



IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS A *Phytophthora cinnamomi* Rands EN BOSQUES DE ENCINO DE EL ARRAYANAL, COLIMA Y TECOANAPA, GUERRERO

IDENTIFICATION OF FUNGI POTENTIALLY ANTAGONIST TO *Phytophthora cinnamomi* Rands IN OAK FOREST AT THE EL ARRAYANAL, COLIMA AND TECOANAPA, GUERRERO

Alejandra Almaraz-Sánchez^{*}; Dionicio Alvarado-Rosales¹; Bertha Tlapal-Bolaños²; David Espinoza-Victoria³

¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5, Carretera México-Texcoco, C. P. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Correo-e: alejandraas@colpos.mx (*Autor para correspondencia).

²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5, Carretera México-Texcoco, C. P. 56230, Chapingo, Texcoco, Estado de México.

³Programa de Edafología, Colegio de Postgraduados, km 36.5, Carretera México-Texcoco, C. P. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar morfológica y molecularmente la micoflora que posee propiedades antagonistas sobre *Phytophthora cinnamomi*, asociada al suelo del bosque de encino (*Quercus* spp.) de El Arrayanal, Colima, y de Tecoanapa, Guerrero. En estas localidades se realizaron dos muestreos de suelo colectándose muestras compuestas de suelo-raíz alrededor de los árboles con diferentes edades y condiciones sanitarias en rodales afectados por *P. cinnamomi*. Los hongos se identificaron morfológicamente mediante la técnica de dilución de suelo PDA-TS (papa-dextrosa-agar-tergitol-estreptomycina). Con los aislamientos obtenidos se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro*. Los aislamientos de *Trichoderma*, *Cordyceps bassiana* y *Paecilomyces* son los que ejercieron mejor biocontrol al reducir el desarrollo de *P. cinnamomi* mostrando mecanismos sobresalientes de competencia por espacio y micoparasitismo. Los hongos se caracterizaron molecularmente amplificando la región intergénica (ITS) de los genes ribosomales mediante la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se reportan por vez primera a *C. bassiana*, *Cladosporium tenuissimum* y seis especies de *Trichoderma* asociadas al bosque de encino en México.

Recibido: 05 de septiembre de 2011
Aceptado: 14 de julio de 2012
doi:10.5154/r.rchscfa.2011.09.061
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: ITS-
rDNA, suelo, antagonismo,
Quercus.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify morphologically and molecularly the mycoflora that possesses antagonistic properties on *Phytophthora cinnamomi* associated to the oak (*Quercus* spp.) soil forest at El Arrayanal, Colima, and Tecoanapa, Guerrero. Two soil samplings were done in these sites. Soil-root samples around trees with different ages and health conditions in stands affected by *P. cinnamomi* were collected. The fungi were morphologically identified by soil dilution PDA-TS (potato-dextrose-agar-tergitol-streptomycin) technique. With the obtained isolates, *in vitro* antagonism tests were done. *Trichoderma* spp, *Cordyceps bassiana* and *Paecilomyces* isolates, showed the best biological control by reducing *P. cinnamomi* development and showing outstanding mechanisms of space competition and mycoparasitism. The fungi were molecularly characterized by amplifying the intergenic region (ITS) of the ribosomal genes by the amplification of polymerase chain reaction (PCR) technique. For the first time *C. bassiana*, *Cladosporium tenuissimum* and six *Trichoderma* species associated with oak forests in Mexico are reported.

KEYWORDS:
ITS- rDNA, soil,
antagonism, *Quercus*

INTRODUCCIÓN

El suelo es el medio donde se desarrolla la vida de innumerables formas de organismos que tienen una gran variedad de actividades, y que contribuyen a incrementar la capacidad productiva del mismo. En un solo gramo de tierra podemos encontrar millones de microorganismos benéficos; bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios (Alexander, 1980).

INTRODUCTION

Soil is the environment in which life of myriad forms of organisms develops with a wide variety of activities and that contribute to increase soil productivity capacity. In one gram of soil it is possible to find millions of beneficial microorganisms such as bacteria, actinomycetes, fungi, algae and protozoa (Alexander, 1980).

La actividad de los hongos en el suelo de los bosques es importante para el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos, particularmente en el ciclo del carbono. El ambiente del suelo contiene factores biológicos, químicos y físicos que ejercen efecto sobre la micoflora (Burgess & Raw, 1971). Los hongos son microorganismos activos en el desarrollo de la estructura del suelo; comúnmente el número de hongos por gramo de suelo se ha cuantificado en 8,000 a más de un millón; esto probablemente puede ser equivalente a 1,000 o 1,500 kg·ha⁻¹, a 20 cm de profundidad. Aunque la cantidad de bacterias en el suelo es más alta, los hongos son de tamaño superior y presentan una masa mayor de desarrollo por unidad de volumen de suelo (Campbell, Johnson, Philpot, & Warnock, 1996).

Por otra parte, existen grupos importantes de antagonistas que pueden ser aprovechados en el control biológico y que crecen de manera natural en la rizósfera; entre ellos se encuentran las micorrizas, hongos, bacterias y actinomicetos (Álvarez & Ferrera-Cerrato, 1994; Papavizas, 1985). La "enfermedad de la tinta"; ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, está propiciando el incremento de hectáreas afectadas en áreas boscosas de encino en México (Alvarado-Rosales et al., 2007; Alvarado-Rosales, Saavedra-Romero, & Almaraz-Sánchez, 2008). Sin embargo, el control de la enfermedad no puede ser realizado a través de productos químicos debido al costo que implican y al tipo de cultivo, por lo que una opción es el uso de biocontroladores nativos. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue identificar morfológica y molecularmente la micoflora que posee propiedades antagonistas sobre *P. cinnamomi*, asociada al suelo del bosque de encino (*Quercus* spp.) de El Arrayanal, Colima, y de Tecoaanapa, Guerrero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de las áreas de estudio

El Arrayanal se encuentra ubicado en el municipio de Minatitlán, en la porción noroeste del estado de Colima, a una distancia aproximada de 20 km en línea recta del sur de Minatitlán y a 45 km al oeste de la ciudad de Colima. El clima se clasifica como A (w0) y BS1 (h'), cálido subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad y semiseco muy cálido. El suelo es de tipo Regosol eútrico y dístico, aunque en pequeñas superficies se pueden presentar Cambisoles crómicos y dísticos (Moreno et al., 2001).

El municipio de Tecoaanapa tiene una extensión territorial de 776.9 km² y se ubica en la Costa Chica del estado de Guerrero. El clima es w2, que corresponde a cálido subhúmedo con lluvias en verano (junio a octubre) con una precipitación de 1,300 a 1,500 mm anuales. El municipio se ubica en terrenos con pendientes fuertes a moderadas, con geología de rocas sedimentarias (calizas), predominando los suelos arenosos, delgados y pe-

Fungi activity in the forest soil is important for the biogeochemical cycles functioning, particularly the carbon cycle. The soil environment contains biological, chemical and physical factors that affect mycoflora (Burgess & Raw, 1971). Fungi are active microorganisms in the soil structure development; usually the number of fungi per gram of soil was measured on 8,000 to over a million; this can probably be equivalent to 1,000 or 1,500 kg·ha⁻¹, at 20 cm deep. Although the bacteria amount in the soil is higher, fungi are oversized and have a higher mass development per unit volume of soil (Campbell, Johnson, Philpot, & Warnock, 1996).

On the other hand, there are important antagonists groups that can be exploited in biological control and that naturally grow in the rhizosphere; among them are mycorrhizae, fungi, bacteria and actinomycetes (Álvarez & Ferrera-Cerrato, 1994; Papavizas, 1985). The «ink disease» caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands, is driving the increase of affected oak forest areas in Mexico (Alvarado-Rosales et al., 2007; Alvarado-Rosales, Saavedra-Romero, Almaraz-Sánchez, 2008). However, disease control cannot be performed through chemicals because of the cost involved and the crop type, thus, one option is the use of native biocontrol agents. Therefore, the aim of this work was to identify morphologically and molecularly the mycoflora that possesses antagonistic properties on *P. cinnamomi*, associated to El Arrayanal, (Colima) and Tecoaanapa (Guerrero) oak forest soils (*Quercus* spp).

MATERIALS AND METHODS

Study areas description

El Arrayanal is located in the town of Minatitlán-northwestern portion of Colima state, approximately 20 km directly south of Minatitlán and 45 km west of Colima city. The climate is classified as A (w0) and BS1 (h'), warm subhumid with summer rains, low humidity and very warm semidry. The soil type is Eutric Regosol and Dystric, although in small areas it can be observed chromic cambisols and Dystrics (Moreno et al., 2001).

Tecoaanapa municipality has a territory of 776.9 km² and is located in the Costa Chica of Guerrero state. The climate is w2, which corresponds to warm subhumid with summer rains (June to October) with a total annual rainfall of 1,300 to 1,500 mm. The municipality is located on land with steep to moderate slopes, with geology of sedimentary rocks (limestone), predominantly sandy soils, thin and stony (Lithosols, Rendzinas and Regosols) (Xalpatláhuac Territorial Reorganization Study, 2004; Estudio de Reordenamiento Territorial de Xalpatláhuac, 2004).

dregosos (Litosoles, Rendzinas y Regosoles) (Estudio de Reordenamiento Territorial de Xalpatláhuac, 2004).

Fase de campo

En cada localidad se seleccionaron sitios de muestreo de 0.1 ha para determinar la micoflora del suelo. En cada sitio se tomaron cinco muestras compuestas (suelo-raíz) de 1 kg, correspondientes a cinco árboles; uno ubicado en el centro y el resto en los cuatro puntos cardinales. Las muestras se colectaron a una profundidad de 10 cm de la rizósfera del árbol. En El Arrayanal se muestrearon once sitios en julio de 2005 y en febrero de 2008. En cada sitio se seleccionaron cinco árboles con diferentes edades y síntomas de la enfermedad, dando un total de 110 árboles e igual número de muestras compuestas. En Tecoaapa, la toma de muestras fue similar; 13 sitios se muestrearon en octubre de 2007 y 12 en enero de 2008, dando un total de 125 muestras y el mismo número de árboles muestreados. Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico, etiquetadas y trasladadas en una hielera para su análisis en laboratorio.

Fase de laboratorio

Determinación de la micoflora de las muestras del rizoplano

La población de la micoflora presente en el suelo de los sitios se estimó con la técnica de dilución de suelo PDA-TS (Papa-Dextrosa-Agar-Tergitol-Estreptomycin) de Steiner y Watson (1965), usando la dilución 10^{-3} .

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se realizaron bioensayos contra *P. cinnamomi* utilizando los aislamientos obtenidos (Cuadro 1) de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* y *Cladosporium*. La evaluación se hizo mediante la observación de los mecanismos de competencia, micoparasitismo y antibiosis. Para ello, en cajas Petri con medio de cultivo PDA se sembraron discos (5 mm de diámetro) de micelio activo del patógeno de siete días de edad. Los discos se colocaron en el centro de la caja y se in-

Field Phase

On each location, 0.1 ha sampling sites were selected to determine soil mycoflora. Five composite samples (soil - root) of 1 kg were collected on each site. These samples corresponded to five trees, one located in the center and the rest in the four cardinal points. Samples were collected at 10 cm depth of the tree rhizosphere. Eleven sites were sampled in July 2005 and February 2008 at El Arrayanal. On each site, five trees of different ages and disease symptoms were selected, with a total of 110 trees and an equal number of composite samples. In Tecoaapa the sampling was similar: 13 sites were sampled in October 2007 and 12 sites in January 2008, with a total of 125 samples and the same number of sampled trees. The samples were kept in plastic bags, labeled and transported in a cooler for laboratory analysis.

Laboratory phase

Mycoflora determination in the rhizoplane samples

The mycoflora population in soil of the sites was estimated using the PDA-TS (potato-dextrose-agar-Tergitol-Streptomycin) soil dilution technique by Steiner and Watson (1965), using the 10^{-3} dilution.

In vitro Antagonism tests

Bioassays against *P. cinnamomi* were done by using the isolates obtained (Table 1) from *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* and *Cladosporium* genera. The evaluation was done by observing the micoparasitism and antibiosis competition mechanisms. Disks (5 mm diameter) with seven days old active pathogen mycelium were plated in Petri dishes with PDA culture media. The discs were placed in the center of the box and incubated during 24h at room temperature (25 °C) until they reached 1cm diameter growth and then three discs of the same size with the antagonistic fungus around the colony were placed. The same procedure, with five replicates, was performed for each of the antagonists and was kept under observation (every 24 hours) during seven days.

CUADRO 1. Aislamientos nativos de El Arrayanal, Colima, y Tecoaapa, Guerrero, utilizados en los bioensayos de antagonismo contra *Phytophthora cinnamomi*.

Localidad	Hongos	Clave	Localidad	Hongos	Clave
El Arrayanal	<i>Trichoderma</i>	TC-1	Tecoaapa	<i>Trichoderma</i>	TG-1
	<i>Trichoderma</i>	TC-2		<i>Trichoderma</i>	TG-3
	<i>Trichoderma</i>	TC-4		<i>Trichoderma</i>	TG-4
	<i>Trichoderma</i>	TC-6		<i>Trichoderma</i>	TG-6
	<i>Paecilomyces</i>	PC		<i>Cladosporium</i>	CG
	<i>Cladosporium</i>	CC		<i>Paecilomyces</i>	PG
	<i>Gliocladium</i>	GC			

TABLE 1. Native isolates from El Arrayanal (Colima) and Tecoaapa (Guerrero) used in the antagonism bioassays against *Phytophthora cinnamomi*.

Location	Fungi	Key	Location	Fungi	Key
El Arrayanal	<i>Trichoderma</i>	TC-1	Tecoanapa	<i>Trichoderma</i>	TG-1
	<i>Trichoderma</i>	TC-2		<i>Trichoderma</i>	TG-3
	<i>Trichoderma</i>	TC-4		<i>Trichoderma</i>	TG-4
	<i>Trichoderma</i>	TC-6		<i>Trichoderma</i>	TG-6
	<i>Paecilomyces</i>	PC		<i>Cladosporium</i>	CG
	<i>Cladosporium</i>	CC		<i>Paecilomyces</i>	PG
	<i>Gliocladium</i>	GC			

cubaron por 24 h a temperatura ambiente (25 °C) hasta alcanzar 1 cm de diámetro de crecimiento. Alcanzado dicho diámetro, se colocaron tres discos del mismo tamaño del hongo antagonista alrededor de la colonia. El mismo procedimiento, con cinco repeticiones, se realizó para cada uno de los antagonistas y se mantuvieron bajo observación (cada 24 h) durante siete días.

Identificación morfológica y molecular de las especies antagónicas

Los aislamientos se cultivaron en PDA e incubaron a 24 °C con luz blanca constante por cinco días. De cada aislamiento se midieron 100 esporas y se observó el tipo de micelio, fiálide y presencia o ausencia de clamidosporas. La caracterización morfológica de *Trichoderma* se hizo con ayuda de las claves de Kubicek y Harman (1998). Los Hyphomycetes *Gliocladium* y *Paecilomyces* se identificaron con las claves de Domsch, Gams, y Anderson (1980). El hongo *Cladosporium* fue identificado con las claves de Barnett y Hunter (1998). La especie de *Phytophthora* se identificó con las claves de Waterhouse (1963) y Erwin y Ribeiro (1996).

La identificación molecular de los aislamientos purificados se hizo mediante la extracción de ADN con la técnica de Ahrens y Seemuller (1992). La calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer (modelo Lambda Bio10). Con la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) se amplificaron las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) utilizando los iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), de los genes ARNr (ácido ribonucleico ribosomal), subunidades 18S-5.8S y 5.8S-28S (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). En cada mezcla de PCR se utilizó un volumen final de 25 µL con la siguiente formulación: 13.22 µL de agua ultrapura estéril, 2.5 µL de solución amortiguadora (TBE 1X), 2.08 µL de MgCl₂ (2.5 mM), 2 µL de dNTPs (2.0 mM), 2 µL de cada uno de los iniciadores ITS5 e ITS4 (20 pmol), 0.2 µL de Taq DNA polimerasa (1.5 U) y 1 µL de ADN (80 ng). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer (modelo CT 2400) con el siguiente programa

Morphological and molecular identification of antagonistic species

The isolates were cultivated on PDA culture media and incubated at 24 °C with constant white light during five days. From each isolated fraction, 100 spores were measured and observed for mycelium type, phialides and chlamydospores presence or absence. The *Trichoderma* morphological characterization was done using Kubicek and Harman (1998) keys. The Hyphomycetes *Paecilomyces* and *Gliocladium* were identified with Domsch, Gams & Anderson (1980) keys. *Cladosporium* fungus was identified with Barnett and Hunter (1998) keys. *Phytophthora* species was identified with Waterhouse (1963) and Erwin and Ribeiro (1996) keys.

The molecular identification of purified isolates was done by extracting DNA with Ahrens and Seemuller (1992) technique. DNA quality was verified by 0.8 % agarose gel electrophoresis and was quantified on a Perkin Elmer spectrophotometer (Model Lambda Bio10). Using the PCR technique (Polymerase Chain Reaction), the ITS (Internal Transcribed Spacer) regions were amplified using the ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) primers from the rRNA (ribosomal ribonucleic acid) genes, 18S- 5.8S and 5.8S- 28S subunits (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). On each PCR mixture, a final volume of 25 µL was used with the following formulation: 13.22 µL of sterile ultrapure water, 2.5 µL of buffer (1X TBE), 2.08 µL of MgCl₂ (2.5 mM), 2 µL of dNTPs (2.0 mM), 2 µL of each ITS5 and ITS4 primers (20 pmol), 0.2 µL of Taq DNA polymerase (1.5 U) and 1 µL of DNA (80 ng). The reaction was conducted in a Perkin-Elmer thermocycler (model CT 2400) with the following program: initial denaturation at 95 °C during 2 min; 30 denaturation cycles at 95°C during 1 min; alignment at 50 °C during 30s; extension at 72 °C during 2 min, and final extension at 72 °C during 10 min. The amplified fragment was purified using the Qiagen® KIT. The fragment quality was verified in 1 % agarose gel electrophoresis and it was stained with ethidium bromide. The produced band was visualized in a transilluminator (Gel Doc 2000, BIO-RAD®). The PCR product was sent for sequencing at Macrogen

ma: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 2 min; y extensión final a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se purificó con el KIT Quiagen®. La calidad del fragmento se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se tiñó con bromuro de etidio. La banda producida se visualizó en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO-RAD®). El producto de PCR se envió al laboratorio de Macroge en Estados Unidos para su secuenciación (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Macroge), en dos direcciones (5'→3' y 3'→5') con los iniciadores ITS5 e ITS4. Las secuencias de estudio se depositaron en el Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se compararon de manera individual con las secuencias allí disponibles. De los valores cuantitativos generados, sólo se bajaron las secuencias con valor alto para su comparación con las secuencias de estudio. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW versión 1.6.

Aislamiento y caracterización molecular de *P. cinnamomi*

P. cinnamomi fue aislado del suelo de los árboles de bosques de encino en El Arrayanal y Tecoaapa. Los árboles presentaban síntomas ocasionados por el patógeno, como marchitez, muerte regresiva, clorosis, defoliación prematura y presencia de canchales con exudado y tinción de la corteza. Los aislamientos se cultivaron en medio de cultivo selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, PCNB [pentaclorobenzene], himexazol). Posteriormente, se cultivaron en PDA e incubaron a 25 °C en oscuridad constante por seis días. De cada aislamiento se midieron 100 esporangios, los cuales se identificaron con las claves de Waterhouse (1963) y Erwin y Ribeiro (1996). La caracterización molecular se realizó con el método de Ahrens y Seemuller (1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hongos aislados de los suelos de El Arrayanal, Colima, y Tecoaapa, Guerrero

En el Cuadro 2 se presentan los aislamientos obtenidos en los sitios de estudio. En El Arrayanal se cuantificaron 5,525 aislamientos agrupados en 10 géneros en las dos épocas de muestreo (julio 2005 y febrero 2008). En Tecoaapa se obtuvieron 6,800 aislamientos y se identificaron ocho géneros en los dos periodos de muestreo (octubre 2007 y enero 2008).

En el primer muestreo de El Arrayanal, el número de aislamientos más frecuentes correspondió al género *Penicillium*, obteniendo 71.46 % respecto del total. En menor porcentaje se identificaron los géneros *Aspergillus* (12.95 %), *Cunninghamella* (0.79 %), *Fusarium* (0.36 %), *Gliocladium*

lab in the U.S. (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Macroge) in two directions (5'→3' and 3'→5') with ITS4 and ITS5 primers. Study sequences were deposited in the Gene Bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and were compared individually with sequences available there. From the quantitative values generated, only sequences with high value were downloaded for comparison with the sequences of study. Sequences were aligned with ClustalW software version 1.6.

P. cinnamomi isolation and molecular characterization

P. cinnamomi was isolated from trees soil of the oak forests at El Arrayanal and Tecoaapa. The trees were showing symptoms caused by the pathogen, such as wilting, dieback, chlorosis, premature defoliation and presence of dark bleeding cankers. The isolates were grown in selected culture media PARPH (pimaricin, ampicillin, rifampicin, PCNB [pentachloronitrobenzene], hymexazol). Then they were cultivated on PDA and incubated at 25 °C in constant darkness during six days, after this time, 100 sporangia from each isolate were measured, which were identified with Waterhouse (1963) and Erwin and Ribeiro (1996) keys. Molecular characterization was performed with Ahrens and Seemuller (1992) method.

RESULTS AND DISCUSSION

Fungi isolated from El Arrayanal (Colima) and Tecoaapa, (Guerrero) soils

Table 2 presents the isolates obtained in the study areas. At El Arrayanal, 5,525 isolates were quantified grouped in 10 genera in the two sampling periods (July 2005 and February 2008). In Tecoaapa, 6,800 isolates were obtained and eight genera were identified in the two sampling periods (October 2007 and January 2008).

During the first sampling at El Arrayanal, the most frequent isolates corresponded to the genus *Penicillium* with 71.46 % of the total. At lower percentage *Aspergillus* (12.95 %), *Cunninghamella* (0.79 %), *Fusarium* (0.36 %), *Gliocladium* (0.30 %), *Mucor* (3.16 %), *Paecilomyces* (5.96 %), *Rhizopus* (0.42 %) and *Trichoderma* (4.60 %) were identified. During the second sampling, the most frequent isolates were also the genus *Penicillium* (80.01 %) and in lower percentage *Gliocladium* (0.51 %), *Aspergillus* (4.1 %), *Cladosporium* (1.54 %), *Cunninghamella* (0.77 %), *Fusarium* (3.86 %), *Paecilomyces* (2.0 %) and *Trichoderma* (7.21 %).

In Tecoaapa, eight genera were identified in the first sampling. Most isolates were *Penicillium* with 67.91 %. *Aspergillus* (6.5 %), *Cladosporium* (0.54 %), *Cunninghamella* (3.8 %), *Fusarium* (3.5 %), *Mucor* (1.1 %), *Paecilomyces* (3.8 %) and *Trichoderma* (12.85 %) were obtained at lower percentages. In the second sampling, the

CUADRO 2. Número de aislamientos (propágulos por gramo de suelo) obtenidos en El Arrayanal, Colima, y Tecoaapa, Guerrero.

Géneros	El Arrayanal		Tecoanapa	
	julio, 2005	febrero, 2008	octubre 2007	enero 2008
<i>Aspergillus</i>	213	160	240	210
<i>Cladosporium</i>	-	60	20	-
<i>Cunningamella</i>	13	30	140	10
<i>Fusarium</i>	6	150	130	20
<i>Gliocladium</i>	5	20	-	-
<i>Mucor</i>	52	-	40	60
Oomycete	10	-	20	-
<i>Paecilomyces</i>	98	80	140	80
<i>Penicillium</i>	1,039	2,970	2,430	330
<i>Rhizopus</i>	7	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	75	280	470	320
Zygomycete	127	130	30	110
Total	1,645	3,880	3,660	3,140

(0.30 %), *Mucor* (3.16 %), *Paecilomyces* (5.96 %), *Rhizopus* (0.42 %) y *Trichoderma* (4.60 %). En el segundo muestreo, los aislamientos más frecuentes también fueron del género *Penicillium* (80.01 %) y en menor porcentaje *Gliocladium* (0.51 %), *Aspergillus* (4.1 %), *Cladosporium* (1.54 %), *Cunningamella* (0.77 %), *Fusarium* (3.86 %), *Paecilomyces* (2.0 %) y *Trichoderma* (7.21 %).

En Tecoaapa se identificaron ocho géneros en el primer muestreo. La mayoría de los aislamientos correspondieron a *Penicillium*, el cual representó 67.91 %. En menor porcentaje se obtuvieron *Aspergillus* (6.5 %), *Cladosporium* (0.54 %), *Cunningamella* (3.8 %), *Fusarium* (3.5 %), *Mucor* (1.1 %), *Paecilomyces*, (3.8 %) y *Trichoderma* (12.85 %). En el segundo muestreo, los géneros obtenidos fueron los mismos, excepto por la ausencia de *Cladosporium* y la clase Oomycetes. Los porcentajes variaron, pero el género *Penicillium* fue dominante con 77.67 %. En menor porcentaje se identificaron *Aspergillus* (6.7 %), *Cunningamella* (0.32 %), *Fusarium* (0.64 %), *Mucor* (1.92 %), *Paecilomyces* (2.55 %) y *Trichoderma* (10.2 %).

genera obtained were the same except for the *Cladosporium* and Oomycetes absence. The percentages varied, but the genus *Penicillium* was dominant with 77.67 %. In smaller percentage *Aspergillus* (6.7 %), *Cunningamella* (0.32 %), *Fusarium* (0.64 %), *Mucor* (1.92 %), *Paecilomyces* (2.55 %) and *Trichoderma* (10.2 %) were identified.

Based on the results, it was determined that most genera was found in July in El Arrayanal and in October in Tecoaapa. The dominance of the genus *Penicillium* in both soils is because it is a soil permanent colonizer and plays an important role in the cleavage of various substrates. *Penicillium's* behavior as saprophyte allows it to stay always in the ground, compared to the other fungi species that only grow and develop at certain times, especially when the soil has moisture (Agrios, 2001; Cibrián-Tovar, Alvarado, & García, 2007). The dynamics of the other genera was different in both samplings. These results agree with other literature reports. Sharma (1981), reports that the genera that dominate the forest soils are *Penicillium*, *Trichoderma* and *Fusar-*

TABLE 2. Number of isolates (propagules per gram of soil) obtained in El Arrayanal (Colima) and Tecoaapa (Guerrero)

Genera	El Arrayanal		Tecoanapa	
	July, 2005	February, 2008	October 2007	January, 2008
<i>Aspergillus</i>	213	160	240	210
<i>Cladosporium</i>	-	60	20	-
<i>Cunninghamella</i>	13	30	140	10
<i>Fusarium</i>	6	150	130	20
<i>Gliocladium</i>	5	20	-	-
<i>Mucor</i>	52	-	40	60
Oomycete	10	-	20	-
<i>Paecilomyces</i>	98	80	140	80
<i>Penicillium</i>	1,039	2,970	2,430	330
<i>Rhizopus</i>	7	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	75	280	470	320
Zygomycete	127	130	30	110
Total	1,645	3,880	3,660	3,140

Con base en los resultados se determinó que el mayor número de géneros se encontró en el mes de julio en El arrayanal y en octubre en Tecoaapa. La dominancia del género *Penicillium* en ambos suelos se debe a que es un colonizador permanente del suelo y desempeña un papel importante en el desdoblamiento de diferentes sustratos. El comportamiento de *Penicillium* como saprofito le permite permanecer siempre en el suelo, en comparación con las otras especies de hongos que sólo crecen y se desarrollan en ciertas épocas, principalmente cuando el suelo presenta humedad (Agrios, 2001; Cibrián-Tovar, Alvarado, & García, 2007). La dinámica del resto de los géneros fue diferente en ambos muestreos. Estos resultados concuerdan con lo que se consigna en la literatura. Sharma (1981) reporta que los géneros que predominan en suelos de bosque son *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*. Lumley, Gignac, y Currah (2001) mencionan que las especies más comunes aisladas de suelo en bosque de *Populus* y *Picea* pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mortierella* y *Aspergillus*. Por su parte, Martínez, Valenzuela y Godoy (2005)

ium. Lumley, Gignac, & Currah (2001) reported that the most common species isolated from soil in *Populus* and *Picea* forest belong to the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mortierella* and *Aspergillus*. Meanwhile, Martínez, Valenzuela and Godoy (2005) found that the most abundant fungi in regions of Alberta, Canada, were *Penicillium*, *Mortierella* and *Trichoderma*. In general, *Penicillium* is present in most Mexico forest soils (Cibrián et al., 2007). Kubatova (1996) reports that this fungus can also be found in declining forests (oak and coniferous forests) and that may be associated with wood-staining fungi (*Ophiostoma* and *Trichoderma*).

Moniliaceae family, where *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* belong to, is causing economic losses in stock, natural forests, plantations and nurseries (Cibrián et al., 2007). Oomycetes and Zygomycetes are organisms found in all terrestrial environments, and its parasitism varies from necrotrophic to biotrophic. In the Mucorales order there are some important genera from the forest point of view such as *Rhizopus* and *Mucor*. Many of these are

observaron que los hongos más abundantes en las regiones de Alberta, Canadá, fueron *Penicillium*, *Mortierella* y *Trichoderma*. En general, *Penicillium* se encuentra en los suelos forestales de México (Cibrián et al., 2007). Kubatova (1996) menciona que este hongo también se puede encontrar en bosques con declinación (encinares y bosques de coníferas) y que puede estar asociado con hongos manchadores (*Ophiostoma* y *Trichoderma*).

La familia Moniliaceae, dentro de la cual se encuentran *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, es causante de pérdidas económicas en almacén, bosques naturales,

saprophytes and grow in manure, soil, humus and other organic wastes (Cibrián et al., 2007). There are reports that the genera *Cladosporium*, *Gliocladium* and *Paecilomyces*, whose populations were low in this study, help to reduce the amount of phytopathogen inoculum that affect the root (Ahmed, Pérez-Sánchez, Egea & Candela, 1999).

Antagonism *in vitro* tests

The mechanisms of action of each fungi tested are reported in Table 3. Based on the antagonism tests, it was observed that all *Trichoderma* isolates invaded *P.*

CUADRO 3. Aislamientos confrontados con *Phytophthora cinnamomi* y mecanismos de antagonismo observados.

Origen	Organismo	Micoparasitismo	Antibiosis	Competencia
El Arrayanal	<i>Trichoderma</i> 1	√		√
	<i>Trichoderma</i> 2	√		√
	<i>Trichoderma</i> 4	√		√
	<i>Trichoderma</i> 6	√		√
	<i>Paecilomyces</i>	√		
	<i>Cladosporium</i>	√		
	<i>Gliocladium</i>		√	
Tecoanapa	<i>Trichoderma</i> 1	√		√
	<i>Trichoderma</i> 3	√		√
	<i>Trichoderma</i> 4	√		√
	<i>Trichoderma</i> 6	√		√
	<i>Cladosporium</i>	√		
	<i>Paecilomyces</i>		√	

TABLE 3. Isolates confronted with *Phytophthora cinnamomi* and antagonism mechanisms observed.

Source	Organism	Mycoparasitism	Antibiosis	Competition
El Arrayanal	<i>Trichoderma</i> 1	√		√
	<i>Trichoderma</i> 2	√		√
	<i>Trichoderma</i> 4	√		√
	<i>Trichoderma</i> 6	√		√
	<i>Paecilomyces</i>	√		
	<i>Cladosporium</i>	√		
	<i>Gliocladium</i>		√	
Tecoanapa	<i>Trichoderma</i> 1	√		√
	<i>Trichoderma</i> 3	√		√
	<i>Trichoderma</i> 4	√		√
	<i>Trichoderma</i> 6	√		√
	<i>Cladosporium</i>	√		
	<i>Paecilomyces</i>		√	

plantaciones forestales y viveros (Cibrián et al., 2007). Los Oomycetes y Zygomycetes son organismos que se encuentran en todos los ambientes terrestres, y su parasitismo varía desde necrotróficos a biotróficos. En el orden de los Mucorales se encuentran algunos géneros de importancia desde el punto de vista forestal como *Rhizopus* y *Mucor*. Muchos de éstos son saprofitos y crecen en estiércol, suelo, humus y otros desechos orgánicos (Cibrián et al., 2007). Existen reportes que indican que los géneros *Cladosporium*, *Gliocladium* y *Paecilomyces*, cuyas poblaciones fueron bajas en este estudio, contribuyen a disminuir la cantidad de inóculo de fitopatógenos que afectan la raíz (Ahmed, Pérez-Sánchez, Egea & Candela, 1999).

Pruebas de antagonismo *in vitro*

En el Cuadro 3 se reportan los mecanismos de acción de cada uno de los hongos evaluados. Con base en las pruebas de antagonismo, se observó que todos los aislamientos de *Trichoderma* invadieron las colonias de *P. cinnamomi* por el mecanismo de competencia, y en algunos casos debido al micoparasitismo ocasionaron lisis. En todas las confrontaciones, los aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de reducir el crecimiento y desarrollo del patógeno (Figura 1). La colonización del área compitiendo por espacios y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio del patógeno (Dennis & Webster, 1971), lo que permite visualizar que *Trichoderma* es un buen candidato en el control biológico de *P. cinnamomi*. Las pruebas *in vitro* mostraron que existe diferencia significativa ($P = 0.05$) en el crecimiento de *P. cinnamomi* en presencia de hongos antagonistas (Figura 2).

Barnet y Binder (1973) mencionan propiedades de antagonismo de los géneros *Gliocladium*, *Cephalosporium* y *Trichoderma* como micoparásitos de hongos fitopatógenos. Por su parte, Papavizas (1985) también reportó que *Trichoderma* y *Gliocladium* constituyen dos agentes de biocontrol, cuya habilidad es actuar como micoparásitos de hongos fitopatógenos del suelo. El género *Trichoderma* se encuentra distribuido ampliamente en casi todos los suelos, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica (Kubicek & Harman, 1998). En general, *Trichoderma* spp. aumenta la actividad antifúngica al presentar una velocidad mayor de crecimiento y, como consecuencia, el tamaño de la colonia de *P. cinnamomi* se reduce. Estos resultados concuerdan con los de Soler et al. (1998), quienes observaron un efecto claro de antagonismo de *Trichoderma* contra *P. cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*, en cultivos duales *in vitro*. Al respecto, Dennis y Webster (1971) mencionan que el sobrecrecimiento es un carácter ventajoso para la colonización en la competencia por espacio y nutrientes. Los resultados del presente estudio son comparables

cinnamomi colonies by the competition mechanism, and in some cases due to mycoparasitism they caused lysis. In all comparisons, *Trichoderma* isolates were able to reduce the pathogen's growth and development (Figure 1). The colonization of the area competing for space and nutrients is a way of exerting biocontrol, by reducing or completely stopping the pathogen's mycelium development (Dennis & Webster 1971), which allows deducing that *Trichoderma* is a good candidate for *P. cinnamomi* biological control. *In vitro* tests showed that significant difference ($P = 0.05$) exists in the *P. cinnamomi* growth in the presence of antagonistic fungi (Figure 2).

Barnet and Binder (1973) reported antagonism properties of the genera *Gliocladium*, *Cephalosporium* and *Trichoderma* as mycoparasites of phytopathogenic fungi. Meanwhile, Papavizas (1985) also reported that *Trichoderma* and *Gliocladium* are two biocontrol agents, whose ability is to act as mycoparasites of phytopathogenic soil fungi. *Trichoderma* genus is widely distributed in almost all soils, especially those containing organic matter (Kubicek & Harman, 1998). In general, *Trichoderma* spp. increases antifungal activity by showing a higher growth speed and, consequently, the *P. cinnamomi* colony size is reduced. These results are in accordance with those of Soler et al. (1998), who observed a clear antagonism effect of *Trichoderma* against *P. cinnamomi* and *Rosellinia necatrix*, in dual cultures *in vitro*. In this regard, Dennis and Webster (1971) mentioned that the overgrowth is advantageous for colonization in the space and nutrients competition. The results of this study are also comparable with those obtained by Smith, Wilcox and Harman (1990) on the *Trichoderma* against *P. cactorum* activity in apple, where there was also a pathogen's growth reduction.

The *Gliocladium* and *Paecilomyces* fungi (Figure 1) inhibited pathogen's growth by antibiosis, without being in contact with the *P. cinnamomi* hyphae, since there was a free growth zone between these fungi. This shows that there is a secondary metabolites production that may be affecting pathogen's growth through antibiotics or enzymes production, so that these isolates are another potential alternative for *P. cinnamomi* biocontrol.

Antagonists species' morphological and molecular identification

Trichoderma

Trichoderma genus showed septate mycelium, simple, thin, hyaline; conidiophore hyaline; amerosporas hyaline conidia mass produced apically in green coloration on simple phialides (Figure 3). Table 4 describes the *Trichoderma* species found in El Arrayanal (TC-1, TC-2, TC-4, TC-6) and Tecoaapa (TG-1, TG-3, TG-4, TG-6).

The genus *Cordyceps bassiana* (morphologically identified as *Gliocladium*) (GC), *Paecilomyces* (PC) and *Cladosporium* (CC) were identified at El Arrayanal; while

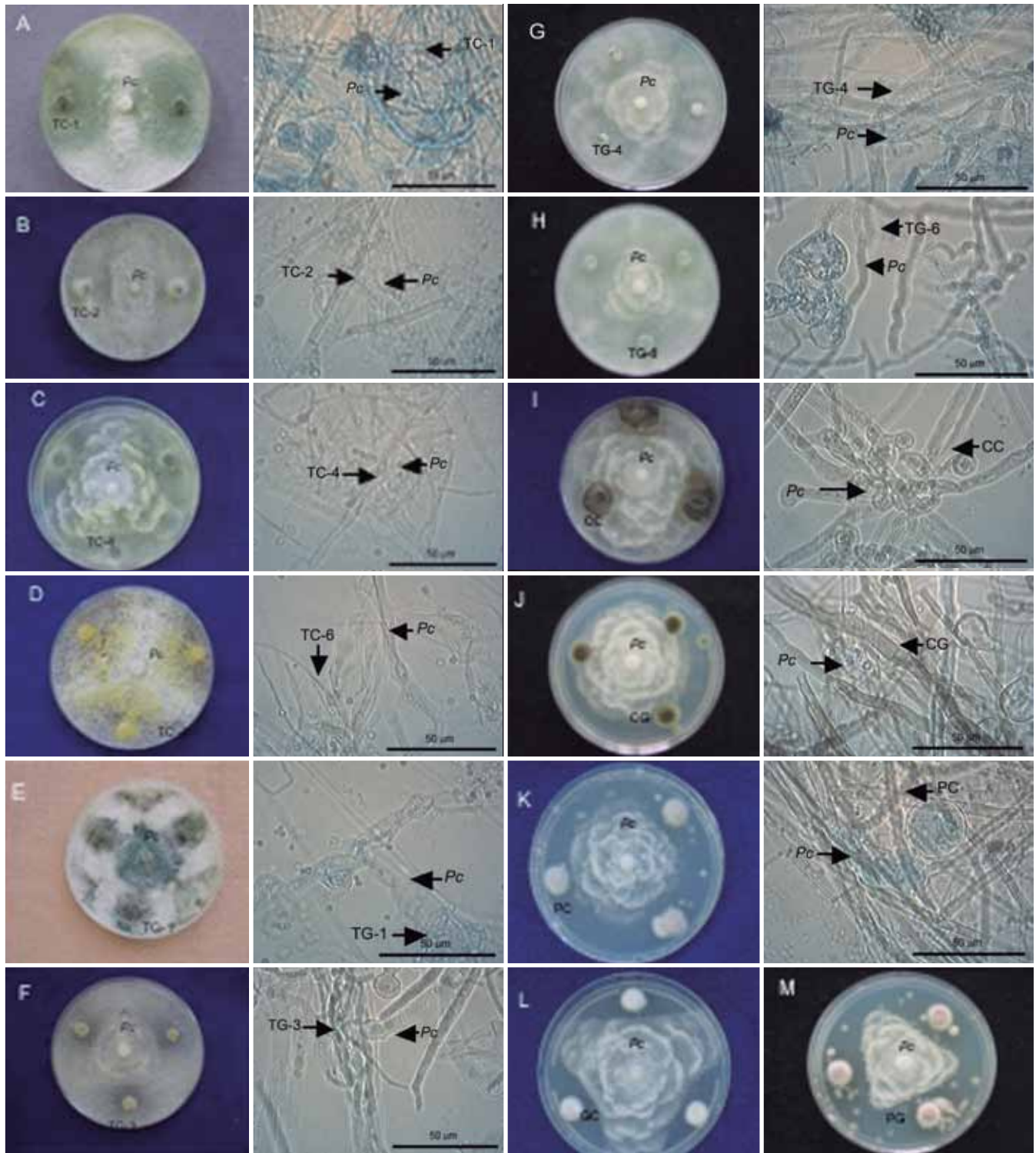


FIGURA 1. Antagonismo de los aislamientos evaluados sobre *Phytophthora cinnamomi* (*Pc*). *Trichoderma* (A [TC-1], B [TC-2], C [TC-4], D [TC-6], E [TG-1], F [TG-2], G [TG-4], H [TG-6]) actúa por micoparasitismo provocando micelio deshidratado e hifas entrelazadas; los antagonistas sobrecrecen al patógeno y cubren el 100 % de la caja. *Cladosporium* (I [CC] y J [CG]) y *Paecilomyces* (K [PC]) actúan también por micoparasitismo presentando micelio deshidratado e hifas entrelazadas. Con *Gliocladium* (L [GC]) y *Paecilomyces* (M [PG]) el crecimiento se detiene por inhibición.

FIGURE 1. Antagonism of the isolates tested on *Phytophthora cinnamomi* (*Pc*). *Trichoderma* (A [TC-1], B [TC-2], C [TC-4], D [TC-6], E [TG-1], F [TG-2], G [TG-4], H [TG-6]) acts by mycoparasitism causing dehydrated mycelium and interlaced hyphae; antagonists overgrow the pathogen and cover 100 % of the box. *Cladosporium* (I [CC] and J [CG]) and *Paecilomyces* (K [PC]) also act by mycoparasitism causing dried mycelium and interlaced hyphae. As for *Gliocladium* (L [GC]) and *Paecilomyces* (M [PG]), they stop the growth by inhibition.

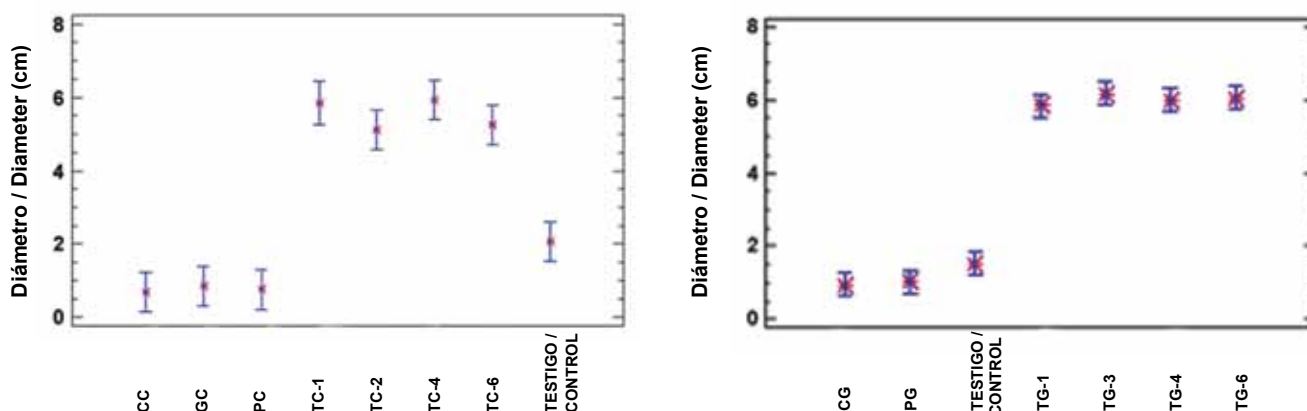


FIGURA 2. Crecimiento de hongos antagonistas de Colima (a) y Guerrero (b). Los aislamientos de *Trichoderma* (TC-1, TC-2, TC-4, TC-6, TG-1, TG-3, TG-4, TG-6), *Gliocladium* (GC), *Cladosporium* (CC-CG) y *Paecilomyces* (PC-PG) mostraron capacidad inhibitoria contra *Phytophthora cinnamomi*.

FIGURE 2. Fungi antagonists' growth from Colima (a) and Guerrero (b). *Trichoderma* isolates (TC-1, TC-2, TC-4, TC-6, TG-1, TG-3, TG-4, TG-6), *Gliocladium* (GC), *Cladosporium* (CC-CG) and *Paecilomyces* (PC-PG) showed inhibitory capacity against *Phytophthora cinnamomi*.

con los obtenidos por Smith, Wilcox y Harman (1990) en la actividad de *Trichoderma* contra *P. cactorum* en manzano, donde también se observó una reducción en el crecimiento del patógeno.

Los hongos *Gliocladium* y *Paecilomyces* (Figura 1) inhibieron el crecimiento del patógeno por antibiosis, sin tener contacto con las hifas de *P. cinnamomi*, ya que se observó una zona libre de crecimiento entre dichos hongos. Esto demuestra que existe producción de metabolitos secundarios que pueden estar afectando el crecimiento del patógeno a través de la producción de antibióticos o enzimas, por lo que estos aislamientos son otra alternativa potencial para el biocontrol de *P. cinnamomi*.

Identificación morfológica y molecular de las especies antagonistas

Trichoderma

El género *Trichoderma* presentó micelio septado, simple, delgado, hialino; conidióforo hialino; conidios hialinos amerosporas producidos apicalmente en masa de coloración verde sobre fiálides simples (Figura 3). En el Cuadro 4 se describen las especies encontradas de *Trichoderma* en El Arrayanal (TC-1, TC-2, TC-4, TC-6) y Tecoaanapa (TG-1, TG-3, TG-4, TG-6).

En el Arrayanal se identificaron a nivel de género *Cordyceps bassiana* (identificado morfológicamente como *Gliocladium*) (GC), *Paecilomyces* (PC) y *Cladosporium* (CC); mientras que en Tecoaanapa también se identificó a *Paecilomyces* (PG) y *Cladosporium* (CG).

Cordyceps bassiana (GC)

Es un microorganismo saprofito y común en los suelos. En PDA presentó micelio blanquecino algodonoso; conidióforos hialinos formando una brocha com-

in Tecoaanapa also *Paecilomyces* (PG) and *Cladosporium* (CG) were identified.

Cordyceps bassiana (GC)

This is a saprophyte microorganism very common in soils. In PDA showed white cottony mycelium; hyaline conidiophores forming a compact brush; hyaline conidia or brightly colored mass, unicellular produced apically (Figure 3).

Paecilomyces (PC and PG)

This fungus is characterized for showing conidiophores with divergent branches in PDA; chains of conidia (phialospore), unicellular, ovoid, hyaline (Barnett & Hunter, 1998) (Figure 3).

Cladosporium (CC and CG)

In PDA it showed dark conidia formed by one or two cells of variable size, ovoid, cylindrical or some lemon shape, arranged in simple or branched chain (Barnett & Hunter, 1998) (Figure 3).

Molecular characterization

The PCR products with primers ITS4 and ITS5 were approximately weighing between 500 to 550 bp (base pairs), which allowed the amplification of the bands observed in Figure 4. The sequencing results of each isolate were compared with the reported sequences in the gene bank (NCBI). Sequences in this work, considered a 90 to 100% alignment. The species registered in GenBank – getting their access number, are reported in Table 5.

CONCLUSIONS

All isolated soil fungi associated with oak trees are reported for the first time in Mexico. Also in this work, the identification of species *Trichoderma hipocrealixil*, *T. stri-*

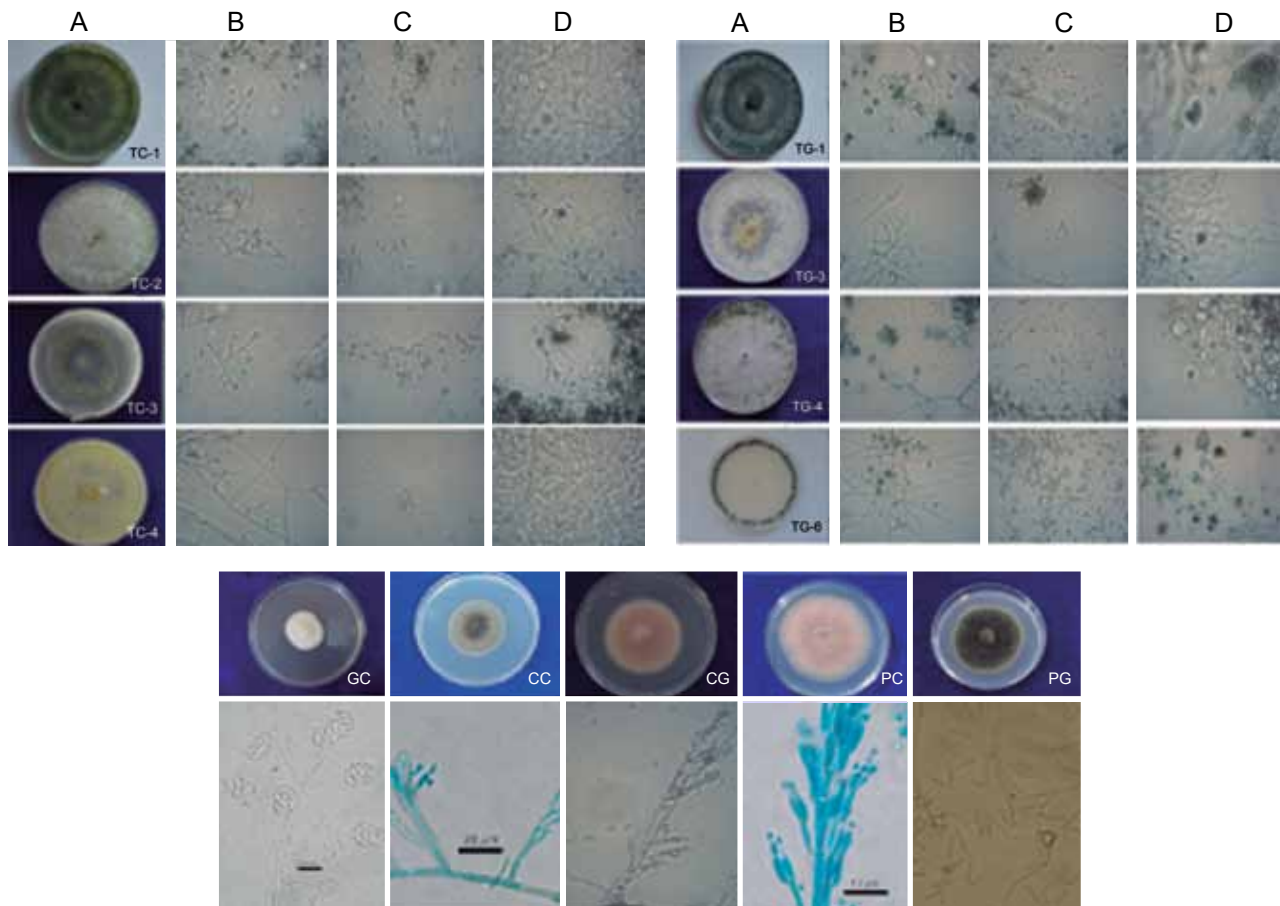


FIGURA 3. 3A) Colonias de *Trichoderma* (TC-1, TC-2, TC-4, TC-6, TG-1, TG-3, TG-4 y TG-6) de seis días de crecimiento en medio PDA a temperatura ambiente. 3B) Fiálides. 3C) Conidios. 3D) Clamidosporas (100X). 3E) Colonias de *Gliocladium* (GC), *Cladosporium* (CC, CG) y *Paecilomyces* (PC, PG) de ocho días de crecimiento en PDA a temperatura ambiente. 3F) Conidióforos y conidios (100X).

FIGURE 3. 3A) *Trichoderma* colonies (TC-1, TC-2, TC-4, TC-6, TG-1, TG-3, TG-4 and TG-6) of six days of growth on PDA media at room temperature. 3B) Phialides. 3C) Conidia. 3D) Chlamydospores (100X). 3E) *Gliocladium* colonies (GC), *Cladosporium* (CC, CG) and *Paecilomyces* (PC, PG) of eight days of growth on PDA at room temperature. 3F) Conidiophores and conidia (100X).

CUADRO 4. Mediciones comparativas para *Trichoderma* spp. de El Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero.

Especie	Clave	Conidios (µm)	Fiálides (µm)	Diámetro de la colonia (cm)*
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TC-1	3.1-3.5	6.3-10.5 x 2.1-3.1	1.5
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	TC-2	2.3-3.4	3.3-6.5 x 2.3-3.0	1.5
<i>Trichoderma hamatum</i>	TC-4	3.0-2.8	3.3-5.6 x 2.8-3.5	1.25
<i>Trichoderma atroviride</i>	TC-6	2.3-2.6	Largas y delgadas de tres a cuatro vértices	1.8
<i>Trichoderma hipocrealixil</i>	TG-1	2.1-2.9	Ocasionalmente en pares, verticiladas	1.25
<i>Trichoderma atroviride</i>	TG-3	2.7-2.6	Tres o cuatro vértices largas y delgadas	1.3
<i>Trichoderma tringosum</i>	TG-4	3.2-2.5	3.0-5.5 x 2.9-3.5	1.2
<i>Trichoderma spirale</i>	TG-6	2.4-3.2	Largas y solitarias	2.0

*Incubación por 5 días a 21 °C en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

TABLE 4. Comparative measurements for *Trichoderma* spp. from El Arrayanal (Colima) and Tecoaapa (Guerrero).

Species	Key	Conidia (µm)	Phialides (µm)	Colony diameter(cm)*
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TC-1	3.1-3.5	6.3-10.5 x 2.1-3.1	1.5
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	TC-2	2.3-3.4	3.3-6.5 x 2.3-3.0	1.5
<i>Trichoderma hamatum</i>	TC-4	3.0-2.8	3.3-5.6 x 2.8-3.5	1.25
<i>Trichoderma atroviride</i>	TC-6	2.3-2.6	Long and thin with three to four vertices	1.8
<i>Trichoderma hipocrealixil</i>	TG-1	2.1-2.9	Ocasionalmente in pairs, verticillate	1.25
<i>Trichoderma atroviride</i>	TG-3	2.7-2.6	Three to four vertices, long and thin	1.3
<i>Trichoderma tringosum</i>	TG-4	3.2-2.5	3.0-5.5 x 2.9-3.5	1.2
<i>Trichoderma spirale</i>	TG-6	2.4-3.2	Long and solitary	2.0

* Incubation during 5 days at 21 °C in Potato Dextrose Agar (PDA) culture media

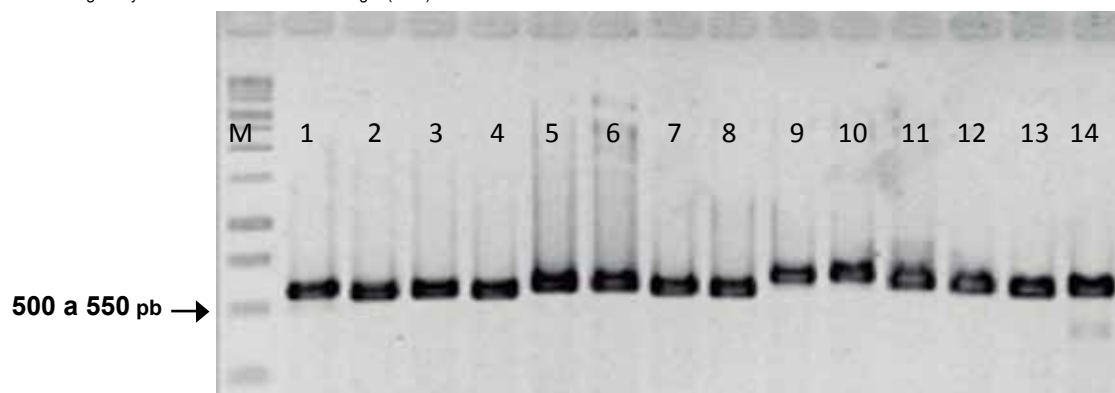


FIGURA 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del producto amplificado por PCR con los iniciadores ITS4 e ITS5. M: Marcador molecular de 1 Kb. *Trichoderma* (1 = TG-1, 2 = TG-3, 3 = TG-4, 4 = TG-6, 8 = TC-1, 9 = TC-2, 10 = TC-4, 11 = TC-6), *Gliocladium* (7 = GC) *Cladosporium* (13 = CC, 5 = CG), *Paecilomyces* (12 = CP, 6 = PG) y *P. cinnamomi* (14 = Pc).

FIGURE 4. Gel electrophoresis in 1 % agarose of the PCR amplified product with ITS4 and ITS5 primers. M: 1 Kb molecular marker. *Trichoderma* (1 = TG-1, 2 = TG-3, 3 = TG-4, 4 = TG-6, 8 = TC-1, 9 = TC-2, 10 = TC-4, 11 = TC-6), *Gliocladium* (7 = GC), *Cladosporium* (13 = CC, 5 = CG), *Paecilomyces* (12 = CP, 6 = PG) and *P. cinnamomi* (14 = PC).

pacta; conidios hialinos o brillantemente coloreados en masa, unicelulares, producidos apicalmente (Figura 3).

Paecilomyces (PC y PG)

En PDA este hongo se caracteriza por presentar conidióforos con ramas divergentes; conidios (fialosporas) en cadena, unicelulares, de forma ovoide, hialinos (Barnett & Hunter, 1998) (Figura 3).

Cladosporium (CC y CG)

En PDA presentó conidios de color oscuro formados por una o dos células de tamaño variable, ovoides o cilíndricos y algunos de forma alimonada, arreglados en cadena simple o ramificadas (Barnett & Hunter, 1998) (Figura 3).

Caracterización molecular

Los productos de PCR con los primers ITS4 e ITS5 tuvieron un peso aproximado de 500 a 550 pb (pares de bases), lo que permitió la amplificación de las bandas

gosum, *T. spirale*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. atroviride*, *Cordyceps bassiana* and *Cladosporium tenuissimum* was done. *Trichoderma*, *C. bassiana* and *Paecilomyces* isolates are the best for biocontrol because they reduced the *P. cinnamomi* development in all *in vitro* tests showing outstanding mechanisms of space competition and mycoparasitism. As a result, these native isolates are good biological control agents.

End of English Version

que se observan en la Figura 4. Los resultados de la secuenciación de cada aislamiento fueron comparados con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI). En las secuencias de este trabajo se consideró un alineamiento de 90 al 100 %. En el Cuadro 5 se reportan las especies que fueron registradas en el Banco de Genes obteniendo su número de acceso.

CUADRO 5. Identificación morfológica y molecular de aislamientos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi*.

Identificación morfológica	Clave de aislamiento	Número de nucleótidos	Especie alineada	Similaridad (%)	Número de acceso NCBI
<i>Trichoderma hipocrealixil</i>	TG-1	608	<i>T. hipocrealixil</i>	100	FJ361039
<i>T. atroviride</i>	TG-3	-	<i>Trichoderma</i> sp.	90	-
<i>T. strigosum</i>	TG-4	-	<i>T. strigosum</i>	90	-
<i>T. spirale</i>	TG-6	-	<i>T. spirale</i>	95.7	-
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	CG	545	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	99.8	FJ361040
<i>Paecilomyces</i>	PG	-	-	-	-
<i>P. cinnamomi</i>	Ha1	909	<i>P. cinnamomi</i>	100	FJ361041
<i>T. longibrachiatum</i>	TC-1	632	<i>T. longibrachiatum</i>	99	FJ361035
<i>T. citrinoviride</i>	TC-2	624	<i>T. citrinoviride</i>	99.6	FJ361036
<i>T. hamatum</i>	TC-4	-	-	-	-
<i>T. atroviride</i>	TC-6	-	<i>T. atroviride</i>	95.4	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	PC	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	CC	-	<i>Cladosporium</i>	94.7	-
<i>Gliocladium</i>	GC	560	<i>Cordyceps bassiana</i>	99.2	FJ361037
<i>P. cinnamomi</i>	<i>Pc</i>	913	<i>P. cinnamomi</i>	100	FJ361038

TABLE 5. Morphological and molecular identification of isolates antagonists to *Phytophthora cinnamomi*

Morphological identification	Isolation key	Nucleotide number	Aligned species	Similarity (%)	Access number NCBI
<i>Trichoderma hipocrealixil</i>	TG-1	608	<i>T. hipocrealixil</i>	100	FJ361039
<i>T. atroviride</i>	TG-3	-	<i>Trichoderma</i> sp.	90	-
<i>T. strigosum</i>	TG-4	-	<i>T. strigosum</i>	90	-
<i>T. spirale</i>	TG-6	-	<i>T. spirale</i>	95.7	-
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	CG	545	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	99.8	FJ361040
<i>Paecilomyces</i>	PG	-	-	-	-
<i>P. cinnamomi</i>	Ha1	909	<i>P. cinnamomi</i>	100	FJ361041
<i>T. longibrachiatum</i>	TC-1	632	<i>T. longibrachiatum</i>	99	FJ361035
<i>T. citrinoviride</i>	TC-2	624	<i>T. citrinoviride</i>	99.6	FJ361036
<i>T. hamatum</i>	TC-4	-	-	-	-
<i>T. atroviride</i>	TC-6	-	<i>T. atroviride</i>	95.4	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	PC	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	CC	-	<i>Cladosporium</i>	94.7	-
<i>Gliocladium</i>	GC	560	<i>Cordyceps bassiana</i>	99.2	FJ361037
<i>P. cinnamomi</i>	<i>Pc</i>	913	<i>P. cinnamomi</i>	100	FJ361038

CONCLUSIONES

Todos los hongos aislados del suelo asociados con el arbolado de encino se reportan por vez primera en México. Se identificaron las especies de *Trichoderma hipocrealixil*, *T. strigosum*, *T. spirale*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. atroviride*, *Cordyceps bassiana* y *Cladosporium tenuissimum*. Los aislamientos de *Trichoderma*, *C. bassiana* y *Paecilomyces* son los que ejercieron mejor biocontrol al reducir el desarrollo de *P. cinnamomi* en las pruebas *in vitro* mostrando mecanismos sobresalientes de competencia por espacio y micoparasitismo. Debido a ello, estos aislamientos nativos son buenos controladores biológicos.

REFERENCIAS

- Agrios, N. G. (2001). *Fitopatología*. México, D. F.: Editorial Limusa.
- Ahmed, S. A., Perez-Sánchez, C., Egea, C., & Candela, M. E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, 48, 58–65. doi: 10.1046/j.1365-3059.1999.00317.x
- Ahrens, U., & Seemuller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene. *Phytopathology*, 82, 828–832. Obtenido de http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.pdf
- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. México: AGT Editor.
- Álvarez, S. J. D., & Ferrera-Cerrato, R. (1994). *Los microorganismos del suelo en la estructura y función de los agroecosistemas*. México: Colegio de Postgraduados.
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. de L., Almaraz-Sánchez, A., Tlapal-Bolaños, B., Trejo-Ramírez, O., Davidson, J. M., Quiroz-Reygadas, D. (2007). Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. *Polibotánica*, 23, 1–21. Obtenido de <http://www.herbario.encb.ipn.mx/pb/pdf/pb23/1Encino.pdf>
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. de L., Almaraz-Sánchez, A. (2008). Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino (*Quercus* sp.) en Tecoaapa, Guerrero, México. *Agrociencia*, 42, 565–572. Obtenido de <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2008/jul-ago/art-8.pdf>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Barnett, H. L., & Binder, F. L. (1973). The fungal host-parasite relationship. *Annual Review of Phytopathology*, 11, 273–292. doi: 10.1146/annurev.py.11.090173.001421
- Burges, A., & Raw, F. (1971). *Biología del suelo*. Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Campbell, C. K., Johnson, E. M., Philpo, C. M. T., & Warnock, D. W. (1996). *Identification of Pathogenic Fungi*. London, UK: Public Health Laboratory Service.
- Cibrián-Tovar, D., Alvarado, R. D., & García, D. S. (2007). *Enfermedades forestales en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Dennis, L., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 363–369. doi: 10.1016/S0007-1536(71)80050-5
- Domsch, H. K., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. London, UK: Academic Press.
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. USA: APS-Press.
- Estudio de Reordenamiento Territorial de Xalpatláhuac. (2004). GEA. AC/PROCYMAF II.
- Kubatova, A. (1996). Neglected *Penicillium* spp. associated with declining trees. In R. A. Samson, & J. L. Pitt (Eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (pp. 299–307). Singapore: Taylor & Francis, Inc.
- Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (1998). *Trichoderma & Gliocladium. Vol. 1 Basic biology, taxonomy and genetics*. London, UK: Taylor & Francis.
- Lumley, T. C., Gignac L. D., & Currah, R. S. (2001). Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different decay stages in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixed wood region of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 79, 76–92. Obtenido de <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b00-135>
- Martínez, V. O., Valenzuela, F. E., & Godoy, B. R. (2005). Hongos aislados desde suelos de bosque de Araucaria-Nothofagus después de un incendio en el parque nacional Tolhuaca. *Boletín Micológico*, 20, 35–39. Obtenido de http://micologia.uv.cl/images/stories/article/17/1.5araucaria_notofagus.pdf
- Moreno, G. S., Martínez, R. A., Encino, F. J., Moreno, G. F., Rauna, T. C., Michel, M. M., & Figura, M. S. (2001). *Ejido Lic. Fernando Moreno Peña. Proceso de Afectación. Declinación del Encino*. México: Ecofor. Servicios Forestales de Impacto Ambiental.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 23–54. doi: 10.1146/annurev.py.23.090185.000323
- Sharma, G. D. (1981). Effect of fire on soil microorganism in a meghalaya pine forest. *Folia Microbiologica (Praha)*, 26, 321–327. doi: 10.1007/BF02927260
- Smith, V. L., Wilcox, W. F., & Harman, G. E. (1990). Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*, 80, 880–885. Obtenido de http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1990Articles/Phyto80n09_880.PDF
- Soler, A., Grondona, I., Montero, M., López H., Llobell, A., & Monte, E. (1998). *Selección de cepas de Trichoderma antagonistas de Phytophthora cinnamomi y Rosellinia necatrix para su aplicación en cultivos de aguacate*. Salamanca, España: IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología.
- Steiner, G. W., & Watson, R. D. (1965). Use for Surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology*, 55, 728–730.
- Waterhouse, G. M. (1963). *Key to the species of Phytophthora de Bary*. UK: Commonwealth Mycological Institute.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, J. G. Sninsk, & J. T. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). San Diego, USA: Academic Press.