

DIVERSIDAD DE *Trichoderma* PRESENTE EN SUELOS DE *Agave angustifolia* HAW EN LOS VALLES CENTRALES DE OAXACA

Trichoderma DIVERSITY PRESENT IN *Agave angustifolia* HAW SOILS IN CENTRAL VALLEYS OF OAXACA

¹Héctor Osvaldo Ahedo-Quero , ¹Teodulfo Aquino-Bolaños , ²Edgar García-Sánchez , ¹Yolanda Donají Ortiz-Hernández 

¹Instituto Politécnico Nacional. Centro de Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Rural Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR- Oaxaca). Santa Cruz Xoxocotlán-Oaxaca. México. ²CONAHCYT-CIIDIR. [§]Autor de correspondencia: (hahedoq1600@alumno.ipn.mx).

RESUMEN

Las plantaciones de *Agave angustifolia* Haw en los Valles Centrales de Oaxaca prosperan en ambientes áridos, mostrando una notable riqueza biológica en especies vegetales y animales. Sin embargo, la diversidad de hongos microscópicos, especialmente del género *Trichoderma*, ha sido poco estudiada en este agroecosistema clave para la producción de mezcal. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar la diversidad de *Trichoderma* en la rizosfera de *A. angustifolia* y evaluar su potencial para mejorar el cultivo. Se recolectaron muestras de suelo en 22 zonas productoras de agave y se aislaron 35 cepas, de las cuales 11 fueron identificadas mediante análisis morfológico y molecular (secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal). Siete aislamientos se identificaron solo a nivel género y cuatro a nivel de especie: *T. afarsin* (1), *T. atroviride* (1) y *T. asperellum* (2). La cobertura de muestreo fue de 0.82, indicando que se detectó aproximadamente el 82.6 % de las especies estimadas, y los índices de diversidad muestran una comunidad con alta equidad relativa. Se estima que podría haber hasta seis especies presentes. Este es el primer reporte de *Trichoderma* asociado específicamente al agroecosistema de *A. angustifolia* en la región. Dado el potencial de *T. atroviride* y *T. asperellum* como agentes de control biológico y su contribución a la biofertilización, estos hallazgos ofrecen una oportunidad relevante para la sostenibilidad y productividad en el cultivo de agave para mezcal.

Palabras clave: biodiversidad, control biológico, fungí, micromicetos, rizosfera de agave.

ABSTRACT

Agave angustifolia Haw plantations in the Central Valleys of Oaxaca thrive under arid and challenging condition, yet host a remarkable biological richness in plant and animal species. However, the diversity of microscopic fungi, especially of the *Trichoderma* genus, has been little studied in this key agroecosystem for mezcal production. This study aimed to identify the diversity of *Trichoderma* in the rhizosphere of *A. angustifolia* and assess its potential contributions to crop improvement. Soil samples were collected in 22 agave-producing areas and 35 strains were isolated, of which 11 were identified by morphological and molecular analysis (sequencing of the ITS region of ribosomal DNA). Seven isolates were identified only at the genus level and four at the species level: *T. afarsin* (1), *T. atroviride* (1) and *T. asperellum* (2). The sampling coverage was 0.82, indicating that approximately 82.6 % of the estimated species were detected, and the diversity indices show a community with high relative equity. It is estimated that there could be up to six species present. This is the first report of *Trichoderma* specifically associated with the agroecosystem of *A. angustifolia* in the region. Given the potential of *T. atroviride* and *T. asperellum* as biological control agents and their contribution to biofertilization, these findings

offer a relevant opportunity for sustainability and productivity of agave cultivation for mezcal production.

Index words: biodiversity, biological control, micromycetes, fungi, agave rizhosphere.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Oaxaca, el cultivo de agave mezcal representa una fuente de empleo para más de 11 500 productores quienes mantienen en producción 15 000 ha y generan anualmente 63,500 t de agave (COMERCAM, 2023). Este cultivo, base de la bebida alcohólica “mezcal” con denominación de origen, posee gran relevancia económica, social y cultural a las comunidades rurales (Hernández-López, 2018; Espinosa-Meza et al., 2017;).

En los últimos años, la superficie destinada a la producción de mezcal aumento de 97,759 ha en 2018 a 193,501 ha en 2024 (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2022), lo que representa cerca del 60 % de los suelos ocupados para la producción de agave mezcal en el estado. Este crecimiento ha impulsado la transición del sistema agrícola tradicional hacia uno de carácter industrial resultando en cambios en el uso del suelo y prácticas de labranza intensiva que afectan la biodiversidad incluyendo la microbiota edáfica (Rodríguez-Hernández et al., 2024; Bautista-Cruz et al., 2011).

En este contexto, el uso de especies del género *Trichoderma*, surge como una alternativa para mitigar los impactos negativos sobre el suelo y los cultivos. Estos hongos cosmopolitas, presentes en el suelo y rizosfera de múltiples especies vegetales, aportan beneficios como el control biológico de plagas y enfermedades, la mejora de las condiciones edáficas, el aumento de la disponibilidad de nutrientes y la inducción de tolerancia al estrés en plantas (Contreras-Negrete et al., 2025; Scudeletti et al., 2021; Coninck et al., 2020).

Aunque la diversidad *Trichoderma* ha sido ampliamente estudiada, en México persisten vacíos de información sobre la identidad de especies, ecología y potencial biotecnológico. Actualmente la diversidad de *Trichoderma* a nivel mundial es de 375 especies válidas (Cai & Druzhinina, 2021), cuya identificación molecular se realiza mediante el análisis de las regiones *ITS*, *tef1*, y *rpb2* (Dou et al., 2020), utilizando bases de datos especializadas como Trichokey (<http://www.trichoderma.info/>). La identificación precisa es esencial para anticipar las aplicaciones agrícolas y biotecnológicas. La diversidad del género en México asciende a 57 especies, siendo la especie *T. harzianum* la más frecuente y de mayor valor comercial por sus múltiples usos (Ahedo-Quero et al., 2024; Kumar et al., 2014; Torres-De La Cruz et al., 2015), entre los que destacan el control de enfermedades en plantas (Degani & Dor, 2021; Sánchez-Montesinos et al., 2021), la promoción del crecimiento vegetal (Contreras-Cornejo et al., 2024), la reducción de poblaciones de insectos plaga (Poveda, 2021), la mejora de la absorción de nutrientes (Bibi et al., 2024) e inducir el aumento de la diversidad de especies microscópicas benéficas en el suelo (Asghar et al., 2024).

En lo que respecta a su ecología, se han documentado aislamientos de *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. viridescens* y *T. longibrachiatum* en suelos cultivados con *A. tequilana* (Sánchez & Rebolledo, 2010), así como nueve y trece especies en cultivos de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco (Sánchez-Hernández et al., 2018; Torres-De La Cruz et al., 2015) y la presencia de *T. harzianum* en plantaciones de plátano (*Musa x paradisiaca*) en Oaxaca (Sánchez-Espinosa et al., 2021). Estos trabajos permiten conocer la diversidad, distribución y riqueza de *Trichoderma* los cuales son parámetros necesarios para entender cómo está estructurada la rizosfera de un agroecosistema y las funciones que genera. Además, su caracterización permite una futura comparación de las comunidades de hongos presentes en suelos erosionados y no erosionados

de cultivos agrícolas en específico del cultivo *A. angustifolia* Haw.

Por ello, caracterizar las especies presentes en este agroecosistema constituye un paso fundamental para identificar aquellas con potencial en el control biológico de plagas y enfermedades, biofertilización y bioestimulación. En este marco, el objetivo del presente trabajo fue aportar conocimiento sobre la diversidad del género *Trichoderma* asociadas a la rizosfera de *A. angustifolia* en los Valles Centrales de Oaxaca y analizar su potencial para mejorar la productividad y sostenibilidad del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se muestrearon 22 sitios que se ubicaron en los distritos de Tlacolula, Centro, Ocotlán y Ejutla, en parcelas cultivadas con *A. angustifolia* con más de 2 años desde la siembra. En cada sitio se recolectaron cinco submuestras de suelo de la rizosfera a una profundidad de 0-30 cm y a una distancia no mayor de 30 cm de la planta. Las submuestras se integraron en una muestra compuesta por sitio, siguiendo la metodología de Torres-De La Cruz et al. (2015). Las coordenadas, altitud y superficie de los sitios se muestran en la **Tabla I**. El proceso de muestreo se realizó de enero a octubre del año 2023.

Tabla I. Sitios de muestreo para la obtención de *Trichoderma* en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en los Valles Centrales de Oaxaca México.

Nº de sitio	Distrito	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Superficie (ha)
1	Centro	Santa María del Tule	17.04	-96.62	1569	1.1
2	Centro	Santo Domingo Tomaltepec	17.05	-96.62	1583	1.8
3	Centro	San Sebastián Tutla	17.32	-96.67	1541	0.8
4	Tlacolula	San Francisco Lachigolo	17.01	-96.60	1576	0.8
5	Tlacolula	Teotitlán del Valle (Santiago Ixtaltepec)	17.02	-96.56	1627	1
6	Tlacolula	San Jerónimo Tlacoahuaya	17.01	-96.57	1605	1.1
7	Centro	Santa Cruz Xoxocotlán (CIIDIR)	17.02	-96.72	1527	0.15
8	Centro	Santa Cruz Xoxocotlán (Rancho de Cristo)	17.03	-96.72	1530	8.5
9	Tlacolula	Dainzú	17.00	-96.55	1625	0.6
10	Centro	San Raymundo Jalpan	16.98	-96.74	1526	0.6
11	Tlacolula	Teotitlán del Valle	17.00	-96.52	1661	0.6
12	Tlacolula	San Juan Guelavía	16.98	-96.53	1608	0.6
13	Tlacolula	Tlacolula de Matamoros	16.93	-96.48	1624	3
14	Tlacolula	Tlacolula de Matamoros	16.94	-96.47	1623	1.3
15	Tlacolula	San Juan Teitipac	16.91	-96.62	1651	1.4
16	Ocotlán	Santa Catarina Minas	16.78	-96.62	1566	1.1
17	Ocotlán	Ocotlán de Morelos	16.75	-96.68	1535	0.7
18	Tlacolula	Santiago Matatlán	16.87	-96.38	1715	1.8
19	Ocotlán	Ocotlán de Morelos	16.74	-96.66	1534	5.8
20	Tlacolula	Santiago Matatlán (9 puntas)	16.83	-96.35	1913	1.2
21	Ejutla	Ejutla de Crespo	16.62	-96.74	1498	1.1
22	Centro	Santa Catalina de Sienna	17.04	-96.61	1588	0.5

La latitud y longitud están expresadas en formato decimal, se utilizó Google Earth para su determinación. La altitud se encuentra en metros sobre el nivel del mar. La superficie en hectáreas.

Aislamiento de *Trichoderma*

El aislamiento se llevó a cabo en el laboratorio de control biológico del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional). Se utilizó el método de dilución en placa. Se pesaron 10 g de suelo de cada muestra compuesta y se diluyeron en 90 mL de agua destilada estéril (dilución 1:10). Posteriormente, se prepararon cuatro diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000). De cada dilución, se tomó una alícuota de 0.5 mL y se distribuyó sobre placas de Petri con medio papa dextrosa agar (*PDA*) (BD Bioxon™) (Siddiquee, 2017). Se prepararon cinco repeticiones por dilución. Las cajas Petri sembradas se incubaron a 25° C en condiciones de luminosidad de 12 h luz/oscuridad por siete días. El crecimiento de *Trichoderma* fue reconocido por la formación de parches o cojines verdes de conidios. Durante los primeros cinco días de crecimiento, las colonias visibles se transfirieron a cajas de Petri con medio *PDA* y se incubaron siguiendo la metodología de (Siddiquee, 2017; Vargas-Gil et al., 2009). Para la identificación morfológica y molecular, se obtuvieron cultivos monospóricos y se conservaron a 5° C hasta su identificación. Los aislamientos obtenidos se conservan en el laboratorio de control biológico.

Identificación morfológica

Los cultivos monospóricos fueron sembrados en cajas Petri con *PDA* e incubadas durante siete días para determinar las características de la colonia: tamaño, morfología y conidiación. Además, se inoculó una suspensión de esporas sobre discos de *PDA* de 0.5 cm de diámetro, bajo un cubreobjeto, para obtener estructuras microscópicas de cada aislamiento. Los discos inoculados se incubaron a 25° C en una cámara húmeda durante 3-5 días. Se identificaron las estructuras de conidióforos, fíalides, conidios y clamidosporas bajo microscopio marca AmScope de campo claro y foto documentadas. Los cultivos se almacenaron a 4 °C hasta la identificación morfológica y extracción de ADN. Para la identificación

morfológica se utilizaron las guías presentes en Kubicek & Harman (2002) y Siddiquee (2017).

Identificación molecular

De los 35 aislamientos, se seleccionaron 11 aislamientos para su envío e identificación a los laboratorios de Servicios genómicos UGA-LANGEBIO. La identificación de las especies se realizó mediante la secuenciación de las regiones ITS 1 e ITS 4 (White et al., 1990). El ADN genómico se extrajo del micelio homogeneizado en 400 L de buffer de extracción PBS, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Luego, se siguió el protocolo del Kit AxyPrep Multisource Genomic ADN Miniprep (Axigen®) para obtener el ADN. La calidad de ADN se evaluó en gel de agarosa al 1% (Agarosa Ultra Pure, Invitrogen®) y se cuantificó con un espectrofotómetro Perkin Elmer® (Lambda BIO 10®).

Las regiones ITS1, ITS2 y 5.8 del ARN ribosomal se amplificaron mediante PCR, utilizando los iniciadores universales ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (White et al., 1990). La amplificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Ahrens & Seemüller (1992), con algunas modificaciones en las reacciones de PCR cuyo volumen final fue de 25 µL: agua ultrapura estéril (16.05 µL), solución amortiguadora Buffer 10X (2.5 µL), MgCl₂ a 50 mM (1.25 µL), dNTP mezcla a 10 mM (0.5 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 10 pmol (1.25 µL de cada uno), Taq DNA polimerasa (Invitrogen®) a 1U (0.2 µL) y ADN blanco a 50 ng (2 µL). El procedimiento para la PCR consistió en los siguientes ciclos: 1 de 95 °C por 4 min, 35 de 95 °C por 1 min, 35 de 58 °C por 1 min, 35 de 72 °C por 2 min y un ciclo de 72 °C durante 10 min. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para visualización y medida de la especificidad. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®). Los productos se enviaron para su secuenciación a Macrogen®, y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del banco de

genes del National Center for Biotechnology Information (*Trichoderma genbank - Gene - NCBI*, 2024) (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Para la comparación de los valores generados con la secuencia de estudio se consideró una similitud igual o mayor al 97 % (Stackebrandt & Goebel, 1994). Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas usando el programa Crustal_x 2.1 (Thompson et al., 1997). La inferencia filogenética se realizó por el método neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) usando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013). El soporte de las ramas en el árbol de NJ se calculó mediante el método de Bootstrap, usando 1,000 réplicas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se estimaron con el método P distance (Nei & Kumar, 2000), excluyendo gaps y datos faltantes. Los valores de bootstrap ≥ 70 % se consideraron significativos (Felsenstein, 1985). Como grupo externo se utilizó la sinonimia aceptada basada en una secuencia de *Aspergillus flavus* (número de acceso GenBank: AF138287); también se utilizaron secuencias de GenBank de nueve especies de *Trichoderma*: *Trichoderma harzianum* (EU280079), *T. pleuroticola* (JQ040377), *T. virens* (JQ040400), *T. spirale* (EU280092), *T. brevicompactum* (JQ040334), *T. reesei* (JQ040380), *T. longibrachiatum* (JN108926), *T. koningiopsis* (JQ040370) y *T. asperellum* (JQ040317). La elección de los grupos externos se basó en los resultados de la comparación de las secuencias de estudio con la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (*Trichoderma genbank - Gene - NCBI*, 2024).

Análisis de datos

Distribución de aislamientos

Para evaluar la distribución de *Trichoderma* en los sitios de muestreo, se organizaron los aislamientos según su procedencia distrital. Se aplicó la prueba de Ji-Cuadrada (χ^2 , $\alpha = 0.05$) para realizar la prueba de frecuencias esperadas iguales de aislamientos entre los distritos de los Valles Centrales de Oaxaca.

Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía sobre el número promedio de aislamientos por sitio, a fin de comparar la diversidad de *Trichoderma* entre distritos. Cuando se identificaron diferencias significativas, se complementó con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para realizar comparaciones múltiples entre grupos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa R-Studio ®.

Estimación de riqueza y cobertura de especies

Para evaluar el esfuerzo de muestreo y estimar la riqueza total de especies de *Trichoderma*, se construyó una matriz de presencia/ausencia con base en los aislamientos obtenidos en cada distrito. Se consideraron los taxones identificados a nivel de especie (*T. afarasin*, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *Trichoderma* spp.).

Se calcularon parámetros de riqueza para los datos de incidencia mediante el programa en línea iNEXT (Anne Chao's Website - iNEXT.4steps) (Chao & Hu, 2023) se utilizó la metodología presente en el documento (Chao et al., 2020). El programa calculó la riqueza observada (S_{obs}): número de especies registradas en el total de sitios muestreados. Q1: número de especies presentes en un solo sitio (singletons). Q2: número de especies presentes en exactamente dos sitios (Dobletons). También se determinó la cobertura de muestreo y se estimó la presencia de especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de aislamientos

Los 22 sitios de muestreo abarcaron una superficie de 35.55 ha, con un promedio de 1.61 ha por productor. De estos, 11 sitios presentaron aislamientos con características morfológicas de *Trichoderma* lo que representa el 50 % del total muestreado. Los sitios que presentaron aislamientos con características de *Trichoderma* se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Sitios con aislamientos de hongos con características de *Trichoderma* obtenidos de la rizosfera de *Agave angustifolia* Haw en los Valles Centrales de Oaxaca, México.

Sitio	Distrito	Sitio de muestreo (Localidad)	Nº de aislamientos
1	Centro	Santa Maria del Tule	5
2	Centro	Santo Domingo Tomaltepec	4
6	Tlacolula	San Jerónimo Tlacoahuaya	1
7	Centro	Santa Cruz Xoxocotlán (CIIDIR)	5
8	Centro	Santa Cruz Xoxocotlán (Rancho de cristo)	5
9	Tlacolula	Dainzú	1
10	Centro	San Raymundo Jalpan	2
16	Ocotlán	Santa Catarina Minas	5
17	Ocotlán	Ocotlán de Morelos	1
19	Ocotlán	Ocotlán de Morelos	5
22	Centro	Santa Catalina de Sienna	1
II sitios			35

Tabla 3. Distribución de aislamientos de *Trichoderma* por distrito.

Distritos	Nº de Sitios	Nº de aislamientos por distrito	Promedio de aislamientos por distrito	Proporción (%)
Centro	7	22	3.14	62.85
Ocotlán	3	11	3.66	31.42
Tlacolula	11	2	0.18	5.7
Ejutla	1	0	0	0

El distrito Centro presentó el mayor número de aislamientos (22), seguido de Ocotlán (11) y Tlacolula (2), mientras que en Ejutla no se registraron aislamientos (Tabla 3).

Análisis estadístico de la distribución

La prueba de Ji-Cuadrada indicó diferencias significativas en la distribución de aislamientos entre distritos ($\chi^2 = 17.507$, $gl = 3$, $p = 0.0006$), lo que sugiere que la presencia de *Trichoderma* no es homogénea entre las zonas muestreadas. El análisis de varianza (ANOVA) sobre el promedio de aislamientos por sitio también mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.0000$), confirmando una mayor concentración entre los distritos Centro y Ocotlán respecto a Tlacolula y Ejutla. La prueba de Tukey reveló que los

promedios de estos dos primeros distritos fueron significativamente mayores ($p \leq 0.05$). Estas diferencias podrían deberse a que la zona de Centro y Ocotlán son tierras de cultivo más jóvenes que las que se encuentran en Tlacolula y Ejutla. Y en el caso de Ejutla el que solo se haya muestreado un sitio.

Estimación de la riqueza y cobertura de especies

A partir de una matriz de datos (presencia/ausencia) de *Trichoderma* en los 22 sitios muestreados, se registró una riqueza observada (especies observadas) de cuatro taxones, correspondientes a *T. afarsin*, *T. asperellum*, *T. atroviride* y un grupo identificado como *Trichoderma* spp.

La estimación de cobertura de muestreo señala que se capturó el 82.6 % de las especies presentes en los Valles Centrales de Oaxaca, con cuatro especies observadas y 11 aislamientos. Si se duplicara el tamaño de la muestra, la cobertura aumentaría a el 93.7 %, sugiriendo que aún podrán registrarse especies adicionales. La presencia de dos especies con un solo aislamiento (singletons) y una con dos aislamientos (Doubletons) ($QI = 2$, $Q2 = 1$) refleja que una fracción de la diversidad está compuesta por especies poco frecuentes o con distribución restringida, posiblemente asociada a microhábitats específicos.

Estos valores sugieren que, aunque el esfuerzo de muestreo fue suficiente para caracterizar el núcleo de la comunidad de *Trichoderma*, persisten vacíos en la detección de especies raras. Esto es consistente con estudios previos que reportan que la diversidad microbiana en suelos agrícolas está fuertemente influenciada por la heterogeneidad espacial y la disponibilidad de recursos (Zhang y Zhuang, 2018). La identificación de estas especies raras podría aportar cepas con potencial adaptativo a condiciones ambientales extremas, relevantes

para estrategias de biocontrol en agroecosistemas semiáridos.

Las estimaciones asintóticas obtenidas con iNEXT proyectan que, con un muestreo completo, la riqueza total ($q = 0$) podría alcanzar aproximadamente 5.91 especies (IC 95 %: 1.65–10.17), mientras que la diversidad de Shannon ($q = 1$) se incrementaría a 3.73 (IC 95 %: 1.16–6.30) y la diversidad de Simpson ($q = 2$) a 2.62 (IC 95 %: 0.43–4.82) (Figura 1). Esto confirma que el esfuerzo de colecta fue suficiente para caracterizar la estructura general de la comunidad, pero un muestreo adicional podría aumentar principalmente la detección de especies raras y, en menor medida, la equidad general de la comunidad.

Desde una perspectiva aplicada, la búsqueda de estas especies menos comunes (raras) podría ser estratégica, ya que es posible que incluyan cepas con propiedades antifúngicas, antimicrobianas o tolerancia a estrés hídrico, características deseables para programas de control biológico y mejoramiento de suelos en cultivos de agave.

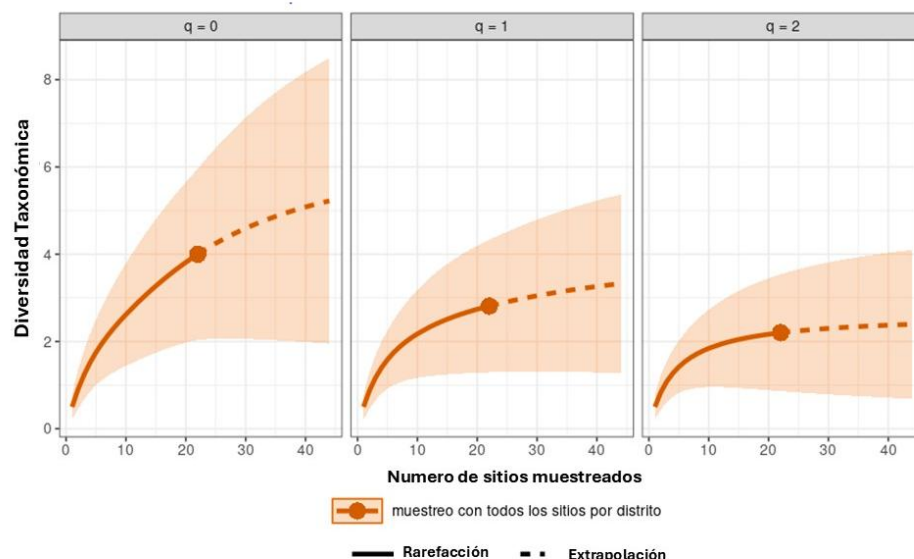


Figura 1. Curvas de rarefacción y extrapolación de la diversidad de *Trichoderma* en los distritos de los Valles Centrales de Oaxaca, estimadas con iNEXT.

El promedio de aislamientos por sitio (1.74) fue menor que el reportado por Sánchez & Rebolledo (2010) en *A. tequilana* (2.23), posiblemente debido al diseño de muestreo, tipo de suelo y clima. Sin embargo, el número de especies identificadas fue similar: tres en *A. angustifolia* y cuatro en *A. tequilana*. Es relevante señalar que para *A. tequilana* se muestrearon 60 sitios. Lo que podría indicar que nuestra metodología permitió obtener casi la misma cantidad de especies a pesar de contar con la mitad de los muestreos.

El sistema de producción es un factor determinante en la presencia o ausencia de *Trichoderma*. En este estudio, se observó que en Tlacolula (zona de mayor producción de agave en el estado y caracterizada por un modelo agroindustrial) solo se detectaron dos cepas. En esta región, el monocultivo y el uso frecuente de pesticidas representan un riesgo para la diversidad y la salud del suelo (Bautista & Smit, 2012). De acuerdo con Bautista-Cruz et al. (2007), el carbono de la biomasa microbiana es menor en suelos trabajados con maquinaria agrícola en comparación con aquellos manejados con labranza mínima.

En contraste con los sistemas agrícolas tradicionales, estudios como los de Chimal-Sánchez et al. (2018) y Hernández-Morales et al., (2014) han revelado una notable diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en zonas de agave manejadas como vegetación secundaria, identificando hasta 48 morfoespecies en cultivos de agave mezcal en Oaxaca. Entre las familias más representativas destacan Glomeraceae, Gigasporaceae y Acaulospora. Estos trabajos concluyen que tales sistemas actúan como reservorios clave de especies fúngicas con potencial agrícola relevante. Así, enfocar la búsqueda de *Trichoderma* en áreas de vegetación secundaria podría ampliar significativamente el conocimiento sobre la diversidad de especies presentes. Sánchez-Espinosa et al. (2021) y Santander & Olave (2014) mencionan que la interacción entre hongos micorrízicos y *Trichoderma* puede ser negativa. Es

posible que los hongos micorrízicos tengan una mejor adaptación a las condiciones bióticas del agroecosistema agave mezcal. En consecuencia, se requieren estudios que profundicen en la relación *Trichoderma*-micorrizas para comprender sus interacciones, impacto en la diversidad y funcionalidad microbiana en el suelo.

Especies identificadas

Los cultivos en placas de Petri permitieron identificar los hongos como *Trichoderma* por su patrón de crecimiento y la coloración verde oliva (claro y oscura), y verde amarillento. El medio de cultivo presentó tonalidades blanco lechoso, verdes y amarillo. Se observaron diferencias de crecimiento en las colonias entre sitios de muestreo. Las imágenes de crecimiento en cajas de Petri se compararon con el manual práctico de diversidad biológica y molecular de especies de *Trichoderma* en regiones tropicales de Siddiquee (2017) (**Figura 2A y 2B**).

El uso de imágenes fotográficas de hongos microscópicos, es una herramienta práctica para la identificación de hongos a nivel género, disminuyendo tiempos para su identificación, además el analizar características como olor y color del medio de cultivo o estructuras reproductivas, puede ayudar a reforzar el proceso de identificación (Zieliński et al., 2020; Navi et al., 1999). Sin embargo, la identificación a nivel especie requiere de técnicas moleculares. Contar con un sólido reconocimiento y fotografías que permitan al identificador reconocer el género, permite disminuir el error de sesgo en el aislamiento en laboratorio.

Identificación molecular

La identificación molecular permitió reconocer siete cepas a nivel de género (letras en color azul en la **Figura 3**) y cuatro a nivel especie (letras en color verde en la **Figura 3**). De estas últimas, *T. afarasin*, provino de Santa Catarina de Sienna. *T. atroviride* de Santa Cruz Xoxocotlán (Rancho de Cristo) y *T. asperellum* de Dainzu y San Jerónimo Tlacoahuaya.

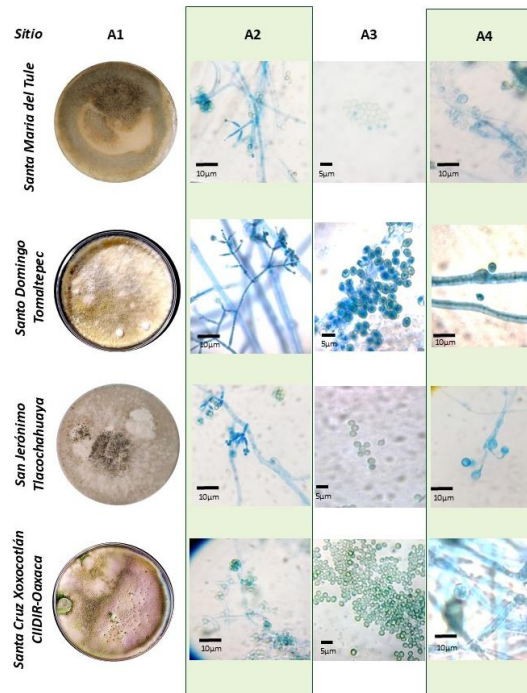


Figura 2A. Crecimiento y morfología de *Trichoderma* presentes en sitios sembrados con *A. angustifolia* en Oaxaca México. A1) Crecimiento en la caja de Petri, A2) conidióforos, A3) conidios, A4) clamidosporas.

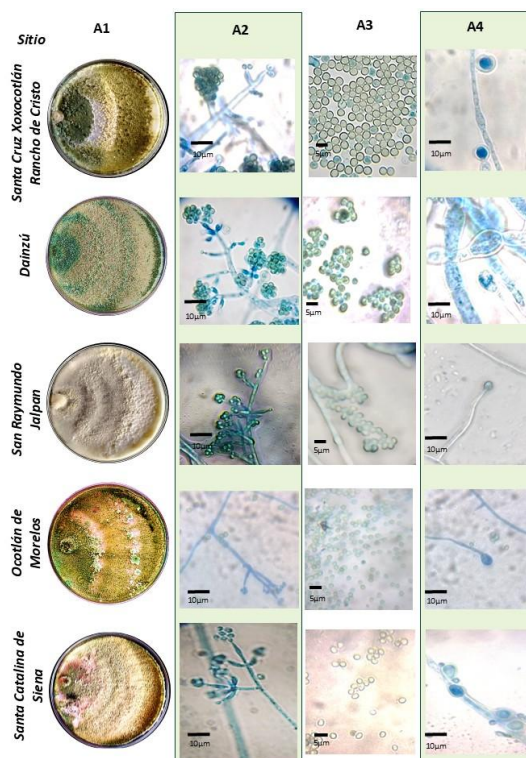


Figura 2B Crecimiento y morfología de *Trichoderma* presentes en sitios sembrados con *Agave angustifolia* en Oaxaca México. A1) Crecimiento en la caja de Petri, A2) conidióforos, A3) conidios, A4) clamidosporas.

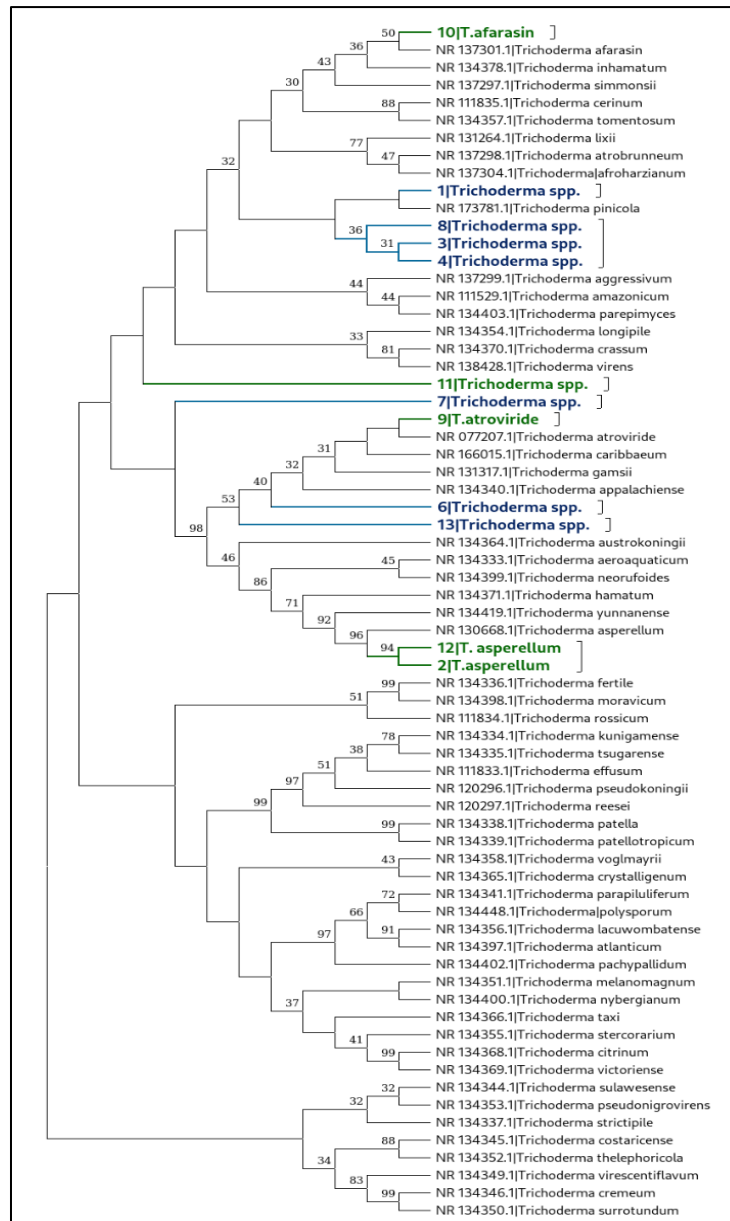


Figura 3. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias ITS.

Este hallazgo constituye el primer reporte de estas especies en el agroecosistema *A. angustifolia* Haw en el estado de Oaxaca. En la literatura, *T. afarasin* forma parte del complejo *T. harzianum* de nueve agregados (Ismail et al., 2024). Este complejo es morfológicamente similar pero biológicamente diferente y en la actualidad se continúa expandiendo su identificación molecular (Zhang & Zhuang, 2018). Barrera et al. (2021)

reportan *T. afarasin* en Argentina, sin embargo, no hay reportes de sus aplicaciones prácticas.

Trichoderma atroviride, es ampliamente estudiado por su eficacia como agente de control biológico, biofertilizante y en biorremediación, aunque no hay reportes específicos para agave mezcal. *T. atroviride* se reporta como antagonista a enfermedades como antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), podredumbre blanca de la cebolla

(*Sclerotium cepivorum*) y a diversas especies de *Fusarium* (*Fusarium* spp.) (Kim et al., 2023; Coninck et al., 2020; McLean et al., 2012). *Fusarium oxysporum* generan la enfermedad de la "marchites de la agave" por lo que *T. atroviride* puede ser una opción para mejorar la sanidad del cultivo (Quiñones-Aguilar et al., 2023).

Trichoderma asperellum se ha estudiado ampliamente, llegando a la conclusión de que su empleo en la agricultura ofrece el control biológico de plagas y enfermedades, la mejora en la absorción de nutrientes, funciones larvicidas e inducción de resistencia a la sequía en plantas. Su uso combinado con fungicidas también ha sido evaluado. La eficacia de *T. asperellum* ha sido exitosa contra patógenos como *Neofusicoccum*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Penicillium* y *Fusarium* (Stracquadanio et al., 2020). Estas últimas son responsables del fenómeno conocido como "damping-off", enfermedad que representa una amenaza para los productores de planta de agave en vivero (Bailón-Ortiz & Amábilis-Sánchez, 2024).

La presencia confirmada de *Trichoderma* abre nuevas líneas de investigación para evaluar su eficacia en el manejo de problemas fitosanitarios de importancia en el agave, como la pudrición de la piña de la agave provocada por *Pectobacterium carotovorum* o plagas como el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*).

CONCLUSIONES

Este estudio representa un avance significativo en el conocimiento del microbiota asociado a *Agave angustifolia* Haw, al documentar la presencia y diversidad del género *Trichoderma* en de *T. afarasin*, *T. atroviride* y *T. asperellum* en la rizosfera en los Valles Centrales de Oaxaca. Los resultados indican que la comunidad de *Trichoderma* en los Valles Centrales de Oaxaca presenta una alta equidad relativa, pero una riqueza moderada con potencial de incremento mediante un mayor esfuerzo de muestreo. La detección de especies raras no solo aportaría al conocimiento de

la biodiversidad local, sino que podría ampliar el repertorio de cepas útiles para el manejo sustentable de cultivos, especialmente en sistemas donde el estrés hídrico y la presión de patógenos son factores limitantes. Las especies identificadas poseen potencial biotecnológico para uso en el control biológico, biofertilización y bioestimulación del cultivo agave.

Estos hallazgos abren la puerta a estrategias de manejo más sostenibles, reduciendo la dependencia de agroquímicos y fortaleciendo la resiliencia del cultivo frente a estrés hídrico, patógenos, sobreexplotación de suelo y al cambio climático. Asimismo, evidencian la necesidad de ampliar el muestreo para estimaciones más precisas y para evaluar la interacción de *Trichoderma* con otros componentes microbianos del agroecosistema. En síntesis, *Trichoderma* no solo forma parte de la biodiversidad oculta de los Valles Centrales, sino que se perfila como un aliado estratégico para el futuro del agave mezcalero en Oaxaca.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYHT por el apoyo económico otorgado por medio de la beca de posgrado número: 451094.

REFERENCIAS

- Ahedo-Quero, H. O., Aquino-Bolaños, T., Ortiz-Hernández, Y. D., & García-Sánchez, E. (2024). *Trichoderma* diversity in México: A systematic review and meta-analysis. *Diversity*, 16(1), 68. <https://doi.org/10.3390/d16010068>
- Ahrens, U., & Seemüller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82(8), 828. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-828>
- Asghar, W., Craven, K. D., Kataoka, R., Mahmood, A., Asghar, N., Raza, T., & Iftikhar, F. (2024). The application of *Trichoderma* spp., an old but new useful fungus, in

- sustainable soil health intensification: A comprehensive strategy for addressing challenges. *Plant Stress*, 12, 100455. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100455>
- Bailón-Ortiz, Á. Z. & Amábilis-Sánchez, M. J. (2024). Identificación de agentes causales de la pudrición seca de *Agave potatorum* Zucc en vivero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 11(1), 11-20. <https://doi.org/10.60158/rma.v11i1.417>
- Barrera, V. A., Iannone, L., Romero, A. I., & Chaverri, P. (2021). Expanding the *Trichoderma harzianum* species complex: Three new species from argentine natural and cultivated ecosystems. *Mycologia*, 113(6), 1136–1155. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1947641>
- Bautista, J. A., & Smit, M. A. (2012). Sustentabilidad y agricultura en la “región del mezcal” de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1), 5–20. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1632>
- Bautista-Cruz, A., Carrillo-González, R., Arnaud-Viñas, M. R., Robles, C., & de León-González, F. (2007). Propiedades de fertilidad del suelo en plantaciones de *Agave angustifolia* Haw. *Soil and Tillage Research*, 96(1), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.08.001>
- Bautista-Cruz, A., León-González, F. D., Carrillo-González, R. & Robles, C. (2011). Identification of soil quality indicators for maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) plantations in Southern Mexico. *African Journal of Agricultural Research*, 6(20), 4796–4799. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.203>
- Bibi, H., Ur-Rahim, H., Anwar-Khan, A., Haris, M., Iqbal, M., Ali, R., El-Sheikh, M. A., & Kaushik, P. (2024). Harmonized tripartite approach: Enhancing nutrient accessibility, uptake, and wheat productivity through *Trichoderma harzianum*, compost, and phosphorus synergy. *Journal of King Saud University-Science*, 36(103106), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103106>
- Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: Authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, 107(1), 1–69. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>
- Chao, A., & Hu, K.-H. (2023). User's Guide for iNEXT.4steps Online: Software for Four-Step Biodiversity Analysis based on iNEXT [https://chao.shinyapps.io/iNEXT_4steps]. iNEXT.4steps.
- Chao, A., Kubota, Y., Zelený, D., Chiu, C., Li, C., Kusumoto, B., Yasuhara, M., Thorn, S., Wei, C., Costello, M. J., & Colwell, R. K. (2020). Quantifying sample completeness and comparing diversities among assemblages. *Ecological Research*, 35(2), 292–314. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12102>
- Chimal-Sánchez, E., Reyes-Jaramillo, I., Salmerón-Castro, J. Y., Vázquez-Pérez, N., & Varela-Fregoso, L. (2018). Cuatro nuevos registros de hongos micorrizógenos arbusculares (*glomeromycota*) asociados con *Agave karwinskii* y *A. angustifolia* (agavaceae) de Oaxaca, México. *Acta Botanica Mexicana*, 125, 173–187. <https://doi.org/10.21829/abm125.2018.1356>
- COMERCAM. (2023). Recuperado el 21 de enero de 2024, de https://comercam-dom.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- Coninck, E., Scaufaire, J., Gollier, M., Liénard, C., Foucart, G., Manssens, G., Munaut, F., & Legrève, A. (2020). *Trichoderma atroviride* as a promising biocontrol agent in seed coating for reducing *Fusarium* damping-off on maize. *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 637–651. <https://doi.org/10.1111/jam.14641>
- Contreras-Cornejo, H. A., Schmoll, M., Esquivel-Ayala, B. A., González-Esquivel, C. E., Rocha-Ramírez, V., & Larsen, J. (2024). Mechanisms for plant growth promotion activated by

- Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystems. *Microbiological Research*, 281(127621), 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127621>
- Contreras-Negrete, G., Valiente-Banuet, A., Molina-Freaner, F., Partida-Martínez, L. P., & Hernández-López, A. (2025). Agricultural practices and environmental factors drive microbial communities in the mezcal-producing *Agave angustifolia* Haw. *Microbial Ecology*, 87(1), 181.
<https://doi.org/10.1007/s00248-025-02496-2>
- Degani, O., & Dor, S. (2021). *Trichoderma* biological control to protect sensitive maize hybrids against late wilt disease in the field. *Journal of Fungi*, 7(315), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/jof7040315>
- Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., Wang, M., Li, Y., Wang, X., Xie, H., Chen, J., & Zhang, C. (2020). MIST: A Multilocus Identification System for *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18), e01532–20.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01532-20>
- Espinosa-Meza, D. E., Rivera-González, G., & Maldonado-Ángeles, B. E. (2017). Caracterizando la producción y organización de los mezcaleros en Matatlán, México “capital mundial del mezcal”. *Estudios Sociales Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 27(50), 1–30.
<https://doi.org/10.24836/es.v27i50.465>
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1086/284325>
- Hernández-López, J. de J. (2018). El mezcal como patrimonio social: de indicaciones geográficas genéricas a denominaciones de origen regionales. *Em Questão*, 24(2), 404–433.
<http://dx.doi.org/10.19132/1808-5245242.404-433>
- Hernández-Morales, J. L., López-Sánchez, C., & Palma-Cruz, F. de J. (2014). Caracterización morfológica de micorriza arbuscular asociada a *Agave potatorum* Zucc. con potencial de uso agronómico. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 1(2), 82–93.
- Ismaiel, A., Jambhulkar, P. P., Sinha, P., & Lakshman, D. K. (2024). *Trichoderma*: harzianum complex clade species in soils of central and south america: revision and distribution. *Biology and Life Sciences*, 10, 813.
<https://doi.org/10.20944/preprints202409.0499.v1>
- Kim, S. H., Lee, Y., Balaraju, K., & Jeon, Y. (2023). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma longibrachiatum* as biocontrol agents in controlling red pepper anthracnose in korea. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1201875.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1201875>
- Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (2002). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics (Vol. 1). Taylor & Francis.
- Kumar, S., Thakur, M., & Rani, A. (2014). *Trichoderma*: mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research*, 9(53), 3838–3852.
<https://doi.org/10.5897/AJAR2014.9061>
- McLean, K. L., Hunt, J. S., Stewart, A., Wite, D., Porter, I. J., & Villalta, O. (2012). Compatibilidad de un agente de biocontrol de *Trichoderma atroviride* con prácticas de manejo de cultivos de allium. *Crop Protection*, 33, 94–100.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.11.018>
- Navi, S. S., Bandyopadhyay, R., Hall, A. J., & Bramel-Cox, P. J. (1999). A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain (No. 59). *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*. 118 p.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.

- Poveda, J. (2021). *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biological Control*, 159(104634), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>
- Quiñones-Aguilar, E. E., Montoya-Martínez, A. C., Rincón-Enríquez, G., & López-Pérez, L. (2023). Inoculación de bulbilos de *Agave tequilana* con hongos micorrízicos arbusculares: efecto en el crecimiento y biocontrol contra *Fusarium oxysporum*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 24(1), e3043. https://doi.org/10.21930/rcta.vol24_num1_art:3043
- Rodríguez-Hernández, R., Castellanos-Bolaños, J. F., Contreras-Hinojosa, J. R., Ruiz-Ríos, T. N., & García-Sibaja, M. (2024). Cultural value of tree species with potential to restore agroforestry systems with agave in the state of Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 15(85), 4–26. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v15i85.1473>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sánchez-Hernández, L., Arias-Mota, R. M., Rosique-Gil, J. E., & Pacheco-Figueroa, C. J. (2018). Diversidad del género *Trichoderma* (hypocreae) en un área natural protegida en Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana*, 123, 167–182. <https://doi.org/10.21829/abm123.2018.1269>
- Sánchez, V., & Rebolledo, O. (2010). Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de los altos sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 11–18.
- Sánchez-Espinosa, A. C., Villarruel-Ordaz, J. L., & Maldonado-Bonilla, L. D. (2021). Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico. *Biotechnia*, 23(1), 127–134. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v23i1.1310>
- Sánchez-Montesinos, B., Santos, M., Moreno-Gavira, A., Marín-Rodulfo, T., Gea, F. J., & Diáñez, F. (2021). Biological control of fungal diseases by *Trichoderma aggressivum* f. *Europaeum* and its compatibility with fungicides. *Journal of Fungi*, 7(8), 598. <https://doi.org/10.3390/jof7080598>
- Santander, C., & Olave, J. (2014). Efecto de la interacción del hongo micorrízico arbuscular (AMF) *Glomus intraradices* y *Trichoderma harzianum* sobre la producción de plantines de melón en zonas áridas. *IDESIA*, 32(2), 21–28.
- Scudeletti, D., Crusciol, C. A. C., Bossolani, J. W., Moretti, L. G., Momesso, L., Servaz Tubaña, B., De Castro, S. G. Q., De Oliveira, E. F., & Hungria, M. (2021). *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, 12, 645542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). *Economía y Sectores Productivos*. <https://www.inegi.org.mx/temas/agricultura/>
- Siddiquee, S. (2017). Molecular Characteristics of *Trichoderma* Strains. En S. Siddiquee (Ed.), *Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions* (pp. 75–102). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7_5
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal for Systematic Bacteriology*, 44(4), 846–849. [https://doi.org/0020-7713/94/\\$04.00+0](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7_5)
- Stracquandano, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal activity of

- bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium. *Journal of Fungi*, 6(4), 263.
<https://doi.org/10.3390/jof6040263>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Torres-De La Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De La Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947–961.
<https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Trichoderma genbank—Gene—NCBI. (2024). National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=trichoderma%20gen%20bank>
- Vargas-Gil, S., Pastor, S., & March, G. J. (2009). Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. And *actinomyces* from soil with culture media. *Microbiological Research*, 164(2), 196–205.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.11.022>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). 38—Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols* (pp. 315–322). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang, Y.-B., & Zhuang, W.-Y. (2018). New species of *Trichoderma* in the harzianum, longibrachiatum and viride clades. *Phytotaxa*, 379(2), 131–142.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.379.2.1>
- Zieliński, B., Sroka-Oleksiak, A., Rymarczyk, D., Piekarczyk, A., & Brzychczy-Włoch, M. (2020). Deep learning approach to describe and classify fungi microscopic images. *PLOS ONE*, 15(6), e0234806.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234806>