



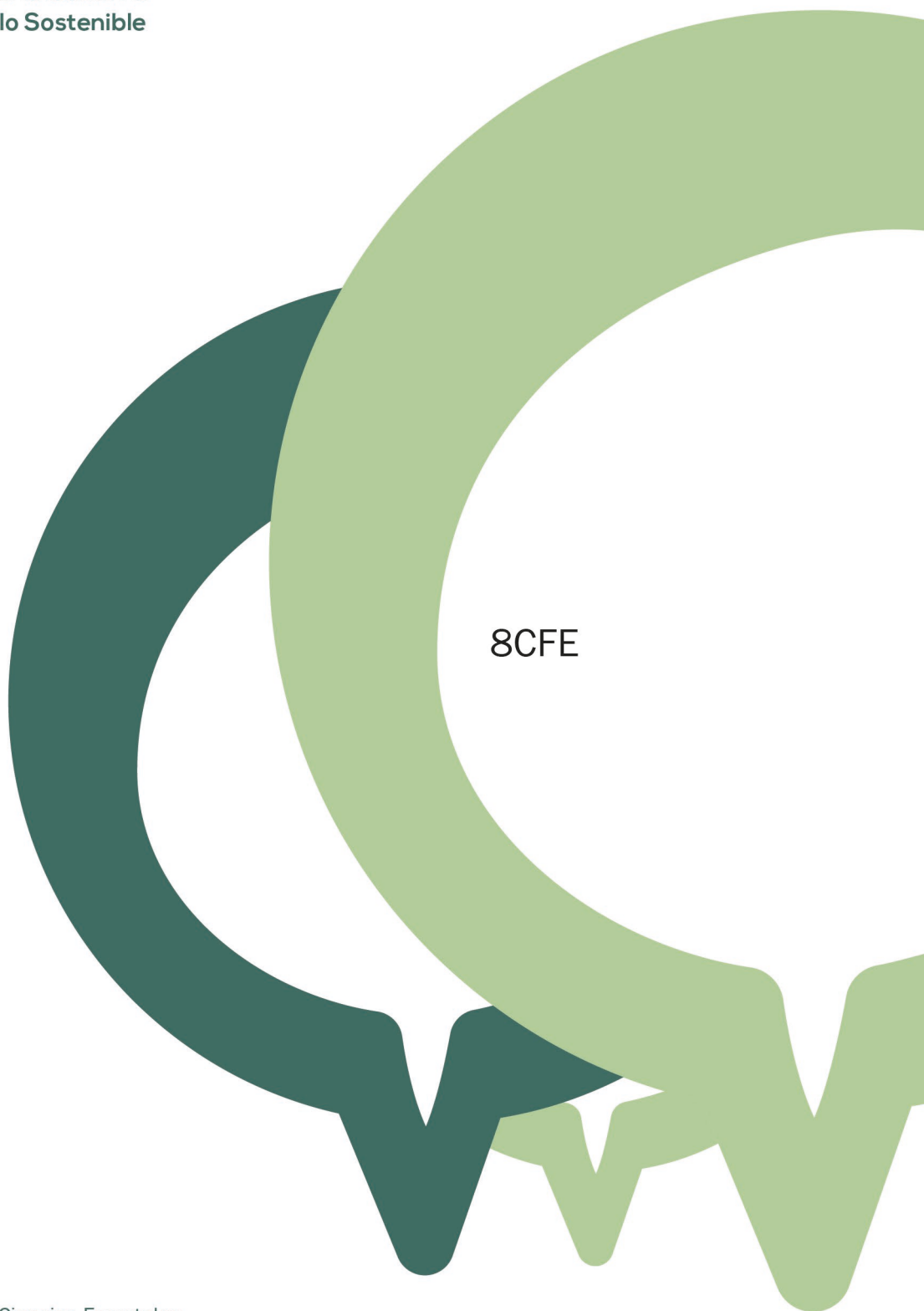
2022  
Lleida

27·1  
junio · juny  
julio · juliol

Cataluña  
Catalunya

## 8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



## Aislamiento y caracterización de especies de *Trichoderma* con efecto antagonista sobre *Phytophthora cinnamomi* en focos de seca en Andalucía

RUIZ-GÓMEZ, F.J.<sup>1</sup>, MIGUEL-ROJAS, C.<sup>1</sup>, NAVARRO-CERRILLO, R.M.<sup>1</sup> y PÉREZ-DE-LUQUE, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Forestal. Laboratorio de Ecofisiología de Sistemas Forestales ECSIFOR- ERSAF. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Crta. IV, km. 396, E-14071 Córdoba..

<sup>2</sup> Área de Mejora Vegetal y Biotecnología, IFAPA. Centro Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal s/n, Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

### Resumen

*Phytophthora cinnamomi* es el agente de podredumbre de raíz más agresivo para la encina. Un trabajo publicado en 2016 mostró la relación entre la presencia de *Trichoderma* spp. y la escasez de ADN de *Phytophthora* spp. en encinas localizadas en zonas con diagnóstico positivo del patógeno, así como la influencia de la estructura y composición del microbioma en la defoliación. En 2019 se tomaron muestras en cinco de estas localizaciones, en las provincias de Huelva, Sevilla y Córdoba. Ocho de los árboles muestreados se mantenían en condiciones sobresalientes en lugares donde la enfermedad había avanzado considerablemente. Se realizó el aislamiento por métodos clásicos de oomicetos y hongos en muestras de suelo de la rizosfera y raíz. A partir del suelo se identificaron 15 aislados diferentes de *Trichoderma* spp. que presentaron un grado de inhibición del crecimiento de *P. cinnamomi* superior al 75% en ensayos *in vitro*. Se identificaron distintas relaciones de antagonismo dependiendo de la especie de *Trichoderma* spp., como la competencia interespecífica, la antibiosis y la predación. La presencia de estas cepas de *Trichoderma* podría desempeñar un papel fundamental en la supervivencia a medio plazo de pies localizados en áreas afectadas por la podredumbre de raíz.

### Palabras clave

*Phytophthora cinnamomi*, *Trichoderma* spp., antagonismo, elicitación.

### 1. Introducción

El decaimiento de la encina (*Quercus ilex* L.) en las dehesas de la Península Ibérica es uno de los problemas de sanidad forestal más preocupantes y más estudiados en España de las últimas 3 décadas (Brasier *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 2002; Ruiz-Gómez *et al.*, 2019). Estos ecosistemas de encinar adehesado ocupan más del 66% de los 3,3 millones ha de dehesa distribuidas por la península (Moreno y Pulido, 2008; Díaz Esteban y Pulido Díaz, 2009), jugando un papel clave en la sostenibilidad del medio rural, así como en la conservación de recursos naturales y biodiversidad (Ruiz-Gómez *et al.*, 2019). Una muestra de la gran biodiversidad que albergan éstos ecosistemas agrosilvopastorales es el elevado número de especies fúngicas que habitan en la rizosfera de las encinas (Ruiz Gómez *et al.*, 2019).

Entre las causas del decaimiento de la encina, uno de los principales desencadenantes de graves episodios de defoliación y mortalidad es la podredumbre de raíz causada por los oomicetos, en concreto, *Phytophthora cinnamomi* Rands. (Sánchez *et al.*, 2002). Este oomiceto, considerado como uno de los patógenos más importantes en ecosistemas forestales en todo el mundo (Burgess *et al.*, 2017), invade las raíces secundarias de la encina, colapsando los tejidos conductores del xilema y originando zonas de destrucción celular en el córtex y los tejidos parenquimatosos (Ruiz Gómez *et al.*, 2015), lo que conlleva la pudrición y pérdida de las raíces absorbentes.

Por otro lado, los síntomas de la podredumbre de raíz y el estado fitosanitario del arbolado infectado presentan patrones de distribución aleatorios. Trabajos previos muestran que la defoliación no se relaciona bien con la ocurrencia e incidencia del patógeno (Navarro-Cerrillo *et al.*, 2019;

Sánchez-Cuesta *et al.*, 2021), siendo frecuente encontrar pies en buen estado en zonas de riesgo elevado de infección, o en focos donde el resto del arbolado se encuentra gravemente afectado. Este patrón puede ser consecuencia de varias razones, incluyendo la influencia de las complejas interacciones que tienen lugar entre la comunidad microbiana del suelo y la rizosfera de las plantas. La estructura y composición del componente biológico del suelo modula la biodiversidad de la vegetación, las características del suelo y el control de patógenos (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020). En dicho sentido, la presencia de especies beneficiosas como ectomicorrizas (EcM), micorrizas arbusculares (AM) u otros organismos endófitos de raíz, puede beneficiar a la planta en diferentes sentidos, incluyendo la mejora de las funciones de absorción de agua y nutrientes, o ejerciendo un control sobre los patógenos de raíz, por competencia, exclusión o predación (Pérez-de-Luque *et al.*, 2017; Tamayo-Vélez y Osorio, 2018). Entre los organismos de control que nos podemos encontrar en las dehesas se encuentran los hongos del género *Trichoderma*, entre los cuales encontramos especies frecuentemente usadas para control biológico en agricultura (Vinale *et al.*, 2008).

Concretamente, se ha demostrado el efecto antagonista de *Trichoderma* spp. sobre otras especies del género *Phytophthora* spp. (Chemeltorit *et al.*, 2017; Promwee *et al.*, 2017; Widmer, 2014), incluyendo *Phytophthora cinnamomi* en plántones de vivero de *Quercus ilex* subsp. *ilex* (Aleandri *et al.*, 2015). En un trabajo previo en el que se caracterizó la composición y estructura de la microbiota de la rizosfera de encinas en dehesas de Andalucía, se identificó una relación significativa entre la abundancia de algunos clústeres de *Trichoderma* spp. y la escasez, o incluso ausencia, de especies patógenas de *Phytophthora* spp. en el suelo, incluyendo *P. cinnamomi* (Ruiz Gómez *et al.*, 2019). Basándonos en dicho trabajo, y en las observaciones de campo, establecemos como hipótesis que algunos pies localizados en zonas con diagnóstico positivo de *P. cinnamomi* podrían verse menos afectados por la podredumbre de raíz debido a la presencia en su rizosfera de especies de *Trichoderma* spp. con potencial antagonista sobre el patógeno.

## 2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es aislar e identificar especies de *Trichoderma* spp. en la rizosfera de pies de encina sanos situados en localizaciones afectadas por podredumbre de raíz, que pudieran tener una acción antagonista frente a *Phytophthora cinnamomi*, así como testar dicha actividad antagonista *in vitro*. Para ello se plantearon los siguientes subobjetivos: i) Identificar los pies candidatos, analizando las matrices de frecuencia de unidades taxonómicas identificadas a partir de técnicas de metagenómica (Operational Taxonomic Units - OTUs) de las muestras recogidas en 2015 (Ruiz-Gómez *et al.*, 2019) y caracterizando el estado fitosanitario de esos pies en campo 4 años después; ii) Aislar e identificar las especies de oomicetos y *Trichoderma* spp. presentes en la rizosfera de dichos árboles y iii) Realizar un test *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial y micoparasitismo para identificar las cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista sobre *Phytophthora cinnamomi*. Adicionalmente, éste estudio servirá para confirmar la utilidad de las técnicas de *metabarcoding* para caracterizar la comunidad microbiana del suelo.

## 3. Metodología

### Selección de pies y recolección de muestras

Partiendo de la tabla de frecuencias de taxones (OTUs) obtenida en Ruiz-Gómez *et al.* (2019), se seleccionaron pies de encina que cumplieran con las siguientes características: i) Estar localizados en una parcela con diagnóstico positivo de *P. cinnamomi* y que presentara un aumento de la defoliación media de la parcela en los últimos 4 años; ii) Que en el análisis realizado sobre las muestras de 2015 se identificaran OTUs de *Trichoderma* spp. Con estas características se seleccionaron un total de 11 pies en 6 parcelas situadas en las provincias de Huelva, Sevilla y Córdoba (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) de los 11 pies seleccionados, para el conjunto de los OTUs identificados dentro del género *Trichoderma* spp., el conjunto de OTUs identificados dentro del género *Phytophthora* spp., y el OTU#4, identificado como *P. cinnamomi*. Los valores pertenecen a la matriz de frecuencias rarificada (Ruiz-Gómez et al. 2019).

ID	Parcela	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Phytophthora</i> spp.	<i>P. cinnamomi</i>
1	1023 (Córdoba)	351	121	-
2	1101 (Córdoba)	469	3626	-
3	1027 (Huelva)	8114	223	-
4	1027 (Huelva)	4565	369	10
5	1028 (Huelva)	1240	43	-
6	1028 (Huelva)	610	195	-
7	1048 (Sevilla)	8727	6345	1755
8	1048 (Sevilla)	183	9181	167
9	1050 (Sevilla)	5533	70	-
10	1050 (Sevilla)	5142	20	-
11	1050 (Sevilla)	2860	21	-

En marzo de 2019 se realizó una campaña de campo, en la que se midieron el diámetro del fuste y la altura de todos los pies pertenecientes a las parcelas de estudio, incluyendo los pies analizados, con ayuda de una cinta métrica y un hipsómetro digital Vertex IV (Haglöf Sweden AB, Sweden). También se evaluó el porcentaje de defoliación de estos pies, siguiendo las instrucciones de evaluación del ICP Forest (Eichhorn et al., 2017). Así mismo, se tomaron muestras de suelo de la rizosfera de los pies analizados, siguiendo la metodología descrita en Zamora-Rojas et al. (2014). Las muestras se guardaron en bolsas de plástico, y se conservaron en contenedor frigorífico a 4°C hasta su llegada al laboratorio.

#### Aislamiento de hongos del género *Trichoderma* spp. y oomicetos:

Las muestras de suelo de la rizosfera tomadas de los pies seleccionados fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente homogeneizadas mediante procedimientos mecánicos. Una fracción de dicha muestra fue colocada en contenedores de plástico de 2L después de eliminar los restos de material vegetal para realizar una prueba de captura en trampa vegetal mediante suspensión en agua ("soil baiting"). Las trampas vegetales utilizadas fueron hojas frescas juveniles de rododendro (*Rhododendrum ponticum* L.), azalea (*Rhododendrum indicum* L.), encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota*) y alcornoque (*Quercus suber* L.), cultivadas exprofeso para este tipo de ensayos, junto con pétalos de clavel blanco comercial (*Dianthus cariophyllus* L.). Las trampas se retiraron cuando aparecieron lesiones necróticas y estas fueron transferidas a medio selectivo PARPBH (Jeffers y Martin, 1986). Los organismos que crecieron en este medio fueron transferidos a medio agar zanahoria.

El resto de la muestra de suelo se pasó a través de un tamiz de 2 mm y la fracción fina resultante se utilizó para realizar el aislamiento de *Trichoderma* spp. mediante la metodología de diluciones seriadas (Vargas Gil et al., 2009) utilizando una concentración inicial de 60 g L<sup>-1</sup> y diluciones x10, x100 y x1000 sobre medio selectivo para *Trichoderma* (Williams et al., 2003). Las colonias que presentaron una morfología típica del género *Trichoderma* spp. fueron cultivadas en medio de agar con patata y dextrosa (PDA, Difco Laboratorios Inc.) con cloranfenicol (250 mg L<sup>-1</sup>).

#### Test de inhibición de crecimiento y micoparasitismo:

Todos los aislados nativos de *Trichoderma* spp. obtenidos a partir del cultivo en medio selectivo se evaluaron en condiciones *in vitro* para determinar su actividad antagonista frente a *P. cinnamomi*. Estas pruebas de antagonismo se realizaron a través de la técnica del “cultivo dual” (Rahman *et al.*, 2009). En placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo PDA se sembraron los antagonistas y el patógeno, colocando de forma enfrentada, y a una distancia de 5 cm, discos de micelio de 5 mm de diámetro que procedían de la región periférica de una colonia con crecimiento activo. El crecimiento del patógeno de forma aislada en una placa se utilizó como control. Cada enfrentamiento contó con 4 réplicas y el experimento se repitió 3 veces. Las placas se incubaron en oscuridad a 21° C durante una semana. Pasado el periodo de incubación, se midió el radio de las colonias de *P. cinnamomi* enfrentadas para calcular la tasa de inhibición (Li *et al.*, 2016). El porcentaje de la tasa de inhibición del crecimiento micelial (ICM) se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{ICM} = (\text{C}-\text{T})/\text{C} * 100$$

donde ICM es la tasa de inhibición del crecimiento micelial expresada en porcentaje, C es la medida del crecimiento del radio del patógeno en la placa control, y T es la medida del crecimiento del radio del patógeno cuando crece en presencia del antagonista (Li *et al.*, 2016).

Posteriormente se clasificaron los niveles de antagonismo en 4 clases: bajo,  $\text{ICM} \leq 50\%$ ; medio,  $50\% < \text{ICM} \leq 60\%$ ; alto,  $60\% < \text{ICM} \leq 75\%$ ; muy alto,  $\text{ICM} > 75\%$ . En el primer ensayo todas las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas se enfrentaron al aislado P90 de *P. cinnamomi*. Aquellas cepas que presentaron tasas de antagonismo altas o muy altas fueron seleccionadas para un segundo experimento. Este segundo experimento también contó con 4 repeticiones y fue realizado por triplicado.

El micoparasitismo se evaluó como el sobrecrecimiento y esporulación de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las colonias de *P. cinnamomi*, observando la zona de interacción entre el antagonista y el patógeno en las placas de enfrentamiento del segundo experimento. Las respuestas de antagonismo se clasificaron en cuatro categorías; 0: no existe invasión de la colonia del patógeno; 1: 25% de la colonia del patógeno esta invadida; 2: 50% de la colonia del patógeno esta invadida; 3: invasión total de la colonia del patógeno; 4: total invasión de la colonia del patógeno y esporulación de *Trichoderma* sp. sobre la colonia (Elías *et al.*, 1993). Se realizaron preparaciones microscópicas que fueron capturadas con un microscopio óptico (objetivo 40X, Nikon, Eclipse 50i) acoplado a una cámara (Nikon DS-Fi1).

#### Identificación molecular:

Las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en el segundo experimento de antagonismo fueron identificadas mediante la amplificación y secuenciación de fragmentos de la subunidad pequeña de la RNA polimerasa II (*rpb2*) (Liu *et al.*, 1999), y el factor de elongación de la traducción  $1\alpha$  (*EF-1\alpha*, *tef1*) (Carbone y Kohn, 1999). La identificación de los aislados de *Phytophthora* se basó en la secuenciación de las regiones 1 y 2 del espaciador transcrito interno (ITS1 e ITS2) (Cooke *et al.*, 2000). El ADN genómico se extrajo directamente de los cultivos *in vitro* usando el kit “Plant DNeasy Mini Kit” (Qiagen, Alemania). Las regiones mencionadas se amplificaron por PCR convencional y los productos de PCR se purificaron con el kit FavorPrep™ (FAVORGEN, China). El ADN fue secuenciado por secuenciación Sanger en la compañía Stab Vida (Caprica, Portugal) utilizando los mismos cebadores directos (“forward”) usados para la PCR. Los resultados de secuenciación se sometieron al análisis BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias de *Phytophthora* spp. además se analizaron en la base de datos de *Phytophthora* (<http://www.phytophthoradb.org/>).

#### Análisis estadístico:

La normalidad y homocedasticidad de las variables se comprobaron mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene. El ICM fue transformado mediante la función arcoseno debido a su naturaleza porcentual. Este tipo de variables deben ser transformadas para realizar inferencia estadística aún superando los test de normalidad (Milton y Tsokos, 1983). Los valores dasométricos de los pies elegidos se enfrentaron a los valores del resto de los pies presentes en las parcelas de estudio de forma global, mediante análisis de varianza (ANOVA), así como mediante la determinación de los rangos intercuartílicos de los valores para cada parcela y del error estándar. Para evaluar las diferencias del ICM en función de la defoliación, se procedió a realizar el test de diferencias significativas mediante análisis de varianza (ANOVA). Las hipótesis nulas se contrastaron en todos los casos para una significación estadística del 5% ( $p < 0.05$ ).

Todos los análisis se realizaron en el entorno de programación R (R Core Team, 2022), utilizando los paquetes *MVN* y *agricolae*.

#### 4. Resultados

##### Estado fitosanitario de los pies analizados:

Todos los pies, excepto el 11, presentaron diferenciales de defoliación menores que los de las parcelas en las que estaban situados. Incluso en el caso de 5 de los pies analizados, dicho incremento fue negativo (se redujo la defoliación entre las dos evaluaciones), siendo ésta mejora significativa en los pies 7 y 8, pertenecientes a la parcela 1048 de Sevilla. No se encontraron diferencias significativas en los valores dasométricos de los pies con respecto a los valores medios de las parcelas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 2).

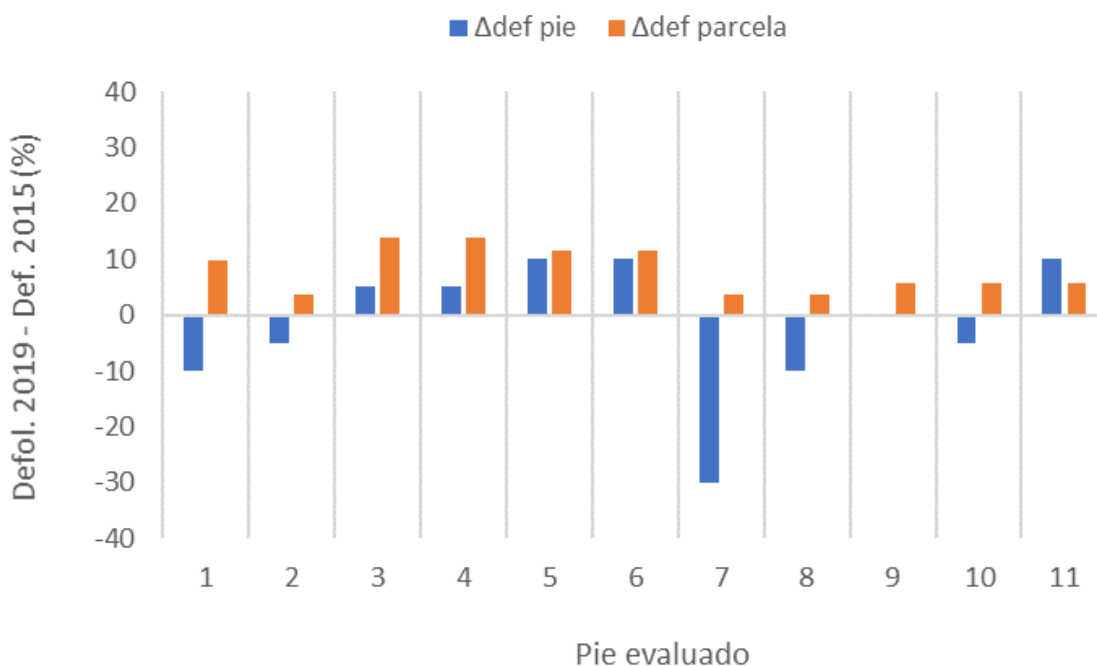


Figura 1. Diferencial de defoliación entre 2015 y 2019 para los pies evaluados, y para el conjunto de la parcela.

Tabla 2. Características dasométricas de los pies analizados y características dasométricas medias de las parcelas en las que se localizaban. Las características de las parcelas muestran valor medio  $\pm$  error estándar.

ID	Características del pie		Características de la parcela	
	H (m)	DBH (cm)	H (m)	DBH (cm)
1	4.80	24.00	6.56 $\pm$ 0.19	34.17 $\pm$ 2.03
2	7.00	29.00	6.87 $\pm$ 0.25	38.67 $\pm$ 2.17
3	12.00	53.00	9.29 $\pm$ 0.45	38.76 $\pm$ 2.23
4	8.50	28.00	9.29 $\pm$ 0.45	38.76 $\pm$ 2.23
5	5.00	32.00	5.05 $\pm$ 0.21	24.00 $\pm$ 1.91
6	5.60	28.00	5.05 $\pm$ 0.21	24.00 $\pm$ 1.91
7	8.70	49.90	6.66 $\pm$ 0.24	38.03 $\pm$ 1.49
8	7.00	39.00	6.66 $\pm$ 0.24	38.03 $\pm$ 1.49
9	11.50	42.70	9.43 $\pm$ 0.42	39.77 $\pm$ 2.34
10	10.50	39.00	9.43 $\pm$ 0.42	39.77 $\pm$ 2.34
11	10.50	46.10	9.43 $\pm$ 0.42	39.77 $\pm$ 2.34

Por otra parte, se comprobó que el mayor número de especies de *Trichoderma* spp. aisladas de las muestras de suelo se correspondía con un menor nivel de defoliación medio de la parcela ( $F=4.56$ ;  $P<0.05$ ), relación que no se había encontrado con anterioridad al realizar la misma comprobación utilizando la abundancia de los OTUs identificados como *Trichoderma* spp. (Ruiz Gómez et al., 2019) (Figura 2)

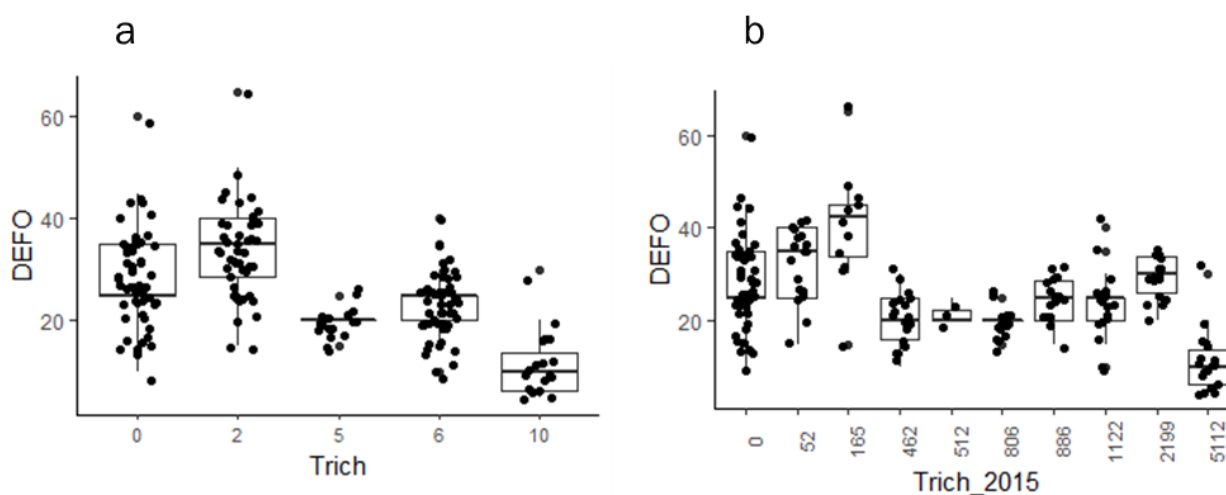


Figura 2. Relación entre la riqueza y abundancia de *Trichoderma* spp. y la defoliación de las parcelas de estudio. a: Relación entre el número de especies de *Trichoderma* spp. aislados e identificados en las parcelas y la defoliación de los pies de dicha parcela en el año 2019. b: Relación entre la abundancia relativa (frecuencia de lecturas) de los OTUs identificados como *Trichoderma* spp. y la defoliación de las parcelas en el año 2015. Las etiquetas del eje x muestran la marca de clase de la frecuencia, divididas por percentiles de casos.

#### Aislamiento e identificación de cepas:

En total se aislaron 95 morfotipos de *Trichoderma* diferentes, correspondiendo los mayores valores a los árboles 3, 4, 9 y 10. En todas las muestras de suelo se identificaron aislados de *Trichoderma* spp. La secuenciación de los morfotipos de *Trichoderma* spp. que pasaron el umbral del 60% de ICM en el test de enfrentamiento mostró que entre las 21 cepas analizadas se encontraban 10 especies diferentes (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en la rizosfera de los pies analizados, para las dos regiones cromosómicas utilizadas (TEF1 $\alpha$  y RPB2). Morfotipo: Código adjudicado a la cepa en laboratorio. Match: Identificación obtenida tras la búsqueda en la base de datos del NCBI (Porcentaje de identidad > 99%, cobertura > 98% y E-value < 10<sup>-5</sup> en todos los casos). Accession: Número de registro del NCBI de la secuencia emparejada para la identificación.

Morfotipo	TEF1 $\alpha$		RPB2	
	Match	Accession	Match	Accession
T8 #1.1	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	KU523896.1
T8 #11.1	<i>T. viridarium</i>	DQ672607.2	<i>T. viridarium</i>	KC285759.1
T8 #10.1	<i>T. hamatum</i>	KJ665514.1	<i>T. hamatum</i>	JN715601.1
T9 #2.5	<i>T. olivascens</i>	MF095876.1	<i>T. olivascens</i>	MF095876.1
T9 #5.5	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	JN133561.1
T10 #1.6	<i>T. virens</i>	KU933428.1	<i>T. virens</i>	EU341804.1
T9 #8.5	<i>T. olivascens</i>	MF095876.1		
T10 #8.6	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	JN133561.1
T10 #11.6	<i>T. paraviridescens</i>	MF095876.1	<i>T. paraviridescens</i>	KT343762.1
T10 #13	<i>T. hamatum</i>	KJ665514.1		
T11 #2.1	<i>T. linzhiense</i>	KY688048.1		
T11 #6.1	<i>T. hamatum</i>	KJ665514.1	<i>T. hamatum</i>	EU883555.1
T11 #9.1	<i>T. hirsutum</i>	KY688030.1	<i>T. hirsutum</i>	KY687972.1
T11 #11.1	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	KT028597.1
T3 #16.2	<i>T. harzianum</i>	XM_024912186.1		
T3 #18.2	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	JN133561.1
T5 #2.3	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	MF043074.1
T5 #4.3	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	JN133561.1
T11 #10.1	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	JN133561.1
T5 #7.3	<i>T. gamsii</i>	XM_024548974.1	<i>T. gamsii</i>	JN133561.1
T2 #15	<i>T. samuelsii</i>	JN715654.1	<i>T. samuelsii</i>	MH746771.1

Por otro lado, únicamente se consiguió aislar al patógeno *P. cinnamomi* de los pies 3, 4 y 7, si bien otras especies de oomicetos fueron aislados del resto de las muestras (Tabla 4).

Tabla 4. Lista de las especies identificadas en las muestras de suelo procedentes de los pies seleccionados

Cultivo	Especie	Accession (NCBI)	Phytophthora Database ID
P4 #8.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	MN755703.1	PD_00120
P8 #1	<i>Phytophthora mercuriale</i>	MK910138.1	
P2 #1	<i>Pythium mamillatum</i>	GQ410353.1	
P7 #5	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	MG696539.1	PD_02259
P7 #6	<i>Pythium vexans</i>	JQ922524.1	

#### Antagonismo y micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre *P. cinnamomi*:

Entre los 21 morfotipos incluidos en el segundo experimento, se encontraron 10 cepas con ICM  $\geq 75\%$  que presentaron niveles de micoparasitismo entre 3 y 4 (invasión total de la colonia del patógeno, sin o con esporulación sobre la misma). Cinco de ellas correspondieron a la misma especie (*Trichoderma gamsii*), siendo la especie que presentó mayor grado de inhibición *Trichoderma viridarium*, aislada en el árbol 7 (Figura 3, Tabla 5).

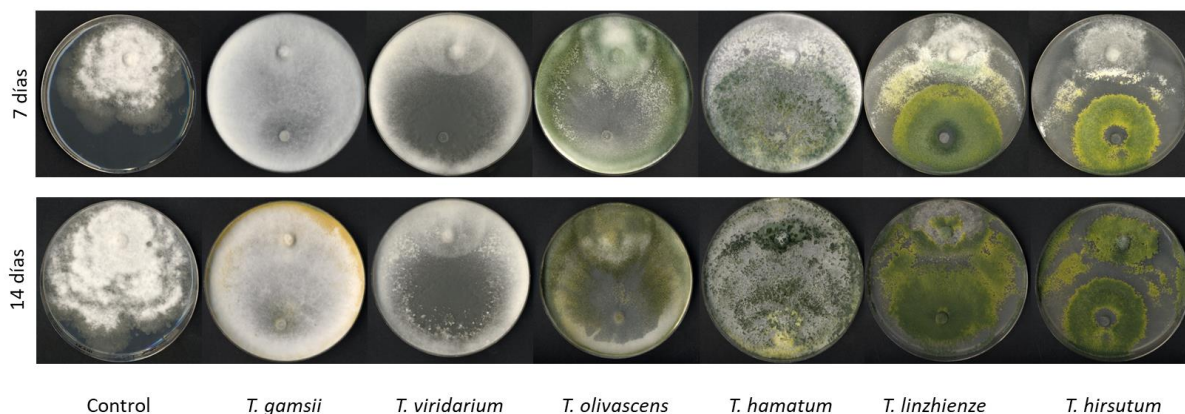


Figura 3: Enfrentamientos de las especies con mayor ICM del segundo experimento. Las placas están orientadas mostrando en la parte superior el micelio de *P. cinnamomi* y en la inferior el de la especie de *Trichoderma* spp. indicada al pie de figura. Arriba se muestran el estado del enfrentamiento después de 7 días, abajo, la misma placa después de 14 días.

Tabla 5. Morfotipos de *Trichoderma* spp. que presentaron más del 75% de ICM y valores de micoparasitismo de 3 y 4

Aislado	Especie	ICM (%)	Escala de micoparasitismo
T8 #11.1	<i>T. viridarium</i>	90,89	4
T5 #2.3	<i>T. gamsii</i>	88,36	3
T11 #10.1	<i>T. gamsii</i>	86,67	4
T5 #4.3	<i>T. gamsii</i>	85,09	4
T9 #8.5	<i>T. olivascens</i>	81,86	4
T5 #7.3	<i>T. gamsii</i>	80,36	3
T10 #13.6	<i>T. hamatum</i>	80,35	4
T9 #5.5	<i>T. gamsii</i>	77,33	4
T11 #2.1	<i>T. linzhienze</i>	76,53	4
T11 #9.1	<i>T. hirsutum</i>	75,9	4

La observación al microscopio de la zona de contacto entre patógeno y antagonista mostró crecimiento adherente y enrollamiento del micelio de *Trichoderma* sobre *P. cinnamomi*, así como vacuolización abundante del citoplasma del patógeno *P. cinnamomi*, lo cual es signo de muerte celular (Figura 4)

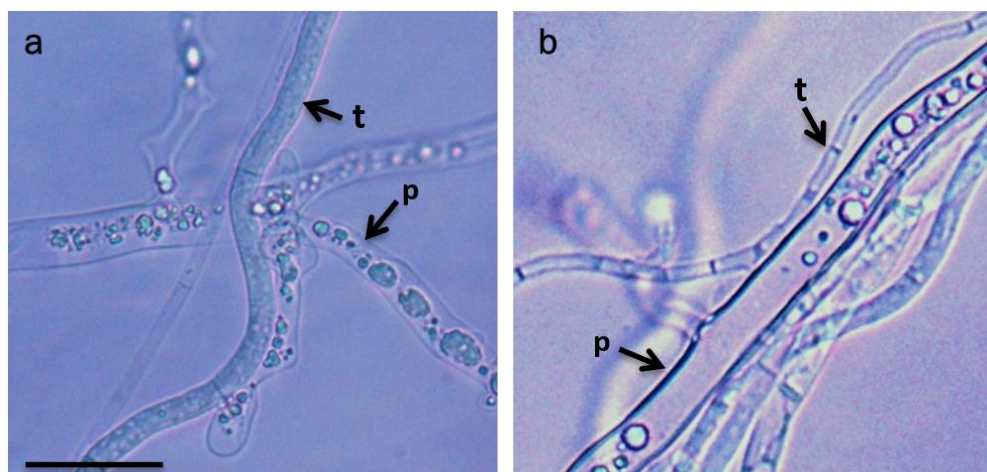


Figura 4. Detalle de la actividad micoparasítica de las cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora cinnamomi*. a: Enrollamiento hifal de *Trichoderma* (t) alrededor de una hifa de *P. cinnamomi* (p). b: Crecimiento adherente de hifas de *Trichoderma* (t) en la superficie de las hifas de *P. cinnamomi* (p). En ambas imágenes se aprecia abundante vacuolización de las hifas de *P. cinnamomi*, así como escasez de material citoplasmático vacuolado en la zona de adherencia de *Trichoderma* sobre *P. cinnamomi* (b)

## 5. Discusión

En el presente trabajo se ha caracterizado la actividad antagonista de *Trichoderma* spp ante *Phytophthora cinnamomi*, utilizando aislados nativos procedentes de dehesas afectadas por decaimiento, y concretamente de pies que estando localizados en áreas afectadas por el oomiceto, presentaron un estado fitosanitario y una evolución temporal mejor que la de los pies vecinos. Aparte de las características beneficiosas que se le otorgan a diversas especies de *Trichoderma* spp. en el ámbito agronómico como bioinoculantes y agentes de control de patógenos de suelo (Vinale *et al.*, 2008; Aleandri *et al.*, 2015), una consideración importante es el riego que puede suponer el uso de bioinoculantes para el equilibrio de los ecosistemas (Hart *et al.*, 2018). Sin embargo, el hecho de que las cepas utilizadas en este trabajo, tanto de *Trichoderma* spp. como de *P. cinnamomi* sean nativas, supone una ventaja considerable al respecto (Promwee *et al.*, 2017)

### Capacidad de inhibición y parasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *P. cinnamomi*:

Aunque todos los aislados ensayados presentaron algún porcentaje de inhibición sobre el patógeno, únicamente 10 aislados (6 especies) mostraron ICM superiores al 75% con actividad micoparasítica importante, y que podríamos señalar como potenciales organismos de biocontrol de *P. cinnamomi*. Hay que señalar que entre las especies de *Trichoderma* spp. hay algunas muy cosmopolitas, que se pueden encontrar en cualquier suelo que tenga un buen estado de diversidad y escasez de contaminantes (Vinale *et al.*, 2008). Por otro lado, entre los potenciales agentes de biocontrol identificados, se encuentran algunas especies que ya han sido anteriormente identificadas como organismos antagonistas de *P. cinnamomi*, o de otras especies patógenas del género, como *T. hamatum* (Aleandri *et al.*, 2015; Chemeltorit *et al.*, 2017) o *T. gamsii* (Chen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015), mientras que otras no han sido descritas hasta la fecha como posibles agentes de biocontrol ni han sido ensayadas como bioinoculantes, como es el caso de *T. viridarium*, *T. olivascens*, *T. linzhiense* or *T. hirsutum*. *Trichoderma olivascens* y *T. viridarium* son parte del complejo de *T. viridescens*. Otras especies pertenecientes a este complejo han mostrado actividad antagonista contra *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora capsici* (Cuervo-Parra *et al.*, 2014). *Trichoderma linzhiense* y *T. hirsutum* son especies próximas al cluster de *Harzianum*, en el cual se encuentran varias especies con actividad antifúngica probada en trabajos previos (Gu *et al.*, 2020)

El micoparasitismo es una de las propiedades del género *Trichoderma* que le confiere un elevado interés en materia de biocontrol (Benítez *et al.*, 2004; Howell, 2003). Los 10 aislados identificados como potenciales agentes de biocontrol presentaron altos índices de actividad micoparasítica *in vitro*, encontrando muestras de adherencia, enrollamiento hifal y muerte celular del patógeno en preparaciones de las 6 especies identificadas. El micoparasitismo de *T. gamsii* ha sido comprobado anteriormente frente a *P. capsici* (Cucu *et al.*, 2020), y *Phytophthora parasitica* (Osorio-Hernández *et al.*, 2016). Sin embargo, este trabajo representa la primera evidencia de micoparasitismo de *T. harzianum*, *T. viridarium*, *T. gamsii*, *T. olivascens*, *T. linzhiense* y *T. hirsutum* sobre *P. cinnamomi*.

### Relación de la presencia de *Trichoderma* spp. y el estado fitosanitario del arbolado:

Los resultados mostraron una relación entre el número de especies diferentes aisladas de una muestra y la defoliación de la parcela a la que pertenecía. Así mismo, la especie con mayor capacidad de inhibición de *P. cinnamomi* apareció en el pie que presentó mayor mejora en el estado de su copa entre los 4 años, estando localizado en una parcela con altos niveles de inóculo del patógeno. Además del beneficio que supondría la supresión del patógeno para el estado general de la planta, los hongos endófitos promueven un mejor crecimiento vegetativo a través de otros mecanismos, como la activación de mecanismos de defensa inducida en las plantas y el aumento en la tasa de

producción de raíces finas, influyendo en los procesos metabólicos de la planta y mejorando la capacidad de absorción de agua y nutrientes de la planta directa e indirectamente (Hakizimana *et al.*, 2011)

Aunque estos resultados parecen muy prometedores, no se pueden aún establecer relaciones causales entre la presencia de *Trichoderma* spp. y el estado fitosanitario del arbolado porque en el presente trabajo no se estudian los mecanismos de interacción considerando la planta y otros factores ambientales. Sin embargo, los resultados y las evidencias aportadas animan a continuar trabajando en esta línea, testando la capacidad de estas especies como agentes de biocontrol en la podredumbre de raíz causada por *P. cinnamomi*, así como su efecto en la promoción del crecimiento de la encina.

#### Metagenómica aplicada a la patología forestal:

La hipótesis principal de este trabajo partía de un análisis previo de la comunidad microbiana de suelos a través de metagenómica (Ruiz-Gómez *et al.*, 2019). Las técnicas de aislamiento clásico coincidieron con las identificaciones moleculares previas, a pesar del tiempo transcurrido, no sólo en cuanto a la presencia de oomicetos y *Trichoderma* spp., sino también en relación a su abundancia, encontrando muchos más morfotipos en las muestras de los pies que presentaron el mayor número de OTUs pertenecientes a *Trichoderma* spp. y la mayor frecuencia relativa de lecturas de éstos OTUs. En ocasiones, como es el caso del género *Trichoderma* spp., los cebadores que se utilizan para este tipo de ensayos de metabarcoding amplifican regiones demasiado conservadas de éste género, impidiendo su identificación precisa a nivel de especie. Sin embargo, en nuestro caso esto no fue un impedimento para encontrar una relación que ha conducido a la identificación de potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre de raíz causada por *P. cinnamomi*, lo que supone un ejemplo claro de aplicación práctica de éstas técnicas de análisis para el manejo de enfermedades forestales en campo.

## 6. Conclusiones

Este trabajo muestra la capacidad antagonista *in vitro* sobre *P. cinnamomi* de especies del género *Trichoderma* spp. aisladas en zonas afectadas por podredumbre de raíz, en la rizosfera de pies que se mantenían en buen estado fitosanitario. Las evidencias de estos resultados, junto con las de trabajos previos (Ruiz Gómez *et al.*, 2019), nos permiten establecer como hipótesis que estas especies ejercen un cierto control o supresión del patógeno en estos pies, mejorando el estado fitosanitario de esos árboles frente a pies vecinos. Sin embargo, se debe continuar investigando sobre los mecanismos específicos de interacción entre estas especies y la encina, y testar su actividad como agente de biocontrol en condiciones naturales, antes de confirmar dicha hipótesis. En cualquier caso, los resultados ofrecen nuevas expectativas en el control de un síndrome que lleva 20 años asolando las dehesas del suroeste de la Península Ibérica.

Por otro lado, nuestros resultados confirman la validez de las técnicas de metagenómica como herramienta para caracterizar las comunidades microbianas a escala regional, mostrando un ejemplo de aplicación directa de las mismas a la posible resolución de un problema concreto. Además, la unión de las técnicas clásicas de aislamiento y las técnicas más avanzadas de identificación de especies a través del análisis molecular de fragmentos de ADN nos ha permitido establecer la primera colección de potenciales agentes de biocontrol nativos de las dehesas andaluzas, lo que representa un paso importante en el desarrollo de capacidades de elaboración de bioinoculantes hechos a medida para cada caso, más efectivos y con menos riesgos ambientales.

## 7. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo institucional del campus de Excelencia en Agroalimentación CeIA3 y a la Universidad de Córdoba, a través del soporte del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI). También queremos agradecer el apoyo de la Red de Equilibrios Biológicos (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía) por el aporte de información y la ayuda prestada durante la caracterización y la colecta de campo, especialmente a Ángel Carrasco Gotarredona, Sisto Rodríguez Reviriego y José Manuel Ruiz Navarro. Esta investigación se ha llevado a cabo con el apoyo económico de los proyectos ESPECTRAMED (CGL2017-86161-R) y ENCINOMICA2 (PID2019-10908RB-100). F.J.R.G. es beneficiario de una ayuda post-doctoral de la Junta de Andalucía y el Fondo Social Europeo, programa 2014-2020 (Ref. DOC\_055).

## 8. Bibliografía

ALEANDRI, M.P.; CHILOSI, G.; BRUNI, N.; TOMASSINI, A.; VETTRAINO, A.M.; VANNINI, A.; 2015. Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection*, 67: 269-278.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C.; 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7(4): 249-260.

BRASIER, C.M.; ROBREDO, F.; FERRAZ, J.F.P.; 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, 42(1): 140-145.

BURGESS, T.I.; SCOTT, J.K.; MCDUGALL, K.L.; STUKELY, M.J.C.; CRANE, C.; DUNSTAN, W.A.; BRIGG, F.; ANDJIC, V.; WHITE, D.; RUDMAN, T.; ARENTZ, F.; OTA, N.; HARDY, G.E.St.J.; 2017. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Global Change Biology*, 23(4): 1661-1674.

CARBONE, I.; KOHN, L.M.; 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553-556.

CHEMELTORIT, P.P.; MUTAQIN, K.H.; WIDODO, W.; 2017. Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. *European Journal of Plant Pathology*, 147(1): 157-166.

CHEN, J.-L.; SUN, S.-Z.; MIAO, C.-P.; WU, K.; CHEN, Y.-W.; XU, L.-H.; GUAN, H.-L.; ZHAO, L.-X.; 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(4): 315-324.

COOKE, D.E.L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G.; BRASIER, C.M.; 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1): 17-32.

CUCU, M.A.; GILARDI, G.; PUGLIESE, M.; FERROCINO, I.; GULLINO, M.L.; 2020. Effects of biocontrol agents and compost against the *Phytophthora capsici* of zucchini and their impact on the rhizosphere microbiota, *Applied Soil Ecology*, 154: 103659.

CUERVO-PARRA, J.A.; SÁNCHEZ LÓPEZ, V.; ROMERO-CORTES, T.; RAMÍREZ-LEPE, M.; 2014. *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*, *African Journal of Microbiology Research*, 8(16): 1704-1712.

DELGADO-BAQUERIZO, M.; REICH, P.B.; TRIVEDI, C.; ELDRIDGE, D.J.; ABADES, S.; ALFARO, F.D.; BASTIDA, F.; BERHE, A.A.; CUTLER, N.A.; GALLARDO, A.; GARCÍA-VELÁZQUEZ, L.; HART, S.C.; HAYES, P.E.; HE, J.-Z.; HSEU, Z.-Y.; HU, H.-W.; KIRCHMAIR, M.; NEUHAUSER, S.; PÉREZ, C.A.; REED, S.C.; SANTOS, F.; SULLIVAN, B.W.; TRIVEDI, P.; WANG, J.-T.; WEBER-GRULLON, L.; WILLIAMS, M.A.; SINGH, B.K.; 2020. Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes, *Nature Ecology & Evolution*, 4(2): 210-220.

DÍAZ ESTEBAN, M.; PULIDO DÍAZ, F.; 2009. 6310: Dehesas perennifolias de *Quercus* spp", Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. pp 69. Madrid.

EICHHORN, J.; ROSKAMS, P.; POTOČIĆ, N.; TIMMERMANN, V.; FERRETTI, M.; MUES, V.; SZEPESI, A.; DURRANT, D.; SELETKOVIĆ, I.; SCHROECK, H.-W.; NEVALNIEN, S.; FILIPPO BUSSOTTI; GARCÍA, P.; WULFF, S.; 2017. Part IV: Visual assessment of crown condition and damaging agents. En: ICP Forest. (ed.). UNECE ICP Forests Programme Co-ordinating Centre. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. pp. 54. Thünen Institute of Forest Ecosystems. Eberswalde.

ELÍAS, R.; ARCOS, O.; ARBELÁEZ, G.; 1993. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Colombiana*. 10(1): 52-61.

GU, X.; WANG, R.; SUN, Q.; WU, B.; SUN, J.-Z.; 2020. Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China, *MycKeys*. 73: 109-132.

HAKIZIMANA, J.D.; GRYZENHOUT, M.; COUTINHO, T.A.; VAN DEN BERG, N.; 2011. Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. En: Global Avocado Congress (ed.). Proceedings VII World Avocado Congress. pp. 1-10. Cairns.

HART, M.M.; ANTUNES, P.M.; CHAUDHARY, V.B.; ABBOTT, L.K.; 2018. Fungal inoculants in the field: Is the reward greater than the risk?. *Functional Ecology*, 32(1): 126-135.

HOWELL, C.R.; 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1): 4-10.

JEFFERS, S.N.; MARTIN, S.B.; 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*. 70(11): 1038-1043.

LI, Y.; SUN, R.; YU, J.; SARAVANAKUMAR, K.; CHEN, J.; 2016. Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Microbiology*. 56(3): 318-327.

LIU, Y.J.; WHELEN, S.; HALL, B.D.; 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit., *Molecular Biology and Evolution*. 16(12): 1799-1808.

MILTON, J.S.; TSOKOS, J.O.; 1983. *Statistical Methods in the Biological and Health Sciences*. Ed. McGraw-Hill, pp. 600. New York.

MORENO, G.; PULIDO, F.J.; 2008. The functioning, management and persistence of dehesas, En: RIGUEIRO-RODRIGUEZ, A.; MCADAM, J.; MOSQUERA-LOSADA, M.R.; *Agroforestry in Europe*. pp. 127-160. Springer Netherlands, Dordrecht.

NAVARRO-CERRILLO, R.M.; VARO-MARTÍNEZ, M.Á.; ACOSTA, C.; PALACIOS RODRIGUEZ, G.; SÁNCHEZ-CUESTA, R.; RUIZ GÓMEZ, F.J.; 2019. Integration of WorldView-2 and airborne laser scanning data to classify defoliation levels in *Quercus ilex* L. dehesas affected by root rot mortality: management implications, *Forest Ecology and Management*. 451: 117564.

OSORIO-HERNÁNDEZ, E.; HERNÁNDEZ-MORALES, J.; CONDE-MARTINEZ, V.; MICHEL-ACEVES, A.; LOPEZ-SANTILLAN, J.; TORRES-CASTILLO, J.; 2016. In vitro activities of *Trichoderma* species against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. *African Journal of Microbiology Research*, 10(15): 521-527.

PÉREZ-DE-LUQUE, A.; TILLE, S.; JOHNSON, I.; PASCUAL-PARDO, D.; TON, J.; CAMERON, D.D.; 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens, *Scientific Reports*, 7(1): 16409.

PROMWEE, A.; YENJIT, P.; ISSARAKRAISILA, M.; INTANA, W.; CHAMSWARNG, C.; 2017. Efficacy of indigenous *Trichoderma harzianum* in controlling *Phytophthora* leaf fall (*Phytophthora palmivora*) in Thai rubber trees. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(1): 41-50.

R CORE TEAM; 2022. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., (Versión 4.0.2). Disponible en: <https://www.r-project.org/>

RAHMAN, M.A.; BEGUM, M.F.; ALAM, M.F.; 2009. Screening of *Trichoderma* Isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. *Mycobiology*, 37(4): 277-285.

RUIZ GÓMEZ, F.J.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; PÉREZ-DE-LUQUE, A.; OBWALD, W.; VANNINI, A.; MORALES-RODRÍGUEZ, C.; 2019. Assessment of functional and structural changes of soil fungal and oomycete communities in holm oak declined dehesas through metabarcoding analysis, *Scientific Reports*, 9(1): 5315.

RUIZ GÓMEZ, F.J.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; SÁNCHEZ-CUESTA, R.; PÉREZ-DE-LUQUE, A.; 2015. Histopathology of infection and colonization of *Quercus ilex* fine roots by *Phytophthora cinnamomi*, *Plant Pathology*, 64(3): 605-616.

- RUIZ-GÓMEZ, F.J.; PÉREZ-DE-LUQUE, A.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; 2019. The involvement of *Phytophthora* root rot and drought stress in holm oak decline: from ecophysiology to microbiome influence. *Current Forestry Reports*, 5(4): 251-266.
- SÁNCHEZ, M.; CAETANO, P.; FERRAZ, J.; TRAPERO, A.; 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*, 32: 5-18.
- SÁNCHEZ-CUESTA, R.; RUIZ-GÓMEZ, F.J.; DUQUE-LAZO, J.; GONZÁLEZ-MORENO, P.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; 2021. The environmental drivers influencing spatio-temporal dynamics of oak defoliation and mortality in dehesas of Southern Spain, *Forest Ecology and Management*, 485: 118946.
- TAMAYO-VÉLEZ, Á.; OSORIO, N.W.; 2018. Soil fertility improvement by litter decomposition and inoculation with the fungus *Mortierella* sp. in avocado plantations of Colombia, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(2): 139-147.
- VARGAS GIL, S.; PASTOR, S.; MARCH, G.J.; 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Glucadium* spp. and actinomycetes from soil with culture media, *Microbiological Research*, 164(2): 196-205.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M.; 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions, *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1): 1-10.
- WIDMER, T.L.; 2014. Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil, *Biological Control*, 79: 43-48.
- WILLIAMS, J.; CLARKSON, J.M.; MILLS, P.R.; COOPER, R.M.; 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 4190-4191.
- ZAMORA ROJAS, E.; ANDICOBERRY DE LOS REYES, S.; SÁNCHEZ CLEMENTE, M.E.; 2014. Anexo a.1. IV El decaimiento y la podredumbre radical en las dehesas andaluzas. En: Ecosistemas de dehesa: desarrollo de políticas y herramientas para la gestión y conservación de la biodiversidad (Life Biodehesa Project), Ed. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del territorio, Sevilla (Spain), Disponible en: <http://www.biodehesa.es/>
- ZHANG, X.; HARVEY, P.R.; STUMMER, B.E.; WARREN, R.A.; ZHANG, G.; GUO, K.; LI, J.; YANG, H.; 2015. Antibiosis functions during interactions of *Trichoderma afroharzianum* and *Trichoderma gamsii* with plant pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*, *Functional & Integrative Genomics*, 15(5): 599-610.