legado de cientos de millones de años de evolución de la vida en nuestro entorno natural. A pesar de que dos siglos de investigación científica que respaldan nuestro saber, hasta la fecha tan sólo se han descrito alrededor de 2 millones de especies, lo que demuestra que apenas hemos desprendido una diminuta fibra de la compleja trama de la biodiversidad de la tierra (Guzman, 1998).

Para México, se ha calculado que la riqueza fúngica podría alcanzar alrededor de 200 000 especies (Guzmán, 1998), de las cuales (si consideramos que por lo menos el 60% son microscópicas), 120 000 estarían representadas por micromicetos. Para 1995, de las 6 000 especies de hongos descritas en aquel entonces, 4 000 correspondían a macromicetos y apenas 2 000 a especies de micromicetos (Guzmán, 1995). Aun cuando no existe una estadística detallada al respecto, podría considerarse que en la última década unas mil especies más han sido registradas, lo que nos permite suponer que a la fecha por lo menos se han documentado unas 3 000 especies de micromicetos en México, lo que equivale apenas al 2.5% del total de la micro-micetos que se estima prolifera en el país. A pesar del gran potencial que tienen los micromicetos y su amplia diversidad y abundancia en la naturaleza, menos del 1% de las especies han sido investigadas desde un enfoque biotecnológico (Nisbet y Fox, 1991). Una gran parte de los estudios se circunscriben a aislamientos provenientes de unos cuantos géneros, principalmente de especies anamórficas, entre los que figuran *Acremonium*,

Aspergillus, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* los cuales comprenden apenas una mínima proporción de los 1 800 géneros que han sido descritos para este tipo de hongos.

El género *Trichoderma* incluye organismos de vida libre en suelos y en ecosistemas de raíz (Harman *et al.*, 2004) y pueden estar presentes en la materia orgánica de los suelos y en residuos de cultivos (Rincon, 1992; Cupull *et al.*, 2003). Actualmente la Subcomisión Internacional de *Trichoderma / Hypocrea* (ISTH) reconoce 104 especies, las cuales han sido caracterizadas a nivel molecular (ISTH. 2012). Investigadores de diferentes países continúan explorando nuevos nichos ecológicos para encontrar nuevas especies. En México se han aislado cepas de *Trichoderma* spp en varios estados, tales como Colima, Guerrero, Jalisco, Morelos, México, Oaxaca, Veracruz, Sinaloa, Guanajuato, Coahuila y Tabasco. En Chiapas ya se ha estudiado la diversidad de hongos pero no en el agroecosistema cacao. Lopez-Arevalo *et al.*, (1996) determinaron durante la fase de inóculos contaminantes en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (ceta), que los contaminantes más comunes fueron *Streptomyces* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Cunninghamella* sp Y *Trichoderma viridae*. Ovando-Medina (2001) aisló hongos endófitos en raíces de plantas maduras de la orquídea epífita *Cattleya skinneri* y no encontró que alguna especie promoviera la germinación de las semillas. Adicionalmente, este autor encontró que para las plántulas ex vitro de *C. aurantiaca*, *Trichoderma* spp, mostró características micorrícicas. Rosique (2004) reporta especies de *Trichoderma* spp en Tabasco en suelos de plantaciones de plátano obteniendo 6 especies aisladas. *T. harzianum*, *T. virens*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. aureoviride*, *T.*

parceramosus.

4.7.3 Clasificación de *Trichoderma* spp.

Actualmente se tienen alrededor de 104 especies descritas de acuerdo la subcomisión internacional de *Trichoderma/hypocrea*. Según Samuels (1996), determinar cuántas especies hay realmente dependerá de la definición de especie, si se considera que la mayoría de las especies del género *Hypocrea*, representan especies de *Trichoderma* spp, por lo tanto habrá más de 100 especies.

Basándose en la clasificación taxonómica de Alexopoulos (1981) y Subramanian (1983), el género *Trichoderma* se ubicaría de la manera siguiente:

Reino: Mycetae (fungi)
División: Eumycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Hyphales (Moniliales)
Familia: Moniliaceae
Género: *Trichoderma*

Existe una fuerte evidencia de que el género *Trichoderma*, visto filogenéticamente, es joven y sigue evolucionando con muchas formas intermedias (Lieckfeldt *et al.*, 1998). Rehner y Samuels (1995), demostraron que el género *Trichoderma* es filogenéticamente indistinguible de *Hypocrea*., a pesar de su evidente importancia económica, la taxonomía del género es aún problemática y los estudios están basados en la morfología (Samuels 1996). Se intenta clarificarla utilizando acercamientos moleculares, incluyendo huellas y análisis de secuencia (Kuhls *et al.*, 1997).

4.7.4 Morfología de *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* al microscopio presenta conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales (Barnett y Hunter, 1972). Presenta conidios de globoso a subgloboso, elipsoidal u oblongo menores de 5 μm de largo y ancho, de color verde oscuro profundo cercano a gris pasando por verde y verde amarillo. Los conidióforos no están bien definidos y los conidios tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas, los agregados formados de hifas entrelazadas. Las clamidiosporas tienden a ser de globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15 μm de diámetro (Samuels, 1996) (Imagen 2).

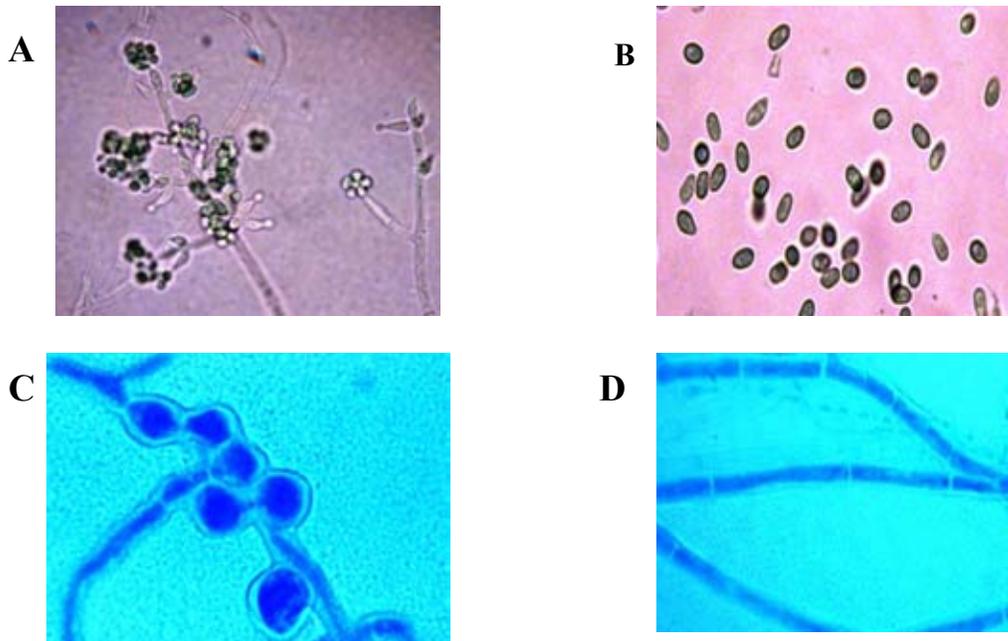


Imagen 2. *Trichoderma* spp estructuras A) Se observan conidióforo de *T. hamatum*, B) conidios de *T. hamatum* se logra apreciar su color verde de forma elipsoidal, C) formación de clamidiosporas intercalares D) séptos de *T. hamatum*.

4.7.5 Características de las colonias de *Trichoderma* spp.

En medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) *Trichoderma* spp presenta un crecimiento colonial rápido, de 5 días a 25°C. en este medio, las colonias son de aspecto algodonoso que se compactan con el tiempo. Cuando su desarrollo es alternado con periodos de luz y oscuridad, se aprecian las zonas de crecimiento correspondiente a cada periodo. En ausencia de luz el micelio es de color blanco algodonoso y en presencia de luz se observa la esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica. Al crecer en medio de cultivo, se observa la esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica. Al crecer en medio de cultivo, se observa en el reverso de la caja, un color pálido y en ocasiones una pigmentación amarillenta (Windham *et al.*, 1986), como se puede observar en la **Imagen 3**.

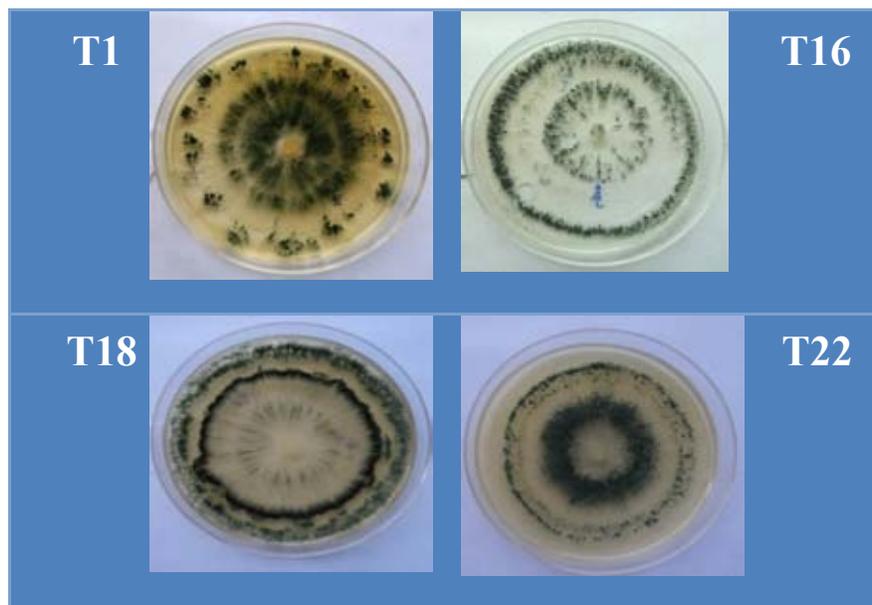


Imagen 3. Diferentes tipos de colonia de *Trichoderma* spp en medio PDA con características de crecimiento concéntrico, T1, T16, T18, T22 sepas que se presentaron en el actual trabajo.

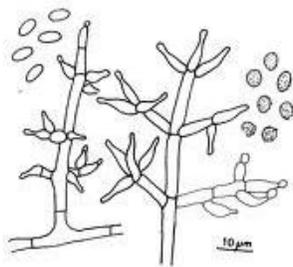
4.7.6 Identificación de *Trichoderma* spp.

La caracterización del género *Trichoderma* se puede realizar utilizando herramientas polifásicas, con base a su actividad antifúngica, en su morfología, mediante pruebas químicas y métodos moleculares, utilizadas para una correcta identificación del género (Bissett *et al.*, 2003; Corona *et al.*, 2008).

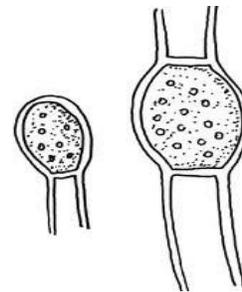
Este género posee una gran variabilidad genética, lo cual se confiere a cada especie características y propiedades diferentes. Por lo que es necesario identificar la especie con la cual se está trabajando.

4.7.6.1 Identificación morfológica.

La identificación taxonómica está principalmente basada en la descripción morfológica (**Imagen 4**), originando así 5 secciones del género *Trichoderma*: *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporim* y *Hypocreanum* (Rifai, 1969; Bissett, 1991a, 1991b, 1992). Este tipo de identificación requiere de mucha experiencia y dedicación en tiempo, para llevar una correcta identificación (Buhariwalla *et al.*, 2005).



Formación de conidióforos y fiálides de *Trichoderma* sp.



Representación de clamidiospora, las cuales pueden ser intercalares o terminales.

Imagen 4. Morfología de *Trichoderma* spp.

Esta identificación, también se basa en la morfología típica de este género, tal como rápido crecimiento, pigmentación conidial verde brillante o blanco y

ramificación repetitiva, pero mal definida la estructura del conidióforo.

4.7.6.2 Identificación por métodos moleculares.

El incremento en el número de aislamientos, la variabilidad fenotípica y su proximidad con *Hypocrea* y *Gliocladium* complicó la identificación por taxonomía clásica y no es sino a finales del siglo pasado, con las aplicaciones de técnicas basadas en ácidos nucleicos, que se triplicó la cantidad de especies descritas de *Trichoderma* spp.

Las Herramientas moleculares predominantes que se utilizan, son los métodos de RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (polimorfismo de ADN amplificado al azar), AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud polimórficos) los cuales son métodos genotípicos basados en la amplificación de grupos de fragmentación de ADN seléctos, obtenidos a partir de una digestión enzimática (Vos *et al.*, 1995). Estas técnicas son altamente discriminatorias y reproducibles, utilizadas en diversos microorganismos (Lieckfeldt *et al.*, 1999). Estas herramientas son utilizadas para la identificación de 4 clados del genero *Trichoderma*.

- Clado A: sección *Trichoderma* la cual incluye *T. hamatum*, *T. pubescens*, *T. koningii* y *T. atroviride*.
- Clado B: Contiene mezclas heterogéneas representado por la sección *Phachybrasium* que incluye *T. harzianum* y *T. inhamatum*.
- Clado C: Especies de *T. Longibrachiatum*.
- Clado D: por *T. aureoviride* (Kindermann *et al.*, 1998; Hermosa *et al.*, 2000; Kubicek *et al.*, 2002; Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002.).

También se utiliza la secuenciación de ADN ribosomal, con las secuencias del transcrito interno (ITS) 1 y 2, éstas se comparan con las ya reportadas en las bases de datos, utilizando principalmente la base de datos específica para el género *Hypocrea/Trichoderma*, TrichOKEY del International Subcommission on *Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* (ISTH) por sus siglas en inglés. TrichOKEY es una herramienta para la identificación molecular a nivel especie que está en línea.

Otra herramienta utilizada es el banco de datos del NCBI por sus siglas en inglés (National Center for Biotechnology Information), a través del método BLAST, en el cual se identifican las especies comparando la secuencia con las ya reportadas y según el mejor hit o grado de identidad, se determina la especie (Ortiz.1996).

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio.

Las zona de muestreo se ubicó en plantaciones de cacao en los municipios de Comalcalco, Cárdenas, Huimanguillo y Jalpa de Méndez ubicadas en las regiones de La Chontalpa, Tabasco y al norte de Chiapas se localizó en Pichucalco, lugares característicos por ser las regiones de mayor producción (**Imagen 5**). En cada sitio se registraron las coordenadas geográficas utilizando un dispositivo de posicionamiento global (GPS) (**Tabla 1**).



Imagen 5. Región en la cual se llevó acabo la toma de muestras.

Tabla 1. Lugares de muestreo de donde se aislaron las cepas de *Trichoderma* spp.

Cepa	Sustrato	Localidad / Municipio	Latitud N	Longitud W	Altitud msnm.
T1	Madera de cedro	*R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 09'33.7"	93°09'10.8"	11

T2	Suelo plantación de cacao	R/a. Ignacio Zaragoza 2da. Secc. Pichucalco Chiapas	17°31'19.3"	93°20'0.1"	131
T3	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 09'33.7"	93°09'10.8"	11
T4	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 09'33.7"	93°09'10.8"	11
T5	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 09'33.7"	93°09'10.8"	11
T6	Suelo plantación de cacao	R/a. Ocampo, Cárdenas Tabasco.	18°01'49.4"	93°21'29.7"	27
T7	Suelo plantación de cacao	R/a. Ocampo, Cárdenas Tabasco.	18°01'49.4"	93°21'29.7"	27
T8	Suelo plantación de cacao	R/a. Ocampo, Cárdenas Tabasco.	18°01'49.4"	93°21'29.7"	27
T9	Suelo plantación de cacao	R/a. Gregorio Méndez 1ª Sección Comalcalco Tabasco	18°14'59.8"	93°17'12.8"	17
T10	Suelo plantación de cacao	R/a. Gregorio Méndez 1ª Sección Comalcalco Tabasco	18°14'59.8"	93°17'12.8"	17
T11	Suelo plantación de cacao	R/a. Gregorio Méndez 1ª sección Comalcalco Tabasco	18°14'59.8"	93°17'12.8"	17
T12	Suelo plantación de cacao	R/a. Río seco, Cárdenas, Tabasco.	18°03'47.1"	93°23'04.5"	22
T13	Suelo plantación de cacao	R/a. Río seco, Cárdenas, Tabasco.	18°03'47.1"	93°23'04.5"	22
T14	Suelo plantación de cacao	R/a. Río seco, Cárdenas, Tabasco.	18°03'47.1"	93°23'04.5"	22
T15	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18°09'49.5"	93°05'44.0"	15
T16	Suelo plantación de cacao	R/a. Ignacio Zaragoza 2da. Secc. Pichucalco Chiapas	17° 31'52.7"	93°19'35.9"	81
T17	Fruto de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48"	12
T18	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18°11'04.3"	18°08'45.8"	9
T19	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 09'33.7"	93°09'10.8"	11
T20	Suelo plantación de cacao	R/a. Platanar de arriba, Pichucalco Chiapas	17°33'01.32"	93°18'9.9"	76
T21	Suelo plantación de cacao	R/a. Ignacio Zaragoza 2da. Secc. Pichucalco Chiapas	17° 31'52.7"	93°19'35.9"	81
T22	Suelo plantación de cacao	R/a. Ignacio Zaragoza 2da. Secc. Pichucalco Chiapas	17°31'19.3"	93°20'0.1"	131
T23	Fruto de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48.5"	12
T24	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48.5"	12
T25	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48.5"	12
T26	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48.5"	12
T27	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48.5"	12
T28	Suelo plantación de cacao	R/a. Hermenegildo Galeana 2da. Secc. Jalpa de Méndez, Tabasco.	18° 10'33.4"	93° 08'48.5"	12

*R/a: Región agrícola

5.2 Colecta de muestras

Los aislamientos del hongo *Trichoderma* spp se obtuvieron de suelo colectado

en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) en el estado de Tabasco y en plantaciones de cacao correspondientes a la zona norte del estado de Chiapas. El muestreo fue completamente al azar ya que actualmente toda la zona productora se encuentra con el problema de moniliasis, así también como mencionamos anteriormente, *Trichoderma* spp es un hongo cosmopolita que tiene la capacidad de desarrollarse en diferentes condiciones dadas., otra razón por la que se muestreó al azar fue a que se requiere estudiar la diversidad de *Trichoderma* spp. en el área de afectación.

En cada sitio de muestreo se colectaron 5 submuestras de 1 kg de suelo cada una bajo los lineamientos del método “cinco de oros” el cual consta en situarnos en el centro del área a muestrear y orientarnos al norte del lugar, realizando la primera toma de muestra en el sitio central y posteriormente trazar un cuadrado imaginario en el terreno donde de cada esquina se tomó una submuestra; estos cuadros imaginarios se plasmaron de cien metros por cien metros para obtener muestras de 1 hectárea. Cada submuestra de suelo se tomo de los primeros 20 cm de profundidad eliminando la materia orgánica superficial (Michel-Aceves *et al.*, 2001) (**Imagen 6**), así también antes de tomar cada submuestra se limpió la pala con un trapo húmedo y se flameo con alcohol para evitar la presencia de especies fúngicas de otros sitios de muestreo. Las submuestras tomadas se mezclaron homogéneamente para después de la muestra compuesta se tomara 1 kg como muestra representativa del sitio.



Imagen 6. A) Preparación de equipo para el muestreo., B) se puede observar que se limpió el área de toda materia orgánica buscando solo obtener suelo.

En total se colectaron 28 muestras, las cuales se transportaron en bolsas de plástico al laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, y se mantuvieron en refrigeración a 5°C hasta su procesamiento. Así también, mazorcas infectadas con moniliasis fueron colectadas y examinadas para corroborar presencia de *Trichoderma* spp (**Imagen 7**).



Imagen 7. Tipo de mazorcas infectadas durante el muestreo en los cacaotales.

5.3 Aislamientos de *Trichoderma* spp.

La obtención de los aislamientos de *Trichoderma* spp se realizó por el método de dilución en placa, donde se pesaron 10 gramos de suelo en condiciones asépticas de cada una de las muestras, después se homogeneizo con 100 mL de agua destilada estéril, se agregó 1 mL de Tween para poder disolver los grumos que se pudiesen formar en la solución de suelo, se colocó sobre el agitador magnético y con ayuda de la varilla magnética se procedió a mezclar la solución durante 3 minutos (**Imagen 8**). Una vez homogeneizada la muestra, se vertió 1mL de la solución madre y con el uso de una pipeta se tomó una alícuota de 1 mL en un matraz Erlenmeyer preparado con anterioridad con 9 mL de agua destilada y esterilizada, de este con valor 1:10 del porcentaje masa/volumen (p/v) se tomó 1 mL para vertérlo en otro matraz preparado de igual manera para que tuviese el volumen 1:100 de (v/p) la operación se repitió con otros 2 matraces. De esta manera se obtuvieron 4 matraces con diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 (p/v) (**Imagen 9**).



Imagen 8. Homogenización de suelo en agua destilada esterilizada.



Imagen 9. Dilución en placa, se muestra parte del proceso que se llevó a cabo.

Una vez realizadas las disoluciones, se tomó 1 mL de cada matraz para verterlo en una caja de Petri, la suspensión se dispersó uniformemente sobre la superficie de una caja Petri con el medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) acidificado (1000 mL de agua destilada, más 1 mL de ácido láctico adicionado antes de vaciar).

Las cajas de Petri se incubaron a 30 °C en oscuridad por 5 días. En total se utilizaron 4 cajas Petri por cada muestra de suelo (una de cada dilución). Las colonias de *Trichoderma* spp fueron reconocidas por su forma de crecimiento característico de parches o cojines verdes de conidios. Para cada muestra de suelo, se aislaron las colonias que fueron visibles durante los 3 a los 7 días, después de la siembra. La metodología utilizada fue la que presenta Ibarra Medina (2008)

5.4 Identificación Morfológica.

De cada aislado se realizó un cultivo de puntas de hifas y las colonias de 3, 5 y 10 días se observaron al microscopio compuesto (**Imagen 10**), así también se aprovechó para tomar fotografías durante esos días, siempre corroborando que

presenten las características del género como es conidióforo hialino, muy ramificado, no verticilado; fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales.

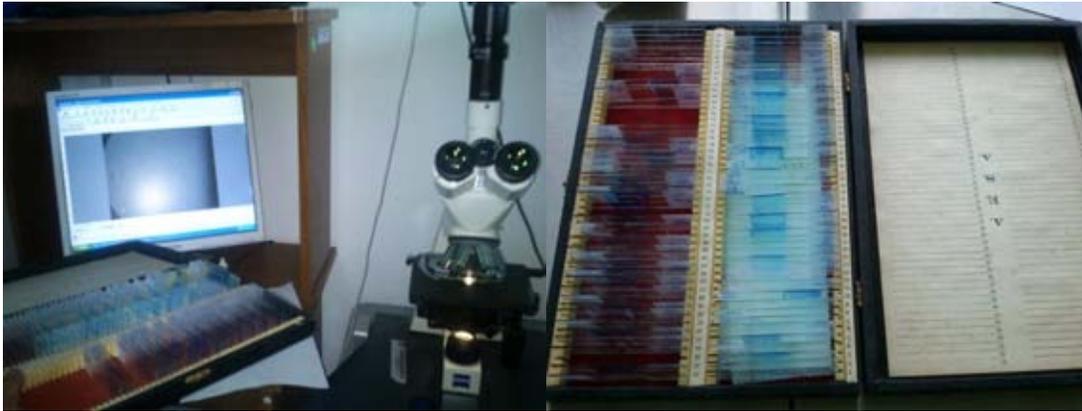


Imagen 10. Imagen del microscopio utilizado para la toma de fotografías así también imagen de los preparados de las puntas de hifa.

Para la caracterización morfológica de cada especie se midió el largo y ancho de 100 conidios, 50 fiálides, 30 septos (**Imagen 11**) así también se midieron clamidosporas cuando se presentaron. Se empleó el programa computacional Digital Image Tool versión 1.2, que realiza la función de una regla de medición, proporcionando de forma fácil y rápida mediciones en micras. Se observó la forma, el color del conidio y disposición de las fiálides.

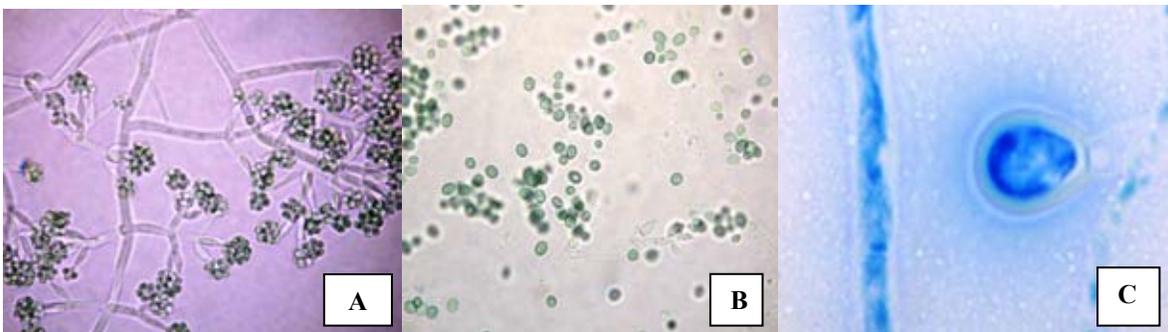


Imagen 11. Algunas imágenes que se tomaron para la medición de estructuras de *Trichoderma*; A) conidióforos, B) conidios, C) clamidosporas.

5.5 Identificación molecular.

El desarrollo de extracción y amplificación se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Recursos Naturales. Después las muestras se mandaron a secuenciar en Corea del Sur con la empresa Macro Gene ubicada en Seul.

5.6 Análisis de secuencias.

Las secuencias fueron analizadas comparándolas con una base de datos específica para el género *Trichoderma* (*TrichOKEY* versión 2.0), disponible en línea en el sitio oficial de la Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea*, así también como en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI). De los valores generados, se consideró la mayor similitud para su comparación con la secuencia de estudio.

6. RESULTADOS.

6.1. Obtención de especies nativas de *Trichoderma* spp.

Las muestras de suelo de donde se obtuvieron las especies nativas de *Trichoderma* spp se colectaron dentro de las zonas con mayor producción de cacao en este caso dentro del área de la Chontalpa en Tabasco y Pichucalco en Chiapas que son de los municipios con mayor producción de cacao. De las 28 muestras de suelo colectadas dentro del corredor productor-comercial cacaotero de Tabasco y Chiapas, se obtuvieron 23 cepas nativas de *Trichoderma* spp en Tabasco y 5 cepas nativas en el municipio de Pichucalco, Chiapas. Dentro de estas cepas se encontraron 7 especies diferentes las cuales se presentaron en diferentes parcelas correspondientes a las 20 muestras obtenidas (**Tabla 2**).

Las 28 cepas del género *Trichoderma* spp se identificaron por las características morfológicas que resultaron: conidióforo hialino muy ramificado no verticilado fialides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides nacidos en pequeños racimos terminales aunque también presenta conidios globosos o subglobosos, elipsoidal, obovoide u oblongo de color verde oscuro o verde olivo, estas características se tomaron de acuerdo a las características que proporciona la página de internet del ISTH.

Se realizó una guía morfológica que describe las especies identificadas en el actual trabajo para que sirva como parámetro para futuros trabajos de identificación de cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 2. Especies a las cuales pertenecen los aislamientos en las áreas de muestreo Tabasco y Chiapas, México.

Especies	Muestras
<i>Trichoderma hamatum</i>	T2.
<i>Trichoderma koningii</i>	T3, T25, T26.
<i>Trichoderma harzianum</i>	T4, T14, T21, T22, T24, T28, T1
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	T5.
<i>Trichoderma virens</i>	T6, T7, T8, T12, T13, T15, T17, T18, T23, T27.
<i>Trichoderma longibracheatum</i>	T9, T10, T11.
<i>Trichoderma asperellum</i>	T16, T19, T20.

La identidad de las especies mencionadas, se confirmó con la identificación molecular mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas en el banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information), y también con las secuencias reportadas en el banco de Trichokey (**Tabla 3**).

Tabla 3. Relacion de especies de *Trichoderma* spp / *Hypocrea* (H.) Identificadas en huertos de cacao de Chiapas y Tabasco.

Cepa	Especie identificada	Referencia
1	<i>T. harzianum</i>	
2	<i>T. hamatum</i>	FJ461577.1
3	<i>H. koningii</i>	FJ430783.1
4	<i>H. lixxi</i>	EU744191.1
5	<i>T. brevicompactum</i>	JQ040334.1
6	<i>H. virens</i>	EU680959.1
7	<i>H. virens</i>	EU680959.1
8	<i>H. virens</i>	EU680959.1
9	<i>T. longibrachiatum</i>	EU769111.1
10	<i>T. brevicompactum</i> (<i>T. longibrachiatum</i>)	JQ040334.1
11	<i>T. longibrachiatum</i>	EU744190.1
12	<i>H. virens</i>	JQ040400.1
13	<i>H. virens</i>	EU680959.1
14	<i>H. lixxi</i>	EU744191.1
15	<i>H. virens</i>	EU680959.1
16	<i>T. asperellum</i>	GU176453.1
17	<i>H. virens</i>	EU680959.1
18	<i>T. virens</i>	
19	<i>T. asperellum</i>	JQ040317.1
20	<i>T. asperellum</i>	FJ412053.1
21	<i>H. lixxi</i>	EU871018.1
22	<i>H. lixxi</i>	EU871021.1
23	<i>H. virens</i>	EU680959.1
24	<i>H. lixxi</i>	GU934532.1
25	<i>H. koningii</i>	FJ430783.1
26	<i>T. brevicompactum</i> (<i>H. koningii</i>)	JQ040334.1
27	<i>H. virens</i>	EU680959.1
28	<i>H. lixxi</i>	EU744191.1

6.2 Descripción de las especies de *Trichoderma* spp encontradas en las áreas de muestreo de Tabasco y Chiapas México.

6.2.1 *Trichoderma hamatum*

Las colonias son de crecimiento lento a las 48 horas con valores de 5.46-5.81 mm (Radio) (3 días). A una temperatura de 25°C. Conidación en pústulas compactas, distribuidas concéntricamente; de color verde a blanco. Del lado Inverso de la caja incoloro a lechoso. Olor indistinto. Conidióforos con la ramificación irregular, fiálide se presenta elipsoidales o langeniforme, 14.83-3.42 micras, en su mayoría surgen en verticilos, si se encuentran en la parte terminal del conidióforo se hallan en grupos de 3-6, también se encuentran intercalares solitarias. Los conidios se encuentran ovoides a elipsoidales, con medidas de 4.7-3.1, son lisos y de pared relativamente delgada, el color se asemeja al verde olivo diluido. Clamidosporas subglobosas o sin forma, intercalares en grupos de dos a tres. También se llegan a encontrar terminales, son de color verde olivo con medidas de 10- 8 micras (**Imagen 12**).

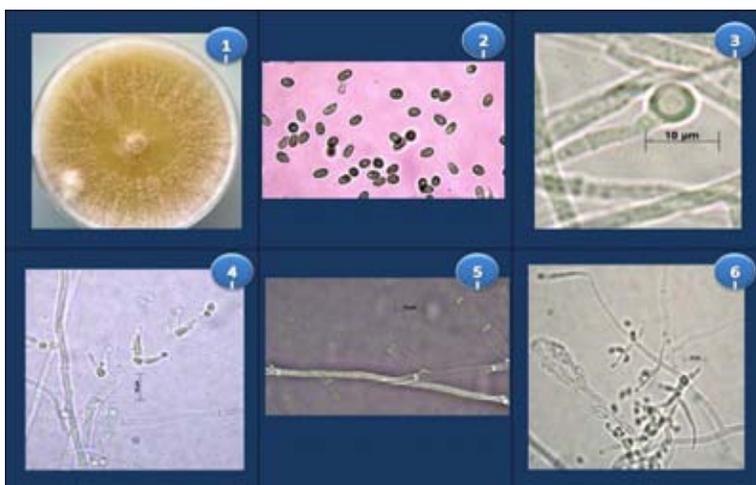


Imagen 12. *Trichoderma hamatum* (1) crecimiento del hongo en caja de petri, (2) conidios, (3) clamidospora, (4) fiálides, (5) septos, (6) conidióforo.

6.2.2 *Trichoderma koningii*.

Las colonias son de crecimiento rápido a las 48 horas a 25 grados centígrados con valores de 20-19 mm (radio)(3 días). Conidiación concéntrica, formando costras en halos de color verdeazulado, la parte inversa de la caja de Petri no presenta coloración aunque se puede apreciar cierta coloración blanca. Fiálide langeniforme a elipsoidales, algunas ampuliformes, éstas se encuentran de 3-5 fiálides en las partes terminales del conidióforo con medidas de 10.24-2.7 largo y ancho respectivamente, de color verde. Conidios con medidas de 4.7-3.9 con forma elipsoidal, color verde olivo (**Imagen 13**).



Imagen 13. *Trichoderma koningii* (1) crecimiento del hongo en caja de Petri, (2) conidios, (3) clamidospora, (4) fiálides, (5) septos, (6) conidióforo.

6.2.3 *Trichoderma harzianum*.

Las colonias crecen rápidamente a las 48 horas con temperatura a 25 grados centígrados y con luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, con esporulación abundante. Conidiación predominante, apareciendo granular o en polvo debido a la formación de conidios convirtiendo mechones de color verde a verde oscuro, la parte inversa de la caja de petri es de color amarillento. Conidióforos verticilado, poco ramificado formando una estructura piramidal. Fiálide ampulliforme a langeniforme, generalmente en grupos de 3-4 terminales aunque también se presentan intercalares solitarias, sus medidas son: 9.24-3.2 micras. Conidios subglobosos a ovoides, en su mayoría con mediadas de 3.64-2.99, color verde oliva (Imagen 14).

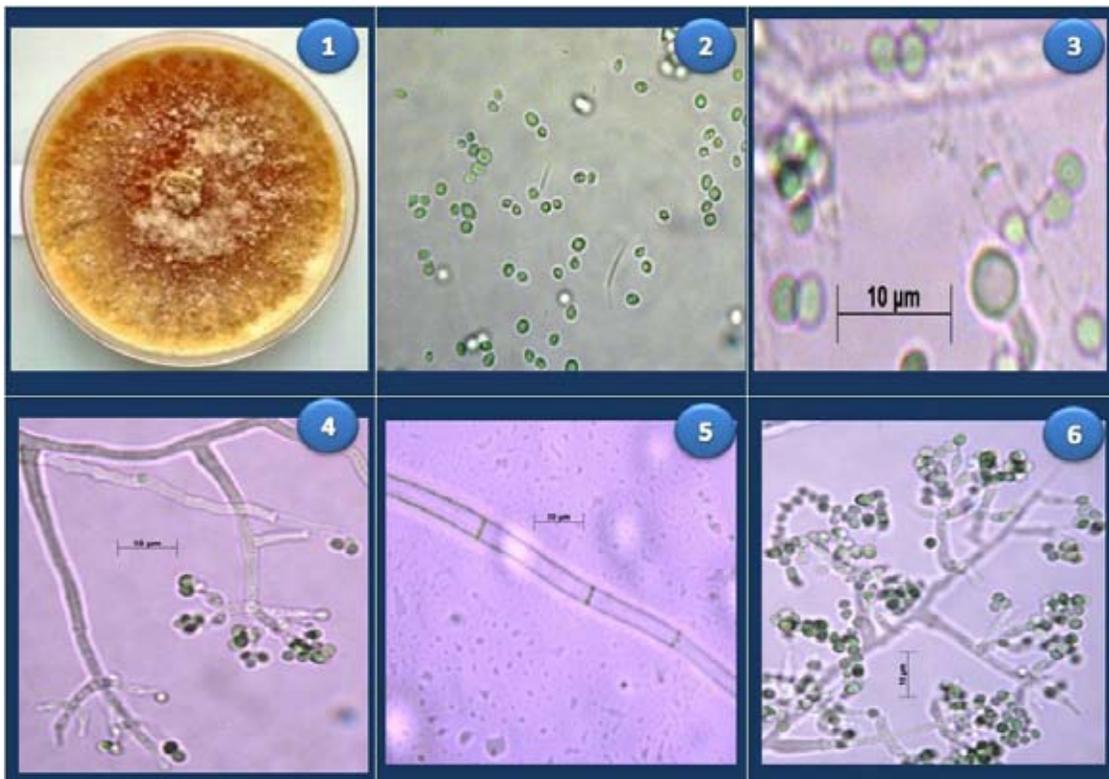


Imagen 14. *Trichoderma harzianum* (1) crecimiento del hongo en caja de petri, (2) conidios, (3) clamidospora, (4) fiálides, (5) septos, (6) conidiofóro.

6.2.4 *Trichoderma brevicompactum*.

Colonias de crecimiento lento a 48 horas a 25 grados centígrados y con luz y oscuridad de 12 horas respectivamente en medio PDA, formando anillos concéntricos visibles de color verde y blanco producción de conidios sobre los anillos concéntricos internos y en anillos exteriores con la producción conidial. El envés transparente a lechoso. Conidióforo con las ramas emparejadas. Fiálides que surgen de 2-4 desde la punta del conidióforo, largo, lageniforme, ligeramente hinchado en el medio; se presentan fiálides intercalares de 4.92-16.34 micras de largo, 1.82-4.64 micras en el punto más ancho cerca de la mitad. Los conidios son verdes de forma ovoide y subglobosa, con coloración verde olivo y medidas que van de 5.87-2.42 de largo por 2.14-3.86 ancho (**Imagen 15**).

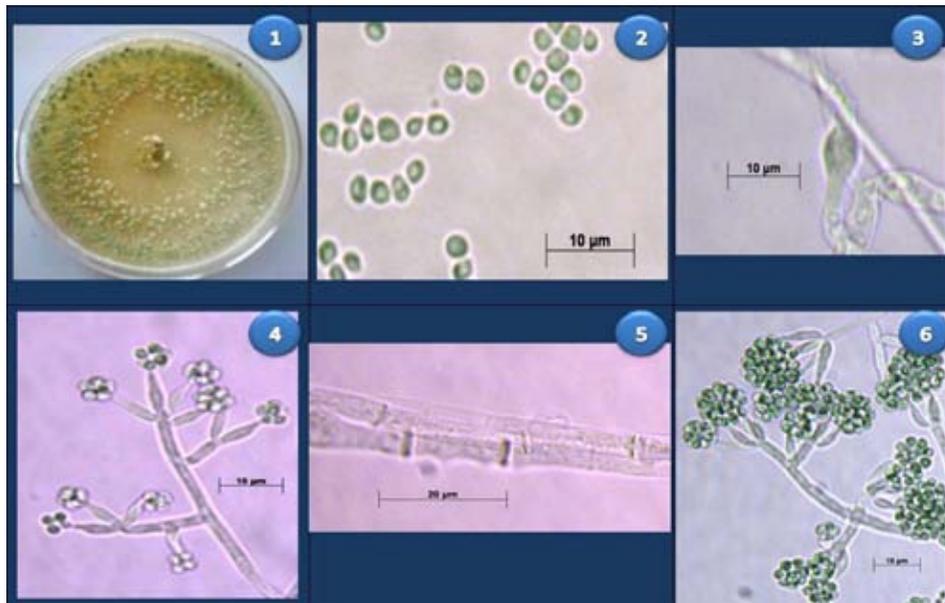


Imagen 15. *Trichoderma brevicompactum* (1) crecimiento del hongo en caja de petri, (2) conidios, (3) clamidospora, (4)fiálides, (5) septos, (6) conidiofóro.

6.2.5 *Trichoderma virens*.

Colonia de crecimiento rápido en PDA, a las 48 horas a 25 grados centígrados y con luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, presentó mediadas con un radio de 14 a 21 milímetros. Conidiación que cubre la totalidad de la superficie de la placa; el envés con coloración amarilla- verde. Fiálides con formas langeniforme a ampuliformes, base ancha aunque se pueden ver algunas estrechas, hinchadas en el medio, atenuadas en la punta, con medidas de 19.21-6.48 micras de largo, 6.22-2.28 micras en el punto más ancho; se presentan fiálides intercalares. Los conidios son de color verde olivo, con formas que pueden ser elipsoidales a obovoides, lisas, con medidas a lo largo que van de 4.78-3.65 y ancho 5.53-2.96. Clamidosporas: finales o intercalares por lo general circulares de color verde olivo (**Imagen 16**).

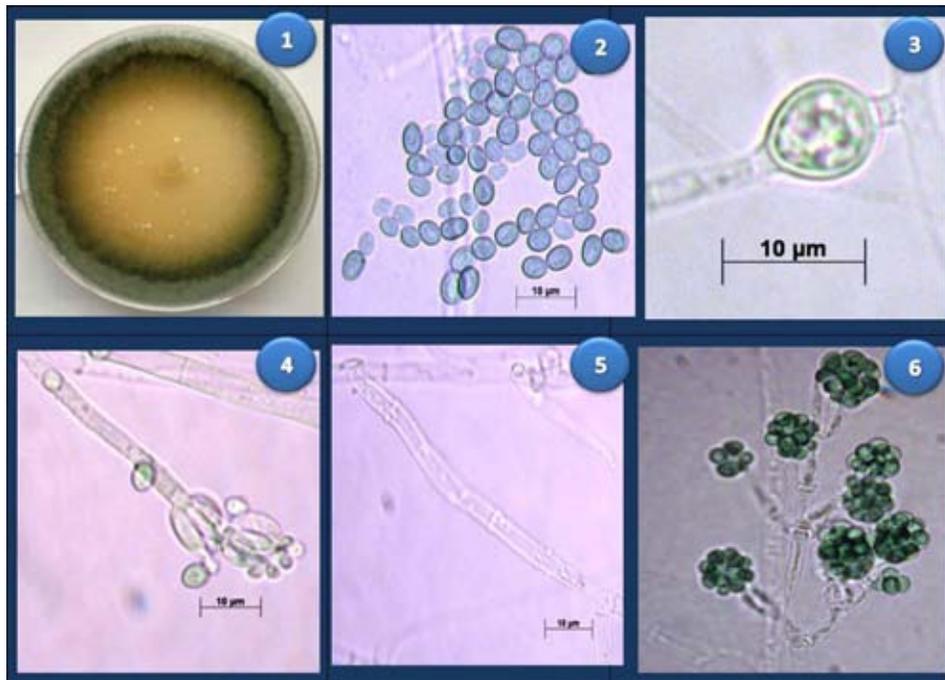


Imagen 16. *Trichoderma virens*. (1) crecimiento del hongo en caja de petri, (2) conidios, (3) clamidospora, (4) fiálides, (5) septos, (6) conidióforo.

6.2.6 *Trichoderma longibracheatum*.

Colonia de crecimiento rápido a las 48 horas a 25 grados centígrados y con luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, con una esporulación abundante y radio en PDA de 50 mm, uniformemente cubre la superficie formando anillos concéntricos; color verde oscuro, con manchas blancas. El envés presenta coloración amarilla fluorescente. Los conidióforos consisten en un eje muy desarrollado central desde el cual surgen hacia la punta. Fiálide solitaria y más lejos de la punta cada vez más, a menudo vinculados, ramas secundarias. Fiálides solitarias y en grupos de 2-3, generalmente cilíndricas, lageniformes con medidas que van de 18.21-5.38 largo por 4.09-1.47 ancho. Se presentan fiálides intercalares. Conidios con coloración verde olivo de forma ovoide a elipsoidales, con mediciones que van de 5.04-2.78 de largo por 3.72-2.64 de ancho. Se presentan Clamidiosporas terminales e intercalares (**Imagen 17**).

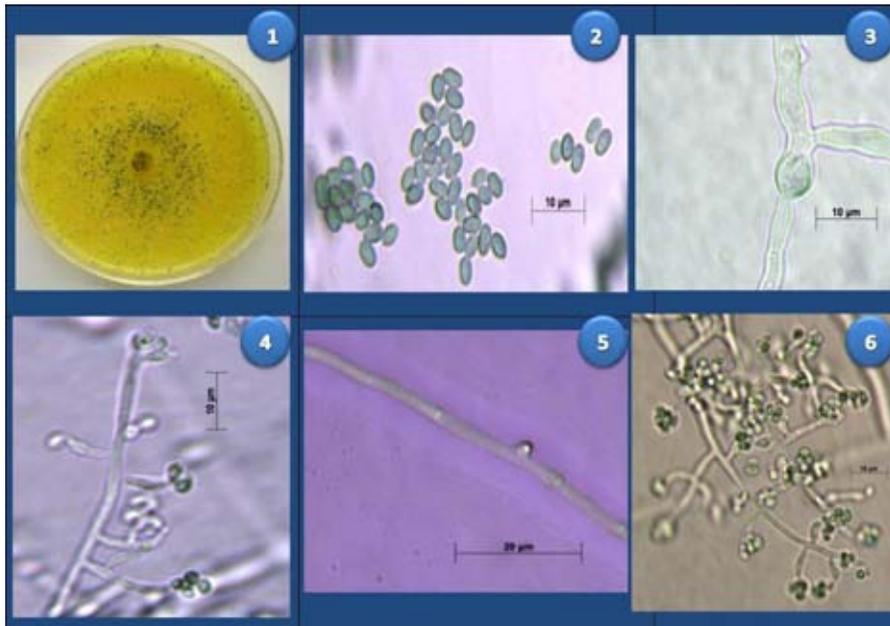


Imagen 17. *Trichoderma longibracheatum* (1) crecimiento del hongo en caja de petri, (2) conidios, (3) clamidiospora, (4) fiálides, (5) septos, (6) conidióforo.

6.2.7 *Trichoderma asperellum*.

Colonia de crecimiento rápido, el radio después de 48 horas a 25 grados centígrados y con luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, en medio PDA presentó las medidas de 17-18 mm de anillos concéntricos con producción conidial densa, con conidios verdes hacia el centro. El envés de la caja de Petri sin pigmento o tornándose color blanco pero tenue. Los conidióforos tienen un aspecto simétrico que termina en dos o más fiáldies. Ramas primarias largas, tiende a tener ramas secundarias que no ramifican. Fiálide intercalar, en verticilos de 2-4 fiáldies, con forma ampuliforme y langeniforme, con medidas que van de 15.02-7.2 micras de largo, 3.79-2.03 micras de ancho, se presentan fiálide intercalar. Los conidios de color verde oscuro, globosos a subglobosos también se presentan obovoides, con medidas que van de 5.9-3.4 de largo a 4.02-2.37 de ancho (**Imagen 18**).

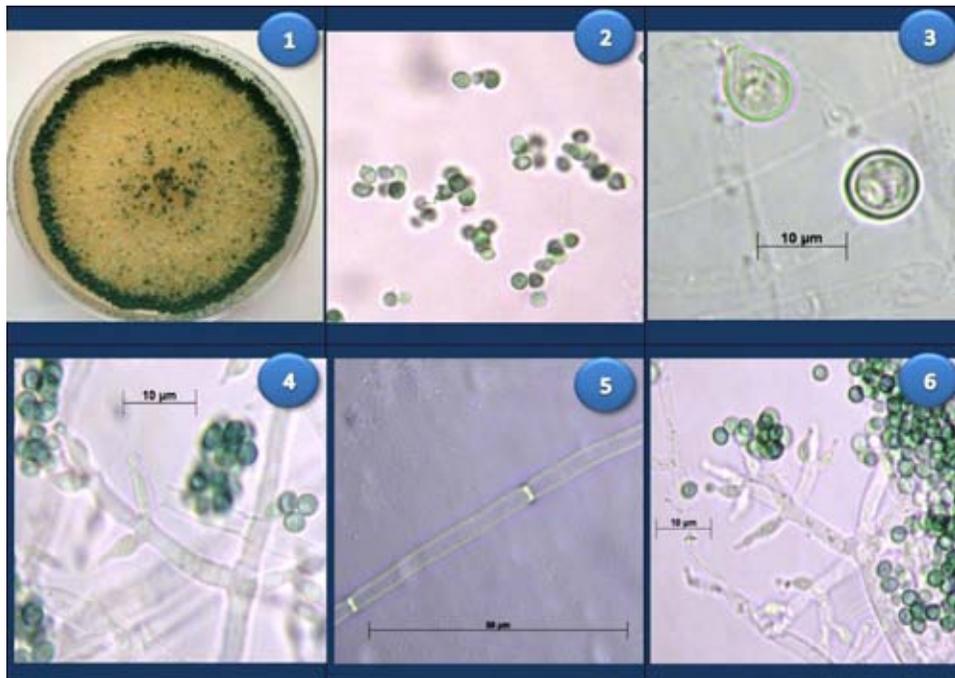


Imagen 18. *Trichoderma asperellum* (1) crecimiento del hongo en caja de petri, (2) conidios, (3) clamidospora, (4) fiálide, (5) septos, (6) conidióforo.

6.3 Distribución de *Trichoderma* spp

Es notorio que por ser Jalpa de Méndez la entidad mayor muestreada, encontremos una mayor diversidad de *Trichoderma* spp, las 14 cepas representan el 50% del total de los aislamientos y con ello 5 especies diferentes encontradas en esta área (**Tabla 4**).

Tabla 4. Diversidad y abundancia de especies en Jalpa de Méndez.

Especie	Muestra
<i>T. asperelum</i>	T19.
<i>T. koningii</i>	T3, T25, T26.
<i>T. harzianum</i>	T1, T4, T24, T28.
<i>T. brevicompactum</i>	T5.
<i>T. virens</i>	T15, T17, T18, T23, T27.

La segunda localidad con mayor cantidad de aislamientos fue H. Cárdenas. Esta entidad con 6 cepas representa el 21.42% de los aislamientos con 2 especies encontradas (**Tabla 5**).

Tabla 5. Diversidad de especies en H. Cárdenas.

Especie	Muestra
<i>T. harzianum</i>	T14.
<i>T. virens</i>	T6, T7, T8, T12, T13.

Pichucalco, Chiapas fue la siguiente localidad con 5 cepas que equivale al 17.85% si comparamos con H. Cardenas, esta localidad cuenta con buena diversidad de especies de *Trichoderma* (**Tabla 6**).

Tabla 6. Diversidad de especies en Pichucalco.

Especie	Muestra
<i>T. asperelum</i>	T16, T20.
<i>T. hamatum</i>	T2.
<i>T. harzianum</i>	T21, T22.

Comalcalco fue la localidad que menor cantidad de cepas, solo 3 lo que representa el 10.71% y todas pertenecientes a la especie *T. longibracheatum* (**Tabla 7**).

Tabla 7. Diversidad de especies en Comalcalco

Especie	Muestra
<i>T. longibracheatum</i>	T9, T10, T11.

6.4 Medición de biodiversidad.

Se utilizó el método más sencillo para medir la biodiversidad de especies en el agroecosistema cacao, utilizando el índice de Margalef, el cual transforma el número de especies por muestra a una proporción a la cual las especies son añadidas por expansión de la muestra, esto supone que hay una relación funcional entre el número de especies y el número total de individuos $S = \frac{K}{\sqrt{N}}$; donde K es constante (Magurran, 1998). Si ésta relación especie-individuo se mantiene, entonces el índice varía con el tamaño de muestra de forma desconocida.

Índice de diversidad de Margalef.

$$Dmg = \frac{S-1}{\ln N}$$

Dónde: S= número de especies; N= número total de individuos.
Para esto el índice de Margalef nos daría: 1.8

De acuerdo a Rivas y Doménico (2010), quienes identificaron 6 especies de 38 aislamientos, reportan un índice de diversidad (ID) de 0.15 (6/38). Utilizando el método con el cual ellos registran su índice de diversidad. En el trabajo de investigación presente se genera un índice del 0.25 (7/28), el cual es un índice considerablemente alto si tomamos en cuenta que sólo tomamos tres municipios del estado de Tabasco y uno de Chiapas.

Se han reportado valores de ID en Asia 14/96, ID= .14; (Kubicek *et al.*, 2003), América del sur 10/53, ID= .18; (Druzhinina *et al.*, 2005) y China 13/135, ID= 0.096; (Zhang *et al.*, 2005). La mayor diversidad de *Trichoderma* spp reportada ha sido en la rizosfera de *Coffea arabica* L. en bosques de tierras altas en Etiopia con un ID= 0.38 (Belayneh y Druzhinina; citado en Migheli *et al.*, 2009).

7 DISCUSIÓN.

La zona de estudio tiene la capacidad de propiciar una gran diversidad de especies de *Trichoderma* spp conforme al parámetro que maneja Rivas y Doménico (2010), pero es de observarse que la zona de Comalcalco sólo haya tenido una especie. Se considera que es necesario repetir el muestreo en la misma parcela y las que le rodean para poder asegurar que no fue un error de contaminación en el laboratorio. Otros factores que pudieron haber intervenido y faltaron de analizarse fueron las pequeñas diferencias meteorológicas y edáficas de cada zona, reunir información y hallar una relación de las especies encontradas en cada zona, de esta manera se podría analizar algunas de las limitantes de *Trichoderma* spp.

Un aspecto que sobresalió en la investigación es que no en todos los terrenos se encontraron mazorcas con *Trichoderma* spp expuestas, solo en algunas y lo más sorprendente es el aislamiento 1 que fue encontrado en la corteza de un árbol expuesto al sol con lo cual podríamos analizar el crecimiento endófito de esta cepa en cultivares de cacao. Es necesario conocer los parámetros edafológicos, fisiológicos, climáticos y bioquímicos exactos con los cuales *Trichoderma* spp se presta a crecer y generar condiciones de control biológico que beneficien de manera significativa y económica a los productores del área. Con esto se pueden implementar las características necesarias en cultivos de cacao de ciertas especies de *Trichoderma* spp con las cuales, aunadas al manejo integrado de plagas se puede llegar a recuperar el rendimiento de los cacaotales.

Dentro de las especies encontradas la más abundante fue *Trichoderma virens* por lo tanto prueba de que junto con *Trichoderma harzianum* es de las especies que tiene gran capacidad de esporulación, esta especie utilizada como hongo benéfico, es capaz de promover el crecimiento en algunas especies vegetales (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). *Trichoderma harzianum* que se encuentra también dentro de las más abundantes, es una especie muy utilizada en programas de control de hongos fitopatógenos (Harman., 2000; Benitez *et al.*, 2004) y es probablemente uno de los hongos que serían de beneficio para futuras pruebas de control biológico, ya que a nivel mundial se han reportado resultados positivos ante varios cultivos. *Trichoderma koningii* es otra de las especies que se diferencian por detalles en su fenotipo y biogeografía reportándose como endófitos en troncos de *Theobroma cacao*. *Trichoderma asperellum* es un conocido biocontrolador, aún más antiguo que *Trichoderma harzianum*; y es capaz de colonizar el sistema radicular de algunas especies vegetales, induciendo resistencia a patógenos o mayor crecimiento en raíces (Yedidida *et al.*, 2003; Shores *et al.*, 2005). *Trichoderma brevicompactum* ha sido reportado como un potencial productor de polipéptidos y antibióticos (Degenkolb *et al.*, 2006a).

Queda abierto un gran espectro de investigaciones que involucren *Trichoderma* spp no sólo como biocontrolador sino también como fitoremediador ya que se han hecho investigaciones donde *Trichoderma* spp puede ayudar a la bioremediación de los ecosistemas en Tabasco ya que es uno de los estados petroleros de importancia en el país y como tal también uno donde se generan un gran número de fugas de las tuberías de petróleo anualmente., presentándose *Trichoderma* spp

como una opción para mejorar los ecosistemas de Tabasco (Argumedo-Delira., *et al.* 2009). Se espera que las investigaciones de *Trichoderma* spp en Tabasco y Chiapas no sólo sean dirigidas para utilizarlos en programas de biodiversidad, control biológico y bioremediación sino también para poder explotar sus cualidades biotecnológicas cómo son la producción de sus diversos metabolitos los cuales tiene un gran número de aplicaciones en la industria y agricultura (Benitez., *et al.* 2004 y Nogawa., *et al.* 2001) Otro aspecto que no se debe de olvidar y descuidar es el buscar nuevas especies no sólo hongos sino también bacterias y virus que puedan apoyar al combate de la moniliasis y otras enfermedades que se generan en los diversos ecosistemas en nuestro país.

Por último se tiene que considerar el virus globoso del cacao que aunque aún no se encuentra en nuestro continente es necesario buscar maneras de prevenir la entrada; los cercos sanitarios son una opción pero hace falta la observación y análisis de los cacaotales de todos los estados productores para estar seguros de tener un buen control. Este trabajo no sólo le confiere a técnicos y a gobierno sino también a investigadores para seguir buscando árboles de cacao capaces de ser resistentes a diferentes enfermedades y así también buscar mejores técnicas agrícolas para tener cultivos sanos y con el menor gasto en insumos posibles, generando al mismo tiempo mayores ganancias y productos más saludables.

8 CONCLUSIONES.

La presencia de diferentes especies de *Trichoderma* spp en suelos del agroecosistema cacao muestra la naturaleza cosmopolita del mismo.

Con este trabajo de tesis, se logra comprobar que el agroecosistema alberga a *Trichoderma* spp con una gran gama de especies que se pueden utilizar como biocontroladores en programas a futuro de investigación y aplicación técnica.

El uso de herramientas moleculares apoya esta investigación comparando nuestra información de la diversidad de especies mediante herramientas en línea que son de uso internacional.

El agroecosistema cacao muestra la gran diversidad de especies con las que cuenta nuestro país y más si se toma en cuenta que el área muestreada sólo es una pequeña parte del territorio nacional, siendo la biodiversidad un área de investigación con gran potencial biotecnológico, ecológico y mucho más importante agronómico.

La sinergia y el comportamiento en condiciones naturales de un biocontrolador son parámetros difíciles de predecir, y dado que las condiciones ambientales son importantes, la selección de un controlador biológico se inicia con una correcta identificación y caracterización de las cepas de biocontrol el cual es el primer paso en la utilización de agentes biocontroladores de enfermedades en el campo.

Trichoderma spp es un hongo con mucho potencial en nuestro país y con apoyo de los diferentes sectores se puede llegar a explotar las grandes ventajas que nos proporciona a nivel biotecnológico.

Trichoderma virens y *Trichoderma harzianum* son cepas de las cuales se tiene

que estar al pendiente ya que fueron las que mayor esporulación presentaron y se vio reflejado en la cantidad de cepas encontradas, entre estas dos especies se generaron el 60.7% de aislamientos; con lo cual se puede apreciar hasta cierto punto su potencial como biocontrolador.

Si comparamos los índices de diversidad de *Trichoderma* que presentan otros países con los índices reportados en esta tesis, podemos apreciar una gran diversidad 0.25 de acuerdo a Rivas y Doménico (2010) si nos comparamos con 0.38 que es la diversidad más alta que reportan en las tierras altas de Etiopia en el cultivo de *Coffea arabica*.

9. RECOMENDACIONES

- El uso de estas cepas para control biológico requieren del siguiente paso que es el estudio *in vitro* para su antagonismo ante la monilia y ante otros organismos.
- Se requiere de una mayor asesoría técnica en cuanto al manejo integrado de plagas en el cultivo de cacao para los productores de las áreas cacaoteras, las cuales pueden ser impartidas por centros de investigación y universidades que manejen las licenciaturas de ingeniería agrícola o ingeniero agrónomo.
- Que el gobierno facilite apoyos económicos a las instituciones de investigación en el estado, que tenga como objetivo impulsar la investigación para disminuir la presencia de la Moniliasis del cacao.
- Fortalecer el vínculo entre ingenieros e investigadores – productores de cacao, para mejorar la situación actual de este producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Aime, M.C y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycology* 97:1012-1022.
- Alexopoulos M. 1981. Biodegradation of chemical of environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Alfano, G. Ivey MLL, Cakir C, Bos JIB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97 429–437.
- Aránzazu, F. 2000. Escoba de bruja en Colombia su Impacto Económico y Manejo. In: Mejía, F.L.A. y Arguello, C.O. (Compiladores). Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción del Cacao. Bucaramanga, Colombia: CORPOICA. 144pp.
- Argumedo-Delira, Alarcon, Ferrera C. y Peña C. 2009. El género Fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánico e inorgánico, *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 257-269.
- Barbettm, H. & Hunter, B. 1972. Illustrated Genera of imperfect fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. 241 pp.
- Belayneh Mulaw, T., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. 2010. The Rhizosphere of *Coffea arabica* in Its Native Highland Forests of Ethiopia Provides a Niche for a Distinguished Diversity of *Trichoderma*. *Diversity*, 2, 527-549.
- Benitez T, Rincon A.M., Limon M.C and Codon A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. - *Canad. J. Bot.* 69:2357-2372
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. - *Canad. J. Bot.* 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 639-641.
- Brunt, A.A., y Kenten, R.H. 1971. Viruses infecting cacao. *Plant Pathology* 50:591-602.

- Buhariwalla HK, Srilakshmi, P, Kannan S, Kanchi RS, Chandra S, Satyaprasad K, Waliyar F, hakur RP, Crouch JH, 2005. AFLP analysis of *Trichoderma* spp. From India compared with sequence and morphological-based diagnostics. *Journal of Phytopathology* 153: 389-400.
- C. R. Howell, Mecanismos empleados por las especies de *Trichoderma* sp. en el control biológico de las enfermedades de las plantas., *Enfermedades de las Plantas*, Junio 2003.
- Cardona, R. y Rodríguez, H. 2006. Efecto del hongo *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de la enfermedad pudrición carbonosa en ajonjolí. *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ. España.* 23: 44-50.18.
- Cheesman, E.E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and the possible relationships of cacao populations. *Tropical Agricultura* 21:144-159.
- Contreras-Cornejo, H.A., L. Macías-Rodríguez, C. Cortés-Penagos and J. López-Bucio, 2009. *Trichoderma virens*: A plant beneficial fungus enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 149: 1579-1592.
- Córdova-Avalos, V *et al.* 2008. Participación de las asociaciones campesinas en el acopio y comercialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco, México. *Universidad y ciencia, Ago*, vol.24, no.2, p.147-158.
- Cuervo-Parra, J. A., Sanchez-Lopez, V., Romero-Cortes, T., & Ramirez-Lepe, M. 2014. *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(16), 1704-1712.
- Cueto, M.J., Aguirre M.J.F., Zamarrita C.A., Iracheta D.L y Olivera de los Santos A. 2007. El Mejoramiento del Cultivo del Cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. 250 p.
- Cupull, S. R., C. C. Sánchez., C. Andreu., María del C. Cupull y Pérez, N. C. 2003: "Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn ". Centro Agrícola año 2003
- Danielson RM, Davey CB 1973. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biol Biochem* 5:486-494

- De Bach, P. 1969. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México, D.F. Compañía editorial Continental S.A. p. 949
- Degenkolb T, Gräfenhan T, Nirenberg HI, Gams W, Brückner H 2006a. *Trichoderma brevicompactum* Complex: Rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics. J Agric Food Chem 54:7047–7061
- Desrosiers R., and Diaz, J. 1957. The World Distribution of Diseases of Cacao. In: Proceedings of the sixth Meeting of the Inter-American Technical Committee of Cacao, Salvador, Brazil. Page 331- 344.
- Djonovic, S., M.J. Pozo, and C.M. Kenerley. 2006. Tvbn3, a Beta-1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Phythium ultimum*. Applied and Environmental Microbiology 72 (12): 7661-7670.
- Djonovic, S., W.A. Vargas, M.V. Kolomiets , M. Horndeski, A. Wiest, and C.M. Kenerley. 2007. A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* is required for induced Systemic Resistance in Maize. Plant Physiology 10: 1104.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genet Biol 42:813–828
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G. & Kubicek, C.P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species Characterized by molecular data. Mycoscience 47: 55-54.
- Enrique, G. 2004. Cacao orgánico, Guía para Productores Ecuatorianos, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agro- pecuarias (INIAP). 360 p.
- Enríquez, G. A. Brenes, O y Delgado, J. C. 1982. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. Proceeding of the Eight Interamerican Cacao Conference, 1981. Cartagena, Colombia. Cocoa producer's alliance, p.p 375-380.
- Ezziyani, M., Pérez-Sánchez, C., Sid-Ahmed, A., Requena, M. E. y Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Universidad de Murcia, España. Anales de Biología 26: 35-45.
- FAO. 2009. Food and Agriculture Organization, <http://faostat.fao.org>. Rome. (Último acceso: 5 de marzo del 2012)

- Fernández, O., Vega L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Revista manejo integrado de plagas. Costa rica. 62, p. 96- 100.
- Font Quer, P. 1974. Botánica Pintoresca. Ed. Labor
- Fulton, R.H. 1989. The cacao disease trilogy: Black pod, Monilia pod rot, and Witches' Broom. Plant Disease 73:601-603.
- Gregory, P.H. 1974. *Phytophthora* Disease of Cacao. London, UK, Longman.
- Guzmán, G., F. Tapia, 1995. New species, new combinations and new records of Veligaster (Sclerodermataceae). Documents Mycologiques 25 (98-100): 185-195.
- Guzmán-Dávalos, L. 2000. Los estudios sobre Agaricales en México. Boletín IBUG, Época 3, 6: 279-295.
- Hajek A.E. 2004. Natural Enemies. An introduction to biological control. Cambridge University Press, New York.
- Hanson, L.E., C.R. Howell. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. Phytopathology 94: 171-176.
- Hardy, F. 1960. Cacao manual. English edition. Inter-American Institute of Agricultural Sciences. Turrialba, Costa Rica. PP. 229-308.
- Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84, 377-399.
- Harman G.E, Howell CR, Viterbo A, Chet I & Lorito M 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, A reviews. Nature Reviews Microbiology 2, 43-56.
- Harman G.E, Petzoldt R, Comis A, Chen J 2004b Interaction between *Trichoderma harzianum* strain T-22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on disease caused by *Phytium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 94: 147–153
- Harman, G.E., 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194.

- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol.*;66:1890–1898
- Humeres Claudio, 2004. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre aislados de hongos basidiomicetes asociados a muerte de brazos en kiwi. Facultad de Ciencias Agrarias, escuela de agronomía Talca-Chile.
- Hjeljord, I., Tronsmo, a. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. Pp. 153-169. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. HARMAN, G.E., KUBICEK, C.P. (Eds.), Tylor & Francis. Inc. Bristol, PA. USA.
- Ibarra, M.A.C., W.S. Arriaga y M.A. Estrada. 2001. Avifauna asociada a dos cacaotales tradicionales en la región de la Chontalpa, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 34: 101-112.
- Ibarra Medina. 2008. Aislamiento y Selección de cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Colegio de Postgraduados, campus Montecillos.
- INIFAP, DIRECCIÓN DE PROMOCIÓN Y DIVULGACIÓN. Inforural. 11 de Agosto de 2011. <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article79305> (último acceso: 2 de Septiembre de 2012).
- Jenson D. F. and Wolffhechel H. 1995. The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. to control root rot and damping-off diseases. In: *Biocontrol Agents: Benefits and Risks* (Hokkanen H. and Lynch J. M., eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 177-189.
- Katip J.Y. 1994. Prospección y estudio de moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*) del cacao en la Cuenca del Río Marañón. Tesis Ing. Agr. Tingo, Perú: UNAS. 94 p
- Kindermann J, El-Ayouti Y, Samuels GJ, Kubicek CP. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA clade. *Fungal Genet Biol.*, 24:298–309.
- Klein, D, Eveleigh, D.E; 1998. Ecology of *Trichoderma* In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London, p. 57-74.
- Krauss U., M. Hoopen, E. Hidalgo, A. Matínez, T. Stirrup, C. Arroyo, J. García and M. Palacios. 2006. The effect of cane molasses amendment biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Panama. *Biological Control* 39(2): 232-239.

- Krauss, U., and Soberanis, W. 2001. Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry System* 53:179-184.

- Kubicek, C.P; Penttila, M.E; 1998. Regulation of Production of Plant Polysaccharide Degrading Enzymes by *Trichoderma*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis Ltd; London, p.49-71.

- Kubicek CP, Bissett J, Kullnig-Gradinger CM, Druzhinina IS, Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol.*, 38(3):310–317.

- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Börner T, Meyer W, Kubicek CP. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia.*; 89:442–460.

- Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP. 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* – a multigene approach. *Mycol Res.*; 106:757–767.

- Larralde-Corona, C.P., Santiago-Mena, M.R., Sifuentes-Rincon, A.M; Rodriguez-Luna, I.C., Rodriguez-Perez, M.A., Shirai, K; & Narvaez-Zapata, J.A. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 167-177.

- Leach, A.W., Mumford, J.D., and Krauss, U. 2002. Modelling *Moniliophthora roreri* in Costa Rica. *Crop Protection* 21:317-326.

- Lieckfeldt E, Samuels GJ, Börner T, Gams W 1998. *Trichoderma koningii*: neotypification and *Hypocrea* teleomorph. *Canadian Journal of Botany* 76:1507–1522.

- Lieckfeldt E, Samuels GJ, Nirenberg HI, Petrini O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Apply Environ Microbiol.*; 65:2418–2428.

- Lopez A.G., Huerta G., Sanchez J.E. 1996. Contamination encountered during various phases of cultivation of *Pleurotus ostreatus* in tropical Mexico. In: Proceed. II International conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. D. Royse (ed.). Pp.495-502.

- Maddison, A.C. Macias, G., Moreira, C., Arias, R; and Neira, R. 1995. Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis pernicioso* and *Moniliophthora roreri*. *Plant pathology* 44:982-998.

- Magurran, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey. 179 p.

- Nogawa, Gotro M., Hirofumi, Yasushi M. 2001. L-sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*, *Curr Genet* 38: 329-334.

- Migheli Q, Balmas V, Komoń-Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy AG, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environ Microbiol* 11(1):35-46

- Motamayor, J.C., Risterucci, A.M; Lopez, P.A; Ortiz, C.F., Moreno, A; and Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386.

- Mukherjee, P.K., J. Latha, R. Hadar, and B.A. Horwitz. 2004. Role of Two G-Protein Alpha Subunits, TgaA and TgaB, in the Antagonism of Plant Pathogens by *Trichoderma virens* *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 542-549.

- Muñoz, D., A. Estrada y E. Naranjo. 2005. Monos aulladores (*Alouatta palliata*) en una plantación de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México: Aspectos de la ecología alimentaria. *Universidad y Ciencia* Número especial 2: 35-44.

- Nagayama, K., S. Watanabe, K. Kumakura, T. Ichikawa, and T. Makino. 2007. Development and commercialization of *Trichoderma asperellum* SKT-1 (Ecohope), a microbial pesticide. *Journal Pesticide Science* 32(2): 141-142

- Nisbet, L.J. and F.M. Fox. 1991. The importance of microbial biodiversity to biotechnology. In: D.L. Hawksworth (ed.) *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture*. pp. 229-244.

- OEIDRUS; 2009. Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable en el Estado de Tabasco. www.oeidrustab.gob.mx. (Último acceso: 12 de marzo 2013).

- Ogata, N. 2007. El cacao. *Biodiversitas* 72: 1-5.

- Ortiz, G.C.F., 1996. Etude de la diversité génétique du populations du *Phytophthora* pathogène du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Tesis Doctoral. Université Paul Sabatier-Centre du Fisiología Vegetal – CNRS. Toulouse, Francia. 85p.

- Ovando Medina, I. 2001. Endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. Tesis de Maestría en Ciencias, El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23: 23-54
- Pérez-de la Cruz, M., A. Equihua-Martínez, J. Romero-Nápoles, S. Sánchez-Soto, E. García-López y H. Bravo-Mojica, 2009. Escolítidos (Coleoptera: Scolytidae) Asociados al Agroecosistema Cacao en Tabasco, México. Neotropical Entomology 38: 1-8.
- Phillips-Mora, W. 2004. La moniliasis del cacao: una seria amenaza para el cacao en Mexico. In: Simposio Nacional sobre enfermedades tropicales. Resúmenes de ponencias. Tabasco, México.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, C.F., López, A.P., Hernández, J., and Aime, M.C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. Plant Pathology 55:584.
- Plenge-Tellechea, Sierra-Fonseca y Castillo-Sosa. 2007. Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas. Tecnociencia Chihuahua, Vol. I, No. 3.
- Rangel, J.F. 1982. Desenvolvimiento y participación. CEPLAC-CACAU. Año 25. Instituto Interamericano para la Cooperación con la Agricultura. Brasil. 138 p.
- Rehner, S. A. & Samuels, G. J. 1995 Molecular systematics of the Hypocreales, a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. Canadian Journal of Botany 73 (Supply 1) : S 816-S823.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. - Mycol. Pap. 116: 1-56.
- Rincon, G. 1992: "Control Biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* spp. En semilleros de café". Cenicafé 43(3): 73-83.
- Rivas, M. y Pavone, D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del 8 estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. 9 Interciencia 35(10), 777-783.
- Roiger, D.J; Jeffers, S.N. and Caldwell, R.W. 1991. Ocurrance of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. Soil Biology and Biochemistry 23, 353-359.
- Rojas, T., & Goitía, W. 2004. Riqueza y abundancia de hongos entomógenos en tres sistemas de manejo de cacao en Choroní, Venezuela. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No, 71, 46-53.

- Rorer, J.B. 1926. Ecuador cacao (Part 1). Tropical agricultura (Trinidad) 3: 46-47.
- Rosique, E. 2004. Diversidad y abundancia de los hongos microscópicos del suelo de un tinal de Tabasco, México. Tesis, Maestría Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 116 p.
- Rossman, A. 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. Mycologia 88(1): 1-19.
- Samuels, 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research. 100: 923-935.
- Sánchez L., Gamboa E., Rincón J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estado Barinas Rey Fac. Agron. (LUZ)20: 188-194
- Sanchez Perez, M. I. 2011. Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma spp.* Nativos del norte de Tamaulipas (Tesis Doctoral).
- Sanchez y porras 1991. Enfermedades del cacao, fundación hondureña de investigación agrícola., procacao. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Febrero 1991.
- Sanchez, J.A. 1982. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con *Moniliophthora roreri*. Tesis M.Sc. Turrialba, UCR-CATIE. 55 p.
- Scherr, S.J. 1983. Resolving the agricultura- petroleum conflict: The experiences of cocoa smallholders in Mexico. Department of agricultural Economics. Cornell University. Ithaca, New Cork. 233 p.
- Shores, M., I. Yedidia & I. Chet. 2005. Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Phytopathology, 95:76-84.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2009, <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>, (Último acceso Mayo 2013).
- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (Eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, U. K. pp 139-191.
- SMITH. W.H. 1995. Forest occurrence of *Trichoderma* species., emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation. Ecotoxicol. Environ. Safety 32: 179-183.

- Subramanian C.V. (1983). *Hyphomycetes., taxonomy and biology* 1ª Ed). Academic Press, Nueva York, 502.
- Thurston, H.D. 1998. *Tropical Plant Disease*. 2da. Ed. APS PRESS Ed. The American Phytopathological Society. 200 p.
- Torres-de la Cruz M, Ortiz-García CF, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A. and Nava-Díaz C. 2011. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans et al.] Of cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology* 93:31-36.
- Vera R, Moreno B, Acevedo R, Trujillo E. 2005. Caracterización de *Trichoderma spp.* por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas.
- Villacide y Corley. 2012. *Introducción a la teoría del control biológico de plagas, serie técnica: Manejo integrado de plagas forestales; editorial Cambio Rural INTA.*
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M 2008 *Trichoderma–plant–pathogen interactions*. *Soil Biol Biochem* 40:1–10
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. 1995 [AFLP: a new technique for DNA fingerprinting](#). *Nucleic Acids Res.* 11; 23(21):4407-14.
- Wardle, D.A., Parkinson, D., and Waller, J.E. 1993. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* 94:165-172.
- Whitlock, B., Bayer, C., y Baum, D. 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae “Sterculiaceae” or Malvaceae based on sequences of the chloroplast gen ndhF. *Systematic Botany* 26:240-437.
- Windham M., Y. Elad and R. Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 76 (5):518-521
- Yedidia, I., M. Shores, K. Kerem, N. Benhamou, Y. Kapulnik & I. Chet. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:7343-53.
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubicek, C., & Xu, T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 251, No. 2, (August 2005), pp.251-257.

