



Biological control of ear rot on maize genotypes with *Trichoderma* species

Control biológico de la pudrición de mazorca en genotipos de maíz con especies de *Trichoderma*

Castro del Ángel, E.¹, Sánchez Arizpe, A.¹, Galindo Cepeda, M. E.¹, Vázquez Badillo, M. E.².

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. México.

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas.

Cite this paper/Como citar este artículo: Castro del Ángel, E., Sánchez Arizpe, A., Galindo Cepeda, M. E., Vázquez Badillo, M. E. (2020). Biological control of ear rot on maize genotypes with *Trichoderma* species. *Revista Bio Ciencias* 7, e965. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e965>



ABSTRACT

Maize is exposed to a number of phytopathogens throughout its phenological cycle, among which *Fusarium*, *Ustilago*, *Aspergillus*, *Penicillium*, and others. Some of these genera produce toxic substances called mycotoxins, which represent a high risk for human health and that of the animals that consume them. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of three strains of *Trichoderma* for the control of ear rot in four maize genotypes; the experiment was carried out under rainfall conditions and natural infection by *F. verticillioides*. Four inoculated maize genotypes and without inoculating with *Trichoderma* spp., were planted. Three treatments were tested, seed inoculation, application by spraying and the application of the previous two together. The

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: April 03rd 2020.

Accepted/Aceptado: September 13th 2020.

Available on line/Publicado: September 24th 2020.

RESUMEN

El maíz está expuesto a un sin número de fitopatógenos fúngicos causantes de enfermedades a lo largo de su ciclo fenológico, entre los que destacan *Fusarium*, *Ustilago*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros. Algunos de estos géneros producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas, las cuales representan un elevado riesgo para la salud humana y la de los animales que las consumen. El objetivo de éste estudio fue evaluar la efectividad de tres cepas de *Trichoderma* para el control de pudrición de mazorca en cuatro genotipos de maíz, el experimento se estableció bajo condiciones de temporal e infección natural por *F. verticillioides*. Se sembraron cuatro genotipos de maíz inoculados y sin inocular con *Trichoderma* spp. Se evaluaron tres tratamientos, inoculación de la semilla, aplicación mediante aspersión y la aplicación de las dos anteriores de manera conjunta. Se determinó la incidencia de pudrición de mazorca y la severidad de la enfermedad. La severidad de la enfermedad fue baja en los tres tratamientos, el tratamiento a semilla más aplicación mediante

*Corresponding Author:

Epifanio Castro del Ángel. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. México. E-mail: epifaniocastrodelangel@hotmail.com. ORCID ID 0000-0002-5534-1262

incidence of ear rot and the severity of the disease were determined. The severity of the disease was low in all three treatments, the seed treatment and spray application evaluated together had the lowest severity compared to the control. The three *Trichoderma* species reduced the incidence and severity of the disease in the three methods used, *T. harzianum* was the strain that significantly ($p < 0.0001$) controlled the disease, with more than 70 % effectiveness in all treatments.

KEY WORDS

Effectiveness, incidence, severity, *Fusarium verticillioides*.

Introduction

The fungi *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* are considered the most common pathogens of maize (Leslie & Summerell, 2006); the phytopathogen *F. verticillioides* is a species of greatest relevance and interest in maize (Duncan & Howard, 2010), it has a wide distribution and is endemic in all maize-producing regions of the world (Blacutt *et al.*, 2018), greatly limits its production causing considerable yield losses; which is at a global level around 7-17 % while in Mexico it oscillates around 7.5-38 % (González *et al.*, 2007). Likewise, it causes changes in the nutritional content, reducing the content of lipids, proteins and carbohydrates, in addition to altering the organoleptic properties (Chavarri *et al.*, 2017) besides of contaminating the grains with mycotoxins (Giorni *et al.*, 2019); this fungus is known to be found more frequently on the cob in corn-producing areas (Briones-Reyes *et al.*, 2015), affecting all phenological stages of the maize and different parts of it by inducing pre- and post-harvest diseases that cause a reduction of yield and affect seed quality (Schulthess *et al.*, 2002).

The *Fusarium* genus produces three groups of toxins which are: zearalenone, trichothecenes, and fumonisins which are mainly found in maize, and are toxic to humans and animals that consume them (Agris, 2005). The fungus *F. verticillioides* in its infection produces fumonisins; it has been studied that exposure to fumonisin

aspersión evaluadas juntas presentó la severidad más baja comparado con el testigo. Las tres especies de *Trichoderma* redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad en las tres técnicas utilizadas, *T. harzianum* fue la cepa que controló significativamente ($p < 0.0001$) la enfermedad, con más del 70 % de efectividad en todos los tratamientos.

PALABRAS CLAVE

Efectividad, incidencia, severidad, *Fusarium verticillioides*.

Introducción

Los hongos *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* son considerados los patógenos más comunes del maíz (Leslie & Summerell, 2006); el fitopatógeno *F. verticillioides* es de las especies de mayor relevancia e interés en maíz (Duncan & Howard, 2010), tiene amplia distribución y es endémica en todas las regiones productoras de maíz del mundo (Blacutt *et al.*, 2018), limita en gran medida su producción causando considerables pérdidas en rendimiento; a nivel mundial se encuentra en 7 y 17 %, mientras que en México oscila entre 7.5 y 38.0 % (González *et al.*, 2007); así mismo produce cambios en su contenido nutricional disminuyendo el contenido de grasas, proteínas y carbohidratos, además altera las características organolépticas (Chavarri *et al.*, 2017) y contamina los granos con micotoxinas (Giorni *et al.*, 2019); se sabe que este hongo es encontrado con mayor frecuencia en mazorca en zonas productoras de maíz (Briones-Reyes *et al.*, 2015), afecta en todas las etapas fenológicas de la planta de maíz y a diferentes partes de la misma induciendo enfermedades de pre y postcosecha que causan reducción del rendimiento y afectan la calidad de la semilla (Schulthess *et al.*, 2002). El género *Fusarium* produce tres grupos de toxinas como son: zearalenonas, tricotecenos y fumonisinas las cuales se encuentran principalmente en maíz, son tóxicas para el humano y los animales que las consumen (Agris, 2005). El hongo *F. verticillioides* en su infección produce fumonisinas; se ha estudiado que la exposición a la fumonisin B1 (FB1) del maíz produce leucoencefalomalacia (LEM) en ganado equino y edema pulmonar en ganado porcino. La FB1 produce también efectos tóxicos en el sistema nervioso

B1 (FB1) from maize produces leukoencephalomalacia (LEM) in horses as well as pulmonary edema in pigs. FB1 also produces toxic effects on the central nervous system, liver, pancreas, kidneys and lungs of several animal species (FAO, 2020), FB1 and FB2 have also been associated with esophageal carcinoma in rats and moniliformin (MON) with myocardial damage (Bertuzzi *et al.*, 2020). For many years, the control of fungal diseases has largely depended to a large degree on chemical control (Kumar & Ashraf, 2017). Nevertheless, the use of chemical molecules represents a threat to human health and contributes to an increase of environmental pollution (Abdel-Monahim *et al.*, 2011), and has given pace to the appearance of resistant strains that lead to a higher incidence of fungal diseases (Hernández *et al.*, 2014). To reduce this problem, it is necessary to search for and adopt new accessible and simply applicable strategies that are innocuous to humans and animals (Naeini *et al.*, 2010).

Biological control is an excellent alternative as an option to the use of chemical fungicides for the management of diseases in organic and conventional production systems, with the least possible negative effect on the environment (Nagarajkumar *et al.*, 2004). *Trichoderma* species are commonly the most applied fungi as biological control agents in agriculture (Diánez *et al.*, 2016), the ability of *Trichoderma* to control plant diseases is based on the activation of one or multiple control mechanisms (Muhammad *et al.*, 2019), these mechanisms are based by mycoparasitism (Elamathi *et al.*, 2018), production of antibiotics and hydrolytic enzymes (Vinale *et al.*, 2008), competition for space and nutrients (Oszust *et al.*, 2020), the induction of systemic resistance in the plant (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014), and the production of secondary metabolites (Zeilinger *et al.*, 2016). Therefore, this work aimed to evaluate the effectiveness of three *Trichoderma* strains for the control of ear rot in four corn genotypes.

Material and Methods

Trichoderma Strains

Trichoderma species were obtained from the fungal culture collection of the Phytopathology Laboratory of the Parasitology Department of the "Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro" in Mexico, isolated from Mexican agricultural soils. The cultures were reactivated

central, hígado, páncreas, riñones y pulmones de varias especies de animales (FAO, 2020), también se han asociado a la FB1 y FB2 con el cáncer esofágico en ratas y la moniliformina (MON) con daño al miocardio (Bertuzzi *et al.*, 2020). Durante varios años, el control de las enfermedades ocasionadas por hongos ha dependido, en gran medida del control químico (Kumar & Ashraf, 2017). Sin embargo, el uso de moléculas químicas representa un riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación del medio ambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011), ha dado lugar a la aparición de cepas resistentes que conducen a enfermedades fúngicas con mayor incidencia (Hernández *et al.*, 2014). Para reducir éste problema, es necesario buscar y adoptar estrategias accesibles, sencillas de aplicar e inocuas para seres humanos y animales (Naeini *et al.*, 2010).

El control biológico es una excelente alternativa como opción al uso de los fungicidas químicos para el manejo de enfermedades en los sistemas de producción orgánica y convencional, con el mínimo efecto negativo posible al ambiente (Nagarajkumar *et al.*, 2004). Las especies de *Trichoderma* son comúnmente los hongos más aplicados como agentes de control biológico en la agricultura (Diánez *et al.*, 2016), la habilidad de *Trichoderma* para controlar enfermedades de plantas está basada en la activación de uno o múltiples mecanismos de control (Muhammad *et al.*, 2019), éstos mecanismos se basan en el micoparasitismo (Elamathi *et al.*, 2018), producción de antibióticos y de enzimas hidrolíticas (Vinale *et al.*, 2008), la competencia por el espacio y los nutrientes (Oszust *et al.*, 2020), inducción de resistencia sistémica en la planta (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014), y la producción de metabolitos secundarios (Zeilinger *et al.*, 2016). Por tal motivo el objetivo de éste trabajo fue evaluar la efectividad de tres cepas de *Trichoderma* para el control de pudrición de mazorca en cuatro genotipos de maíz.

Material y Métodos

Cepas de *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* se obtuvieron de la colección de cultivo de hongos del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México, aisladas de suelos agrícolas de México. Los cultivos se reactivaron en medio de cultivo PDA y se incrementaron masivamente en semillas de arroz (Michel-Aceves *et al.*, 2008), las especies utilizadas fueron, *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*.

with potato dextrose agar (PDA) medium and massively increased in rice seeds according to the methodology suggested by Michel-Aceves *et al.* (2008), the species used were, *T. harzianum*, *T. asperellum* and *T. longibrachiatum*.

Fusarium verticillioides isolation

At the end of the spring-summer cycle, specifically at the time of harvest, a sampling of the zone established as the experiment was done and 110 days after sowing stems and cobs of symptomatic and asymptomatic native maize were collected to obtain the phytopathogen. The stems and cobs were transferred to the Parasitology Department and fractions were inoculated in Malachite Green Agar culture medium (Leslie & Summerell, 2006). This was done following the method described by Agrios (2005).

Morphological characterization of Fusarium verticillioides as a causal agent of corn ear rot

Strains were phenotypically characterized according to Leslie & Summerell (2006), purification was carried out from monoconidial cultures, isolates were kept at 4 °C until use (Duarte *et al.*, 2016).

Molecular characterization of F. verticillioides

The pathogen was cultured in PDA medium for 10 days. DNA extraction was carried out using the methodology of Nicholson *et al.* (2001). DNA integrity and quality of the extracted sample were checked on 1 % agarose gel by horizontal electrophoresis running at 100 V for 40 min. The Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) and ITS4 were amplified using specific primers for ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') and ITS4 (5'TCC GCT TGA TAT GC3'). The final reaction volume was 20µL, which contained 13.58 of MQ water, 2.0 µL of MgCl buffer (10X), 0.32 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.4 µL of dNTP's (10 mM), 0.5 µL of the primers for ITS1 and ITS4 at a 10 µM concentration, 0.5 µL of DMSO, 0.2 µL of DNA Taq-polymerase 1 U and 1 µL of DNA (40 ng/µL) The amplification reaction conditions were: 1 cycle of 94 °C 3min, followed by 35 cycles at 94 °C 45s, 53 °C for 45s and 72 °C 1 min; ending with a polymerization cycle of 72 °C for 7 min. The amplified bands were observed in 1 % agarose gel at 90 V for 60 min.

PCR products were sequenced by Macrogen laboratory (Rockville, USA). The obtained sequences were compared with those registered at the GenBank

Aislamiento de Fusarium verticillioides

A final del ciclo Primavera-Verano específicamente al momento de la cosecha, se realizó un muestreo en la zona donde se establecería el experimento, a 110 días después de la siembra se recolectaron tallos y mazorcas de maíz criollo sintomáticas (os) y asintomáticas (os) para la obtención del fitopatógeno. Los tallos y las mazorcas se trasladaron al departamento de Parasitología y se sembraron fracciones de tejido y granos de maíz con síntomas característicos del hongo y asintomáticos en medio de cultivo Verde de Malaquita Agar (Leslie & Summerell, 2006). La siembra se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Agrios (2005).

Caracterización morfológica de Fusarium verticillioides como agente causal de la pudrición de mazorca

Las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente de acuerdo con Leslie & Summerell (2006), la purificación se llevó a cabo a partir de cultivos monoconidiales, los aislamientos fueron conservados a 4 °C hasta su utilización (Duarte *et al.*, 2016).

Caracterización molecular de F. verticillioides

El patógeno se cultivó en medio PDA por 10 días. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante la metodología de Nicholson *et al.* (2001). La integridad y calidad del ADN extraído se verificó en gel de agarosa al 1 %, mediante electroforesis horizontal a un voltaje de 100 volts durante 40 min. Se amplificó la región ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer) utilizando los cebadores ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3'), el volumen final de la reacción fue de 20 µL, se adicionó 13.58 de agua MQ, 2.0 µL de amortiguador MgCl (10X), 0.32 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.4 µL de dNTP's (10mM), 0.5 µL de los iniciadores ITS1 e ITS4 a 10µM, 0.5µL de DMSO, 0.2 µL de ADN Taq-polimerasa 1 U y 1 µL de ADN (40 ng/µL). Las condiciones de las reacciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94 °C 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C 45s, 53 °C por 45s y 72 °C 1 min; finalizando con un ciclo de polimerización de 72 °C por 7 min. Las bandas amplificadas se observaron en gel de agarosa al 1.0 % a 90 V por 60 min.

Los productos de PCR fueron secuenciados por el laboratorio Macrogen (Rockville, USA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las registradas en la base de datos del GenBank del National Center for

database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool) was used for highly similar sequences.

***Trichoderma* spp. conidia suspension**

The conidia suspension of *Trichoderma* species was obtained from 25-day-old cultures grown in rice grains at 26 °C, the conidia were recovered with sterile distilled water, filtered with gauze to separate mycelium and conidia (Gato, 2010), the filtration was adjusted to the concentration of 1×10^9 conidia/mL in a Neubauer chamber (Neubauer improved bright-line, Lo-Laboroptik).

Genotypes

Native and hybrid maize varieties with adaptation to tropical zones were used, the H-520 F1 and Mestizo Diamante hybrids were provided by Grupo Hernández Montiel y Asociados S.P.R de R.L., the native varieties were acquired from local producers in the study area and the UAAAN-ISP-173 material was provided by the Banco Nacional de Germoplasma de Maíces de México of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, and was used for being known to be tolerant to *Fusarium verticillioides* invasion.

Biocontrol activity in plant

The sowing of the maize plants was done manually in the fall-winter cycle under rainwater irrigation and natural *F. verticillioides* infection, in furrows of 5 m in length with 0.9 m of distance between furrows and 0.4 m between plants in the region of the Huasteca of Veracruz, in the Chapopote II ejido localized at the coordinates 21°10'13.68"N and 98°13'36.09" W. A randomized block design with factorial arrangement A x B x C was used, with four repetitions per treatment (5 furrows/ repetition) and an absolute witness were used as control. Twenty-five seeds were sown in each furrow inoculated and uninoculated with *Trichoderma* spp. and two seeds were deposited in each furrow. The population density was approximately 55,555 plants/hectare.

The *Trichoderma* species were inoculated by three different methods; seed inoculation treatment (TS), foliar spray (TA) and the two previous methods in combination (TS+TA).

The dose applied in the seed inoculation treatment was equivalent to 10 g/kg of seed (Chandra et al., 2008). To

Biotechnology Information (NCBI), se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para secuencias altamente similares.

Suspensión de conidios de *Trichoderma* spp.

La suspensión de conidios de las especies de *Trichoderma* se obtuvo a partir de cultivos de 25 días de edad crecidos en granos de arroz a 26 °C, los conidios se recuperaron con agua destilada estéril, se filtraron con una gasa para separar el micelio y los conidios (Gato, 2010), el filtrado se ajustó a la concentración de 1×10^9 conidios/mL en una cámara Neubauer (Neubauer improved bright-line, Lo-Laboroptik).

Genotipos

Se utilizaron maíces criollos e híbridos con adaptación a zonas tropicales, los híbridos H-520 F1 y Mestizo Diamante fueron proporcionados por el Grupo Hernández Montiel y Asociados S.P.R de R.L., los criollos se adquirieron con productores de la zona de estudio y el material UAAAN-ISP-173 fue proporcionado por el Banco Nacional de Germoplasma de Maíces de México de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro conocido por ser tolerante a la invasión de *Fusarium verticillioides*.

Actividad del biocontrol in planta

La siembra de los maíces se realizó de forma manual en el ciclo Otoño-Invierno, bajo condiciones de temporal e infección natural de *F. verticillioides*, en surcos de 5 m de longitud, con 0.90 m entre surcos y 0.40 m entre plantas en la región Huasteca Veracruzana, en el ejido Chapopote II con coordenadas 21° 10' 13.68" LN y 98° 13' 36.09" LO. Se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo factorial A x B x C, con cuatro repeticiones por tratamiento (5 surcos/ repetición) y un testigo absoluto. En cada surco se sembraron 25 semillas inoculadas y sin inocular con *Trichoderma* spp., se depositaron dos semillas por golpe. La densidad de población fue de aproximadamente 55,555 plantas/hectárea.

Las especies de *Trichoderma* se inocularon por tres métodos diferentes; mediante tratamiento de inoculación de la semilla (TS), aspersión foliar (TA) y los dos métodos anteriores en combinación (TS+TA).

La dosis que se aplicó en el tratamiento de inoculación de semilla fue equivalente a 10 g/kg de semilla (Chandra et al., 2008), primeramente la semilla se hidrató con agua por 12 h, como adherente se utilizó gel natural de sábila (*Aloe vera*).

do so, the seed was hydrated in water for 12 h, and the sap of *Aloe vera* was used as a natural adherent.

Inoculation by spraying was carried out when more than 50 % of the female flowers had emerged, in the R1 stage applications was directed towards the stigma on three occasions, at a concentration of 1×10^9 conidia/mL, with repetitions every third day, and suspended when the population had become uniform around 95 % of flowering.

Biocontrol effect

Effect on the incidence of ear rot

At 150 days after sowing, 20 plants were selected at random from the three central furrows of each replicate, their cobs were harvested for the evaluation of rot incidence, the cobs that showed rot signals in the plots of each treatment were counted, and the results were expressed as a percentage.

Determination of ear rot severity

Twenty randomly selected cobs were harvested from the three central furrows. Severity was determined by the scale of Reid *et al.* (1996). Table 1.

Statistical analysis

The incidence was processed by analysis of variance with a factorial array of three factors (A x B x

La inoculación mediante aspersion se llevó a cabo cuando habían emergido más del 50 % de flores femeninas, en la etapa R1 se realizaron aplicaciones dirigidas a los estigmas en tres oportunidades, a una concentración de 1×10^9 conidios/mL repitiéndose cada tercer día, se suspendieron cuando la población se había uniformizado alrededor del 95 % de floración.

Efecto de biocontrol

Efecto en la incidencia de pudrición de mazorca

A los 150 días después de la siembra se seleccionaron 20 plantas al azar de los tres surcos centrales de cada repetición, se cosecharon sus mazorcas para la evaluación de incidencia de pudrición, se contaron las mazorcas que presentaban síntomas de pudrición en las parcelas de cada uno de los tratamientos, los resultados se expresaron en porcentaje.

Determinación de severidad de pudrición de mazorca

Se cosecharon 20 mazorcas seleccionadas al azar de los tres surcos centrales. La severidad se determinó con la escala de Reid *et al.* (1996). Tabla 1.

Análisis estadístico

La incidencia se procesó mediante análisis de varianza con arreglo factorial de tres factores (A x B x C), con tres niveles en el factor A, cuatro niveles en B y cuatro en C, en el factor A se ubicaron a los métodos, B fueron los

Table 1.
Scale to assess ear rot severity.

Tabla 1.
Escala para evaluar la gravedad de la pudrición de la mazorca.

Class	Percent disease (%)
1	0
2	1 - 3
3	4 - 10
4	11 - 25
5	26 - 50
6	51 - 75
7	> 75

C), with three levels in factor A, four levels in B and four in C. The methods were placed in factor A, the used genotypes in factor B, and factor C was composed by the strains of *Trichoderma* used. The software SAS 9.0 for windows was used and the measures were separated by a Tukey test with a significance of $p = 0.05$.

Disease severity data were adjusted to a weighted mean using Friedman's test, with SAS version 9.0 for Windows.

Results and Discussion

Morphological characterization of *Fusarium verticillioides* as a causal agent of ear rot

After 12 days of incubation of the samples of the phytopathogenic fungus an extensive cottony mycelium was observed in the culture medium, frequently with dashes of pink, purple or yellow in the medium. Abundant single and stranded microconidia were found, usually, single-cell, double-cell, oval and club-shaped hyaline and were generally flattened at each end. Macroconidia, with thin walls and their shape from canoe-shaped to almost straight; with 3-7 septa and the basal cell in the shape of a foot. In the absence of chlamydospores in the mycelium, *F. verticillioides* was identified as the cause of ear rot according to phenotypic characteristics described by different authors (Warham et al., 1996; Barnett & Hunter, 1998; Leslie & Summerell, 2006).

Molecular characterization of *F. verticillioides*

According to the sequences compared in GenBank, and access number AB587010, the fungus *F. verticillioides* was confirmed to have 100 % homology with the sequences of *F. verticillioides* strain CBS 576.78.

Effect of biocontrol on the incidence of ear rot

The effect of biocontrol evaluated at 150 days after sow, showed that the three application methods ($p \leq 0.0002$) and the three species of *Trichoderma* spp. ($p \leq 0.0001$) significantly reduced the incidence of ear rot caused by *F. verticillioides*. The incidence of rot oscillated around 47 to 79 % in the treatments, being TS+TA the most effective, increasing plant health in 53 % as compared to the witness condition which presented the highest incidence (Figure 1). Similar results were previously reported by Chandra et al. (2008) who

genotipos usados en la investigación y C correspondió a las cepas de *Trichoderma*, su utilizó el programa SAS versión 9.0 para Windows, las medias fueron separadas por la prueba de Tukey al nivel de significancia de $p = 0.05$.

Los datos de severidad de la enfermedad se ajustaron a una media ponderada mediante la prueba de Friedman, con el programa SAS versión 9.0 para Windows.

Resultados y Discusión

Caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides* como agente causal de la pudrición de mazorca

Después de 12 días de incubación de las muestras del hongo fitopatógeno se observó micelio extenso algodonoso en medio de cultivo, frecuentemente con algo de tinte rosa, púrpura o amarillo en el medio. Se encontraron microconidios abundantes simples y en cadenas, generalmente hialinos unicelulares, bicelulares, con forma oval y de garrote y estaban generalmente aplanados en cada extremo. Los macroconidios, con paredes delgadas y su forma de curvos en forma de canoa a casi rectos; con 3-7 septos y la célula basal en forma de pie. Con ausencia de clamidosporas en el micelio, se identificó a *F. verticillioides* como causante de la pudrición de mazorca de acuerdo a características fenotípicas descritas por diferentes autores (Warham et al., 1996; Barnett & Hunter, 1998; Leslie & Summerell, 2006).

Caracterización molecular de *F. verticillioides*

De acuerdo con las secuencias comparadas en el GenBank y número de acceso AB587010 se corroboró la identidad del hongo *F. verticillioides*, el cual se confirmó en 100 % de homología con las secuencias de *F. verticillioides* cepa CBS 576.78.

Efecto del biocontrol en la incidencia de pudrición de mazorca

El efecto del biocontrol evaluado a los 150 días después de la siembra, demostró que los tres métodos de aplicación ($p \leq 0.0002$) y las tres especies de *Trichoderma* spp. ($p \leq 0.0001$) redujeron significativamente la incidencia de pudrición de mazorca ocasionada por *F. verticillioides*. La incidencia de pudrición osciló de 47 a 79 % en los tratamientos, siendo TS+TA el más eficaz, incrementando la sanidad de planta en 53 % respecto al testigo que presentó la incidencia más alta (Figura 1). Resultados similares fueron reportados

pointed out that with the application of antagonistic microorganisms such as *T. harzianum*, the incidence was reduced by more than 50 %. Another study by Ferrigo *et al.* (2014) indicated that *T. harzianum* T22 reduced the colonization of *F. verticillioides* by 58 % through seed treatment, which makes the use of *Trichoderma* promising as way to reduce *F. verticillioides* damage, as observed in this research.

Infection of maize by *F. verticillioides* can occur through several routes, the most commonly reported method for infection of the grain is through airborne conidia that infect the stigmas, and thereafter the invasion of the stigmas, the fungus infects the seeds (Sartori *et al.*, 2015). Systemic infection can begin with conidia or mycelium of the fungus being transported within the seeds or on the surface of the seeds. The fungus develops inside the young plant, passing from the roots to the stem and finally to the cob and grains (Duncan & Howard, 2010). The results obtained in the present research make evident that by treating the different access points of *F. verticillioides* with different species of *Trichoderma* in different maize genotypes, the incidence and severity of the disease can be reduced at different levels of biocontrol, with the best result being found with seed inoculation and foliar spraying in combination.

previamente por Chandra *et al.* (2008) quienes señalaron que con la aplicación de microorganismos antagonísticos como *T. harzianum*, la incidencia fue disminuida en más del 50 %. Otro estudio realizado por Ferrigo *et al.* (2014) designaron que *T. harzianum* T22 redujo en 58 % la colonización de *F. verticillioides* mediante tratamiento de la semilla, lo cual hace promisorio el uso de *Trichoderma* para reducir el daño por *F. verticillioides*, tal como se observó en éste estudio.

La infección del maíz por *F. verticillioides* puede ocurrir a través de varias rutas, el método más comúnmente reportado para la infección del grano es a través de conidios en el aire que infectan los estigmas, después de la invasión de los estigmas el hongo infecta los granos (Sartori *et al.*, 2015). La infección sistémica puede comenzar con conidios o micelio del hongo que se transportan dentro de las semillas o en la superficie de éstas. El hongo se desarrolla dentro de la planta joven, pasando de las raíces al tallo y finalmente a la mazorca y los granos (Duncan & Howard, 2010). Los resultados obtenidos en la presente investigación se hace evidente que al tratar las vías de entrada del hongo *F. verticillioides* con diferentes especies de *Trichoderma* en genotipos de maíz, se puede reducir la incidencia y la severidad de la enfermedad en diferentes niveles de biocontrol, encontrándose el mejor resultado con la inoculación de la semilla y aspersión foliar en combinación.

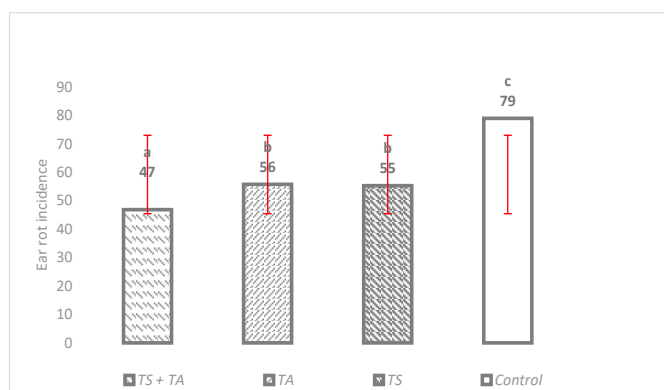


Figure 1. Effect of *Trichoderma* spp. on the incidence of ear rot with three different treatments.

The means with the same letter are not significantly different according to the Tukey test, tested at $p = 0.05$. Bars are the standard deviation of the mean.

Figura 1. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de la pudrición de la mazorca con tres tratamientos diferentes.

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey, probada con $p = 0.05$. Las barras son la desviación estándar de la media.

On the other hand, the three strains of *Trichoderma* significantly reduced the incidence of ear rot ($p \leq 0.0001$) at different levels of biocontrol, however, such effect was especially notorious in the strain of *T. harzianum*, which presented the lowest level of incidence with respect to the control. It is important to mention that of the three tested strains, *T. longibrachiatum* was the one that presented the highest incidence, followed by *T. asperellum* and *T. harzianum* as shown in Figure 2. No statistical differences were observed between *T. asperellum* and *T. harzianum*, nevertheless, the biocontrol effect was statistically superior with respect to the control. This biocontrol effect was also documented by Cavaglieri et al. (2005) due to the application of *Bacillus subtilis* in maize plants under greenhouse conditions where the reduction of rhizoplane and endorhizosphere colonization by *F. verticillioides* was observed.

The genus *Trichoderma* comprises a large number of species that can act as biological control agents, whose antagonistic properties are based on the activation of multiple mechanisms of action (Mukherjee et al., 2014). For this study, biocontrol could be observed in the three strains of *Trichoderma* with different levels of effectiveness. This was probably because the different strains exerted more than one mechanism

Por otra parte las tres cepas de *Trichoderma* redujeron significativamente la incidencia de pudrición de mazorca ($p \leq 0.0001$) en diferentes niveles de biocontrol, sin embargo tal efecto fue significativamente notorio en la cepa de *T. harzianum* que presentó el nivel más bajo de incidencia respecto al testigo. Es importante mencionar que de las tres cepas, el hongo *T. longibrachiatum* fue el que presentó la incidencia más alta, seguida por *T. asperellum* y *T. Harzianum* tal como se muestra en la Figura 2, no se observó diferencia estadística entre *T. asperellum* y *T. harzianum*, sin embargo el efecto de biocontrol fue estadísticamente superior respecto al testigo. Éste efecto de biocontrol también fue documentado por Cavaglieri et al. (2005) debido a la aplicación de *Bacillus subtilis* en plantas de maíz en condiciones de invernadero donde se observó la reducción de colonización del rizoplane y la endorizosfera por parte de *F. verticillioides*.

El género *Trichoderma* comprende una gran cantidad de especies que actúan como agentes de control biológico, cuyas propiedades antagonicas se basan en la activación de múltiples mecanismos de acción (Mukherjee et al., 2014). Para éste estudio, el biocontrol se pudo observar en las tres cepas de *Trichoderma* con diferentes niveles de efectividad, posiblemente se debe a que las cepas ejercieron más de un mecanismo de acción para suprimir el crecimiento y desarrollo de *F. verticillioides* y así disminuir la

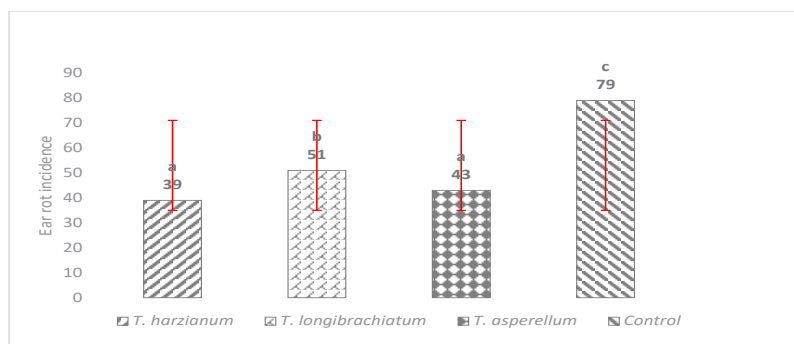


Figure. 2. Effect of *Trichoderma* spp. on the incidence of ear rot with three different strains.

The means with the same letter are not significantly different according to the Tukey test, tested at $p = 0.05$. Bars are the standard deviation of the mean.

Figura. 2. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de pudrición de la mazorca con tres cepas diferentes.

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey, probada con $p = 0.05$. Las barras son la desviación estándar de la media.

of action to suppress the growth and development of *F. verticillioides* thus diminishing the incidence and severity of the disease. *Trichoderma* species act against fungal phytopathogens either indirectly, by competing for nutrients and space, modifying environmental conditions, promoting plant growth or systemic plant defense and through antibiosis, or directly, by mechanisms such as mycoparasitism (Gwa & Nwankiti, 2017).

These indirect and direct mechanisms can act in a coordinated way and their importance in the biocontrol process depends on the strain of *Trichoderma*, the antagonized fungus, the plant species and the environmental conditions, including the availability of nutrients, pH, temperature, among others (Filizola *et al.*, 2019). The activation of each mechanism implies the production of specific compounds and metabolites, such as plant growth factors, hydrolytic enzymes, siderophores, antibiotics, and nitrogen (Rubio *et al.*, 2014). The results presented are statistically superior to the control and it can be observed that *Trichoderma* strains exerted different levels of control and that in each technique evaluated, the strains may have coordinated direct and indirect mechanisms as part of the biocontrol.

Effect on disease severity

For severity, relatively low levels were found in all three treatments protocols, with TS+TA having the lowest severity compared to the rest of the treatments; all three treatments were placed in class 2 in the scale of Reid *et al.* (1996) with respect to the control, which had damage levels of 10.89 % and was placed in class 3 of the same scale in relation to the weighted average. The Friedman test confirmed that at least two treatments are different at the significance level of $p < 0.05$. The effectiveness of the treatments was determined by means of the Abbott formula (1925) and the following results were obtained (Table 2). In all the treatments, the effectiveness was above 70 %, and it was also observed that in all the treatments where the *Trichoderma* strains were applied, the flowering was at least one week ahead as compared to control. In other studies, conducted by Chandra *et al.* (2009) showed that seed treatment and spray treatment of a pure culture of *Pseudomonas fluorescens* reduced the incidence of ear rot by 83 %, with powdered formulations of talc, corn starch and wheat bran reduced ear rot by 81, 79 and 77 %, respectively.

incidencia y severidad de la enfermedad. Las especies de *Trichoderma* actúan contra los fitopatógenos fúngicos, ya sea indirectamente, compitiendo por nutrientes y espacio, modificando las condiciones ambientales, promoviendo el crecimiento vegetal o la defensa sistémica de las plantas y por medio de antibiosis, o directamente, por mecanismos como el micoparasitismo (Gwa & Nwankiti, 2017).

Éstos mecanismos indirectos y directos pueden actuar de manera coordinada y su importancia en el proceso de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, el hongo antagonizado, la especie de planta y las condiciones ambientales, incluida la disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, entre otros (Filizola *et al.*, 2019). La activación de cada mecanismo implica la producción de compuestos y metabolitos específicos, como los factores de crecimiento de las plantas, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos y nitrógeno (Rubio *et al.*, 2014). Los resultados que se presentan son estadísticamente superiores al testigo y se puede observar que las cepas de *Trichoderma* ejercieron diferentes niveles de control y que en cada técnica evaluada, las cepas pudieron haber coordinado mecanismos directos e indirectos como parte del biocontrol.

Efecto en la severidad de la enfermedad

Para la severidad se encontraron niveles relativamente bajos en los tres tratamientos, el TS + TA fue el que presentó la severidad más baja, en comparación con el resto de los tratamientos; los tres tratamientos se ubicaron en la clase dos de la escala de Reid *et al.* (1996) respecto al testigo el cual presentó niveles de daño de 10.89 % y se ubicó en la clase 3 de la misma escala con relación a la media ponderada. La prueba de Friedman confirmó que al menos dos tratamientos son diferentes al nivel de significancia de $p = 0.05$ mostrando diferencia significativa. La efectividad de los tratamientos se determinó mediante la fórmula de Abbott (1925) y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2), en todos los tratamientos se obtuvo arriba del 70 % de efectividad, además se pudo observar que en todos los tratamientos donde se aplicaron las cepas de *Trichoderma* la floración se adelantó al menos una semana respecto al testigo. En otros estudios realizados por Chandra *et al.* (2009) demostraron que el tratamiento de semillas y tratamiento por aspersion de un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* redujo la incidencia de pudrición de mazorca en un 83 %, con formulaciones en polvo de talco, almidón de maíz y salvado de trigo redujeron la pudrición de mazorca en un 81, 79 y 77 %, respectivamente.

Table 2.
Technical efficiency of treatments with three strains of *Trichoderma* spp.
in four maize genotypes on the severity of ear rot. (Abbott, 1925).

Tabla 2.
Técnica de efectividad de los tratamientos con tres cepas de *Trichoderma* spp.
en cuatro genotipos de maíz sobre la gravedad de la pudrición de la mazorca. (Abbott, 1925).

Genotypes	Treatments	Strains		
		<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>
H-520	TS	81.04 ± 0.00 ^a	75.07 ± 5.61 ^a	79.34 ± 2.73 ^a
H-520	TA	79.24 ± 2.45 ^a	79.24 ± 3.68 ^a	77.73 ± 3.87 ^a
H-520	TS+TA	78.86 ± 2.49 ^a	79.24 ± 3.68 ^a	77.91 ± 3.61 ^a
MESTIZO	TS	78.67 ± 3.50 ^a	77.98 ± 3.25 ^a	73.58 ± 7.34 ^a
MESTIZO	TA	76.91 ± 2.14 ^a	73.48 ± 0.00 ^a	78.67 ± 1.05 ^a
MESTIZO	TS+TA	76.91 ± 2.11 ^a	80.43 ± 0.00 ^a	75.73 ± 3.36 ^a
CRIOLLO	TS	74.64 ± 1.06 ^a	74.82 ± 2.91 ^a	76.98 ± 3.65 ^a
CRIOLLO	TA	78.60 ± 1.01 ^a	76.80 ± 2.03 ^a	79.77 ± 3.35 ^a
CRIOLLO	TS+TA	76.44 ± 1.23 ^a	80.31 ± 2.03 ^a	82.01 ± 0.00 ^a
UAAAN-ISP-173	TS	80.99 ± 2.83 ^a	77.91 ± 3.61 ^a	80.48 ± 2.75 ^a
UAAAN-ISP-173	TA	77.74 ± 1.51 ^a	75.86 ± 0.54 ^a	80.74 ± 0.00 ^a
UAAAN-ISP-173	TS+TA	76.80 ± 1.51 ^a	77.91 ± 0.56 ^a	76.80 ± 1.74 ^a

TS (seed treatment), TA (spray treatment) and TS + TA (seed treatment plus spray treatment). Means with the same letter in the same column are not significantly different according to the Tukey test, tested at $p = 0.05$ ± are mean standard deviation.

TS (tratamiento de semillas), TA (tratamiento por aspersión) y TS + TA (tratamiento de semillas más tratamiento por aspersión). Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey, probada con $p = 0.05$ ± son la desviación estándar media.

Conclusion

F. verticillioides was identified morphologically as the cause of ear rot in maize genotypes of the state of Veracruz. The strain *T. harzianum* presented the highest significant effectivity on the reduction of incidence and severity of the disease. The most promising method of application of *Trichoderma* spp. was treatment of inoculation of the seed combined with foliar aspersion, for which by treating the routes of entry of the pathogen can reduce the frequency of *F. verticillioides*, due to that direct or indirect mechanisms of the strains of *Trichoderma* can act in a coordinated manner in the process of biocontrol.

Conclusión

Se identificó morfológicamente a *F. verticillioides* como causante de la pudrición de mazorca en genotipos de maíz del estado de Veracruz. La cepa *T. harzianum* presentó la efectividad más significativa sobre la incidencia y la severidad de la enfermedad. El método más prometedor de la aplicación de *Trichoderma* spp., fue el tratamiento de inoculación de la semilla y la aspersion foliar evaluadas juntas, por lo que al tratar las vías de entrada del patógeno se puede ver reducida la frecuencia de *F. verticillioides*, debido a que los mecanismos directos o indirectos de las cepas de *Trichoderma* pueden actuar de manera coordinada en el proceso de biocontrol.

References

- Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of the insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18:257-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Abdel-Monaim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M. and Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection*, 30(2): 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. San Diego, California.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998). Illustrated Genera Imperfect Fungy. Fourth Edition. Editorial Prentice Hall Inc.
- Bertuzzi, T., Giorni, P., Rastelli, S., Vaccino, P., Lanzanova, C. and Locatelli, S. (2020). Co-Occurrence of Moniliformin and Regulated *Fusarium* Toxins in Maize and Wheat Grown in Italy. *Molecules*, 25(10):1-13. <https://doi.org/10.3390/molecules25102440>
- Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M. and Glenn, A. E. (2018). *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity, Virulence, and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, 108:312-326. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW>
- Briones-Reyes, D., Castillo-González, F., Chávez-Servia, J. L., Aguilar-Rincón, V. H., De León García-de Alba, C. and Ramírez-Hernández, A. (2015). Respuesta del maíz nativo del altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1): 74-85. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212015000100008&lng=en&tng=es
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M. I., Chulze, S. and Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156 (5-6):748-754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- Chandra, N. S., Niranjana, S. R., Uday, S. A. C., Niranjana, R. S., Reddy, M. S., Prakash, H. S. and Mortensen, C. N. (2008). Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(3): 264-282. <https://doi.org/10.1080/03235400701803879>
- Chandra, N. S., Uday, S. A. C., Reddy, M. S., Niranjana, S. R., Prakash, H. S., Shetty, H. S. and Mortensen, C. N. (2009). Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. *Pest Management Science*, 65:769-775. <https://doi.org/10.1002/ps.1751>
- Chavarri, M., Barroyeta, J., Ochoa, Y., Rumbos, N. and Alezones, J. (2017). Detección de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados Yaracuy y Guárico, Venezuela. *Nova scientia*, 9(19):173-184. <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.1035>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías- Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R. and López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27 (6): 503-514. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0265-R>
- Diáñez, M. F., Santos, M., Carretero, F. and Marín, F. (2016). *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6):1934-1944. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7301>
- Duarte, L. Y., Echevarría, H. A. and Martínez, C. B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3): 173-183. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000300004&lng=es&tng=es
- Duncan, K. E. & Howard, R. J. (2010). Biology of Maize Kernel Infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (1):6-16. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-1-0006>
- Elamathi, E., Malathi, P., Viswanathan, R. and Sundar, A. R. (2018). Expression analysis on mycoparasitism related genes during antagonism of *Trichoderma* with *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 27:351-361. <https://doi.org/10.1007/s13562-018-0444-z>
- Ferrigo, D., Raiola, A., Rasera, R. and Causin, R. (2014). *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*, 65:51-56. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.018>
- Filizola, P. R. B., Luna, M. A. C., de Souza, A. F., Lima, C. I., Laranjeira, D. and Campos, T. G. M. (2019). Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. *Microbial Cell Factories*, 18(89):1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1108-y>
- Gato, C. Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14(3): 189-195. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092010000300008&lng=es&tng=es
- Giorni, P., Bertuzzi, T. and Battilani, P. (2019). Impact of Fungi Co-occurrence on Mycotoxin Contamination in Maize During the Growing Season. *Frontiers in Microbiology*, 10:1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01265>

- González, H. A., Vázquez, G. L., Sahagún, C. J., Rodríguez, P. J. E. and Pérez, L. D. J. (2007). Rendimiento del maíz de temporal y su relación con la pudrición de mazorca. *Agricultura técnica en México*, 33(1): 33-42. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172007000100004&lng=es&tlng=es
- Gwa, V. I. & Nwankiti, A. O. (2017). *In Vitro* Antagonistic Potential of *Trichoderma harzianum* for Biological Control of *Fusarium moniliforme* Isolated from *Dioscorea rotundata* Tubers. *Virology and Mycology*, 6: 166. <https://doi.org/10.4172/2161-0517.1000166>
- Hernández, C. F. D., Flores, F. W., Castillo, R. F., Gallegos, M. G. and Castro Del A. E. (2014). Antibiosis *In vitro* of *Trichoderma* Strains Metabolic Extract on Mycelial Growth and Reproductive Capacity of *Fusarium oxysporum* Isolated from Pepper Plants (*Capsicum annuum* L.). *British Biotechnology Journal*, 4(4): 387-399. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2014/7341>
- Kumar, M., & Ashraf, S. (2017). Role of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of Fungal Plant Pathogens. *Probiotics and Plant Health*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_23
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. USA. Vol. 8.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R. and Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2): 185-191. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200012&lng=es&tlng=es
- Muhammad, A., Waqar, I., Asad, S., Khalid, A. K., Hamed, A. G., Zhiqun, H., Han Y. H. and Guo-dong, L. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis*, 129:7-18. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>
- Mukherjee, A. K., Sampath, K. A., Kranthi, S. and Mukherjee, P. K. (2014). Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *3 Biotech*, 4(3): 275-281. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0150-4>
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. and Khosravi, A. R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 20(3): 174-178. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.05.005>
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. and Velazhahan, R. (2004). Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research*, 159: 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.01.005>
- Nicholson, T. P., Rudd, B. A. M., Dawson, M., Lazarus, C. M., Simpson, T. J. and Cox, R. X. (2001). Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemistry & Biology*, 8: 157-178. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)90064-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)90064-4)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2020). Micotoxinas de importancia mundial. <http://www.fao.org/home/search/en/?q=micotoxinas%20de%20importancia%20mundial> [Last Checked: July 21st 2020].
- Oszust, K., Cybulska, J. and Frac, M. (2020). How Do *Trichoderma* Genus Fungi Win a Nutritional Competition Battle against Soft Fruit Pathogens? A Report on Niche Overlap Nutritional Potentials. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms21124235>
- Reid, L. M., Hamilton, R. I. and Mather, D. E. (1996). Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot. Agriculture and Agri-Food Canada. Technical Bulletin. Publ. 196. 5E. Ottawa, Ontario.
- Rubio, M.B., Quijada, N.M., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E. And Hermosa, R. (2014). Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (6): 1864-1873. <https://doi.org/10.1128/AEM.03375-13>.
- Sartori, M., Nesci, A. and Etcheverry, M. (2015). Infección de *Fusarium verticillioides* y contenido de fumonisinas en granos de maíz de plantas con inflorescencias femeninas cubiertas y no cubiertas. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 47(1): 251-261. <https://www.redalyc.org/pdf/3828/382841103018.pdf>
- Schulthess, F., Cardwell, K. F. and Gounou, S. (2002). The effects of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. *Phytopathology*, 92: 120-128. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.2.120>

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L. and Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3): 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Warham, E. J., Butler, L. D. and Sutton, B. C. (1996). Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. México, D. F.
- Zeilinger, S., Grubera, S., Bansal R. and Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2): 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>