

Daniel Sánchez

Bioprotección y bioestimulación en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) mediante inoculación con *Trichoderma* spp.

2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

Bioprotección y bioestimulación en plantas de
tomate (*Solanum lycopersicum*) mediante
inoculación con *Trichoderma* spp.

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

DANIEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

ENERO, 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Bioprotección y bioestimulación en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) mediante inoculación con *Trichoderma* spp.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Daniel Sánchez Hernández

Dirigido por:

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

SINODALES

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Presidente

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Secretario

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal

Firma

Dr. Humberto Suzán Azpiri

Sinodal

Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Sinodal

Firma

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca otorgado durante el posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que a través de la Facultad de Ciencias Naturales me recibió y contribuyó en este proyecto de investigación y formación profesional.

A mi director de tesis, el Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, por la confianza que me otorgó al recibirme en su equipo de trabajo, por compartir su conocimiento sin reservas, por contribuir a mi formación profesional y apoyarme en todo momento. ¡Por su amistad, gracias!

Al Dr. Juan Ramón Pacheco Aguilar, por la disposición para formar parte de mi comité tutorial, por el importante apoyo y valiosa asesoría durante la realización de este proyecto.

Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez, al Dr. Humberto Suzán Azpiri y al Dr. Fidel Landeros Jaime, por su valiosa disponibilidad y constituir parte de mi comité tutorial, por su eficacia al asesorarme y contestar amablemente a todas mis consultas, gracias por sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez, por recibirme tan amablemente en su laboratorio durante mi estancia de investigación en el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), y por brindarme todo el apoyo necesario para realizar el trabajo de microscopía del presente trabajo.

Al Dr. Diego Luis Delgado Álvarez, por su importante apoyo e instrucción en microscopía durante la estancia de investigación en el CICESE.

Al Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO), de Campus Aeropuerto, UAQ, por brindarme los medios necesarios para realizar mi proyecto de investigación.

Al “*Trichoderma Team*”, Salvador, Victor, Gaby, Cecy, Juanita, Lupita, Jairo, gracias por su grata compañía, amistad y ayuda brindada durante mi proceso de formación.

A Juanita Esquivel y Andrea Rodríguez, mis apreciadas auxiliares de laboratorio, gracias por su apoyo y disponibilidad para la realización de experimentos que implicaron muchas horas de trabajo en el laboratorio.

Al técnico Evelia J. F. Reséndiz, por su apoyo e instrucción en el laboratorio.

A mi padre, Renato Sánchez Ramírez, por la instrucción filosófica y científica. A mi madre Elvira Hernández Ayala, por la crianza y educación impecable que me has brindado. A ambos, por su apoyo permanente y sin condiciones, por su amor, ¡gracias!

A mis hermanos, Alejandra, Pedro, Renato y Teresita, por su apoyo total cuando les necesito.

RESUMEN

El uso intensivo de plaguicidas tóxicos para el control de plagas y enfermedades en la agricultura tiene un elevado costo social y medioambiental, afectando los ecosistemas y la salud humana. Una alternativa de reemplazo son los productos con microorganismos benéficos, particularmente los desarrollados a base del hongo *Trichoderma* que pueden sustituir fungicidas químicos. *Trichoderma* posee diversos mecanismos por los cuales puede afectar a la mayoría de los hongos fitopatógenos, además promueve el crecimiento vegetal. En este trabajo, se evaluó la capacidad antagónica de 65 cepas de *Trichoderma* contra siete fitopatógenos de tomate (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*), por la vía del micoparasitismo, compuestos volátiles y metabolitos difusibles, además se estudió por microscopía confocal la interacción de *Trichoderma-gfp* contra el fitopatógeno *R. solani*. Por otro lado, se evaluó la capacidad de solubilizar fosfatos tricálcicos, producción de sideróforos y ácido indol acético, mediante pruebas bioquímicas y métodos colorimétricos, para evaluar el efecto de las sustancias producidas se realizó un experimento de inoculación de *Trichoderma* spp. en semillas de tomate. Los experimentos de antagonismo demostraron que algunas cepas de *Trichoderma* poseen amplio espectro de biocontrol sobre los siete hongos fitopatógenos y otras tienen especificidad para afectar a un patógeno en particular y por un mecanismo de acción individual. El estudio de microscopía demostró el efecto antagónico de *Trichoderma* contra *R. solani*, observando evidentes daños celulares en el hongo fitopatógeno. También mostraron capacidad de solubilizar fosfatos tricálcicos, producir compuestos sideróforos y sustancias promotoras de crecimiento vegetal como el ácido indol acético y se corroboró el efecto bioestimulador de crecimiento vegetal en plántulas de tomate en condiciones de invernadero.

Palabras clave: *Trichoderma*, control biológico, bioestimulación, antagonismo.

ABSTRACT

The intensive use of toxic pesticides to control pests and diseases in agriculture has a high environmental and social cost, affecting ecosystems and human health. A replacement alternative are products with beneficial microorganisms, particularly as those developed based on the *Trichoderma* fungus that can substitute chemical fungicides.

Trichoderma has various mechanisms by which it can affect most phytopathogenic fungi, it also promotes plant growth. In this work, the antagonistic capacity of 65 *Trichoderma* strains against seven tomato phytopathogens (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*), was evaluated via mycoparasitism, volatile compounds metabolites and diffusible metabolites, the interaction of *Trichoderma-gfp* against the *R. solani* phytopathogen was also studied by confocal microscopy. On the other hand, the ability to solubilize tricalcium phosphates, production of siderophores and indole acetic acid were evaluated, through biochemical tests and colorimetric methods, to evaluate the effect of the substances produced, an inoculation experiment of *Trichoderma* spp. in tomato seeds. The antagonism experiments showed that some *Trichoderma* strains possess a broad spectrum of biocontrol over the seven phytopathogenic fungi and others have specificity to affect a particular pathogen and for an individual mechanism of action. The microscopy study demonstrated the antagonistic effect of *Trichoderma* against *R. solani*, observing evident cellular damage in the phytopathogenic fungus. Also, the ability to solubilize tricalcium phosphates, produce siderophore compounds and plant growth promoting substances such as indole acetic acid and the biostimulatory effect of plant growth in tomato seedlings under greenhouse conditions was confirmed.

Keywords: *Trichoderma*, biological control, biostimulation, antagonism.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Taxonomía	2
2.1.1 Clasificación.....	2
2.1.2 Características macroscópicas	2
2.1.3 Características microscópicas	3
2.2 Hábitat y distribución.....	3
2.3 Condiciones de crecimiento.....	5
2.4 Control biológico.....	5
2.4.1 <i>Trichoderma</i> en el control biológico	5
2.4.2 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> involucrados en el control biológico.....	6
2.4.2.1 Micoparasitismo.....	6
2.4.2.2 Compuestos volátiles.....	7
2.4.2.3 Antibiosis	8
2.4.2.4 Competencia por nutrientes	9
2.4.2.5 Resistencia sistémica inducida.....	9
2.5 Hongos que controla	10
2.6 <i>Trichoderma</i> en la promoción del crecimiento vegetal.....	11
2.6.2 Solubilización de fosfatos.....	11
2.6.3 Producción de sideróforos	12
2.6.4 Producción de ácido indol acético.....	12
2.7 Importancia económica del cultivo de tomate.....	13

2.8 Requerimientos nutrimentales del cultivo de tomate	13
2.9 Enfermedades fúngicas más comunes que afectan al tomate.....	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general:	17
5.2 Objetivos específicos:	17
VI. METODOLOGÍA	18
6.1 Material biológico utilizado y condiciones de cultivo	18
6.1.1 Cepas de <i>Trichoderma</i>	18
6.1.2 Cepas de hongos fitopatógenos	21
6.1.3 Planta como modelo de estudio	21
6.2 Efecto antagonico sobre hongos fitopatógenos	21
6.2.1 Antagonismo <i>in vitro</i> por micoparasitismo	21
6.2.2 Antagonismo <i>in vitro</i> por compuestos volátiles	23
6.2.3 Antagonismo <i>in vitro</i> por metabolitos difusibles.....	24
6.3 Actividad solubilizadora de nutrientes	26
6.3.1 Producción, colecta y cuantificación de conidios.....	26
6.3.2 Solubilización de fosfato tricálcico en medio líquido.....	26
6.3.3 Producción de sideróforos por <i>Trichoderma</i> spp.....	29
6.4 Producción de ácido indol acético por <i>Trichoderma</i> spp.....	33
6.5 Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. en plántulas de tomate en condiciones de invernadero.....	35
6.6 Interacción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma-gfp</i> vs <i>R. solani</i>	36

6.6.1 Pruebas de concentración mínima inhibitoria	37
6.6.2 Producción de protoplastos de cepas sensibles.....	37
6.6.3 Transformación de las cepas de <i>Trichoderma</i> con <i>gfp</i>	38
6.7 Descripción de los plásmidos empleados en la transformación	40
6.7.1 Purificación de los plásmidos pPK2-NTC, pPK2-Bar-eGFP, pCB1004 y pUE10: <i>gfp</i>	40
6.7.2 Identificación de cepas transformadas y etiquetadas con <i>gfp</i>	41
6.7.3 Análisis microscópico de la interacción <i>Trichoderma</i> -patógeno	45
VII. RESULTADOS	46
7.1 Efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos	46
7.1.1 Antagonismo <i>in vitro</i> por micoparasitismo.....	46
7.1.2 Antagonismo <i>in vitro</i> por compuestos volátiles	49
7.1.3 Antagonismo <i>in vitro</i> por metabolitos difusibles.....	65
7.2 Actividad solubilizadora de nutrientes.....	81
7.2.1 Solubilización de fosfato tricálcico en medio líquido.....	81
7.2.2 Producción de sideróforos en medio CAS sólido y líquido	82
7.3 Producción de ácido indol acético por <i>Trichoderma</i> spp.....	85
7.4 Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. en plántulas de tomate en condiciones de invernadero.....	87
7.6 Interacción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma-gfp</i> vs <i>R. solani</i>	91
7.6.1 Pruebas de concentración mínima inhibitoria	91
7.6.2 Comprobación de los plásmidos pPK2-NTC y pPK2-Bar-eGFP por electroforesis en gel.....	91
7.6.3 Transformación de las cepas silvestres seleccionadas con los plásmidos pCB1004, pUE10 H1: <i>gfp</i> , pPK2-NTC y pPK2-Bar-eGFP.....	92

7.6.4 Comprobación de la cepa transformada NI-1 <i>T. asperellum</i> pUE10 H1: <i>gfp</i> mediante microscopia confocal.....	94
7.6.5 Análisis microscópico de la interacción <i>Trichoderma</i> vs <i>R. solani</i>	97
VIII. DISCUSIÓN	100
8.1 Efecto antagónico de 65 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre siete hongos fitopatógenos.....	100
8.1.1 Antagonismo <i>in vitro</i> por micoparasitismo	100
8.1.2 Antagonismo <i>in vitro</i> por compuestos volátiles	102
8.1.3 Antagonismo <i>in vitro</i> por metabolitos difusibles	105
8.2 Actividad solubilizadora de nutrientes.....	107
8.2.1 Solubilización de fosfato tricálcico en medio líquido.....	107
8.2.2 Producción de sideróforos en medio CAS sólido y líquido	108
8.3 Producción de ácido indol acético	110
8.4 Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. en plántulas de tomate en condiciones de invernadero.....	111
8.5. Interacción <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma-gfp</i> vs <i>R. solani</i>	115
8.5.1 Pruebas de concentración mínima inhibitoria	115
8.5.2 Producción de protoplastos y transformación de cepas silvestres	116
8.5.3 Análisis microscópico de la interacción <i>Trichoderma</i> vs <i>R. solani</i>	117
IX. CONCLUSIONES	120
X. PERSPECTIVAS	121
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	122
ANEXOS.....	148

Anexo 1. Prueba de micoparasitismo por cepas de <i>Trichoderma</i> contra siete fitopatógenos de tomate reportadas en el resumen de la tabla 19.....	148
Anexo 2. Prueba de efecto de compuestos volátiles de cepas de <i>Trichoderma</i> sobre siete fitopatógenos de tomate reportadas en el resumen de la tabla 19.	150
Anexo 3. Efecto de cepas <i>Trichoderma</i> sobre siete hongos fitopatógenos de tomate por metabolitos difusibles reportadas en la tabla 19.....	152
Anexo 4. Producción de sideróforos por 50 cepas de <i>Trichoderma</i> en medio CAS-agar.....	154
Anexo 5. Concentración mínima inhibitoria, higromicina-b, glufosinato de amonio y nourseotricina para 17 cepas de <i>Trichoderma</i>	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reportes de hongos fitopatógenos antagonizados por <i>Trichoderma</i> spp.	10
Tabla 2. Reportes de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en cultivo de jitomate en México.	14
Tabla 3. Lista de cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas en el presente trabajo.....	¡Error!
Marcador no definido. -20	
Tabla 4. Escala de Bell.....	22
Tabla 5. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. alternata</i>	50
Tabla 6. Efecto de compuestos volátiles liberados por cepas las de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	52
Tabla 7. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i>	54
Tabla 8. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	56
Tabla 9. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>P. capsici</i>	58
Tabla 10. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>R. solani</i>	60
Tabla 11. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>S. rolfsii</i>	62
Tabla 12. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. alternata</i>	66
Tabla 13. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	68
Tabla 14. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i>	70
Tabla 15. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i>	

sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	72
Tabla 16. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>P. capsici</i>	74
Tabla 17. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>R. solani</i>	76
Tabla 18. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>S. rolfsii</i>	78
Tabla 19. Resumen de las cepas de <i>Trichoderma</i> con mayor actividad antagónica.	81
Tabla 20. Solubilización de fósforo por cepas de <i>Trichoderma</i> en medio de cultivo líquido a las 72 h.....	83
Tabla 21. Producción de sideróforos en medio sólido CAS-agar.....	84
Tabla 22. Producción de sideróforos en medio líquido por cepas de <i>Trichoderma</i>	85
Tabla 23. Producción de ácido indol acético por cepas de <i>Trichoderma</i>	86
Tabla 24. Concentración mínima inhibitoria de higromicina B, glufosinato de amonio, y nourseotricina para 18 cepas de <i>Trichoderma</i>	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cepa de <i>Trichoderma</i> sp., creciendo en medio de cultivo sólido PDA.....	2
Figura 2. Conidióforo de <i>Trichoderma</i> sp. vista al microscopio compuesto, objetivo de 40 X.....	3
Figura 3. Mapa del plásmido pPK2-NTC.....	42
Figura 4. Mapa del plásmido pPK2-Bar-eGFP.....	42
Figura 5. Mapa del plásmido pUE10-H1: <i>gfp</i>	43
Figura 6. Mapa del plásmido pcB1004.....	43
Figura 7. Porcentaje de cepas de <i>Trichoderma</i> clasificadas por su actividad micoparasítica contra siete hongos fitopatógenos.....	47
Figura 8. Cepas de <i>Trichoderma</i> presentes como excelentes micoparasíticas para siete fitopatógenos	48
Figura 9. Diámetro del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp.....	51
Figura 10. Diámetro del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp.....	53
Figura 11. Diámetro del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp.....	55
Figura 12. Diámetro del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp.....	57
Figura 13. Diámetro del crecimiento micelial de <i>P. capsici</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp	59

Figura 14. Diámetro del crecimiento micelial de <i>R. solani</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
Figura 15. Diámetro del crecimiento micelial de <i>S. rolfsii</i> al ser expuesto a los compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp	63
Figura 16. Cepas de <i>Trichoderma</i> con capacidad de inhibir el crecimiento de cinco fitopatógenos por efecto de compuestos volátiles.....	64
Figura 17. Diámetro del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> al estar en contacto a los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	67
Figura 18. Diámetro del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> al estar en contacto con los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	69
Figura 19. Diámetro del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> al estar en contacto con los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	71
Figura 20. Diámetro del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> al estar en contacto con los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	73
Figura 21. Diámetro del crecimiento micelial de <i>P. capsici</i> al estar en contacto con los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	75
Figura 22. Diámetro del crecimiento micelial de <i>R. solani</i> al estar en contacto con los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	77
Figura 23. Diámetro del crecimiento micelial de <i>S. rolfsii</i> al estar en contacto con los metabolitos difusibles de <i>Trichoderma</i> spp	79
Figura 24. Cepas de <i>Trichoderma</i> presentes como antagónicas para los siete fitopatógenos por metabolitos difusibles	80
Figura 25. Cepas de <i>Trichoderma</i> promotoras de altura de plántulas de tomate.....	88

Figura 26. Cepas de <i>Trichoderma</i> promotoras del desarrollo de la raíz de tomate.....	89
Figura 27. Cepas de <i>Trichoderma</i> promotoras de crecimiento de la parte aérea de la planta.....	90
Figura 28. Análisis de restricción de los plásmidos pPK2-NTC y pPK2-Bar-eGFP.....	92
Figura 29. Fotografías de la transformación de NI-1 <i>T. asperellum</i> con los plásmidos pCB1004, pPK2-NTC y pUE10-H1- <i>gfp</i>	95
Figura 30. Hifa de NI-1, expresando la proteína verde fluorescente acoplada a la histona H1.....	95
Figura 31. Segmento de una hifa en 3D, vista al microscopio confocal	96
Figura 32. Interacción de <i>T. asperellum</i> H1: <i>gfp</i> vs <i>R. solani</i>	98
Figura 33. Intereacción de <i>T. atroviride</i> H1: <i>gfp</i> vs <i>R. solani</i>	99

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente en la agricultura se emplean productos de origen químico para el control de plagas y enfermedades, así como fertilizantes sintéticos para la nutrición de los cultivos. Por un lado, éstas prácticas son claves para cosechar con éxito los productos vegetales y, por otro lado, se han demostrado consecuencias negativas que afectan principalmente la salud humana y a los ecosistemas.

Como una alternativa para el control químico, se comercializan y aplican productos a base del hongo del género *Trichoderma*, porque diversos estudios han demostrado que dicho hongo posee distintos mecanismos que controlan y/o suprimen a organismos causantes de enfermedades en plantas. Entre esos mecanismos, los más explorados son el micoparasitismo, la antibiosis y la inducción de sistemas de defensa sistémicos (Chet *et al.* 1998; Hjeljord y Tronsmo, 1998). Existe una gran cantidad de estudios acerca de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre otros hongos, mientras que su empleo como mejoradores de la nutrición vegetal (biofertilizantes), no se ha explorado extensa y detalladamente (Altomar, 2011).

Los productos biotecnológicos de uso agrícola a base de *Trichoderma* spp, representan una alternativa de reemplazo para los de origen sintético, que mediante su incorporación permiten desarrollar una producción agrícola menos dañina. Para la formulación adecuada de estos productos, se deben considerar aspectos específicos sobre la biología del microorganismo a emplear, validando y conociendo sus interacciones planta-*Trichoderma*-patógeno, se asegura en mayor medida el desarrollo y eficiencia de los inoculantes. El presente trabajo pretende validar la efectividad biológica de las cepas de *Trichoderma* que se tiene en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro, de tal manera que se localicen y seleccionen las cepas promisorias para su manejo a nivel industrial y/o comercial.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Taxonomía

2.1.1 Clasificación

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Person (1794) y la clasificación actual del género *Trichoderma* es: Reino: Fungi, Superdivisión: Dikarya, División: Ascomycota, Subdivisión: Pezizomycotina, Clase: Sordariomycetes, Subclase: Hypocreomycetidae, Orden: Hypocreales, Familia: Hypocreaceae, Género: *Trichoderma*. Actualmente (diciembre de 2020) se tienen 442 registros de especies en la base de datos Mycobank (2020).

2.1.2 Características macroscópicas

Las colonias de *Trichoderma* en medio de cultivo, presentan un crecimiento rápido formando una capa delgada de micelio sobre la superficie del agar, el micelio es por lo general de color blanco y fino, conforme madura se presentan penachos blancos y algodonosos de micelio formando una red densa, posteriormente se producen esporas en su mayoría de color verde olivo (Barnett y Hunter, 1982).



Figura 1. Cepa de *Trichoderma* sp., creciendo en medio de cultivo sólido PDA. Se aprecia la pigmentación verde olivo debido a la abundante esporulación.

2.1.3 Características microscópicas

Las características microscópicas por las cuales se puede identificar las especies del género *Trichoderma*, es que presenta conidióforos hialinos muy ramificados en forma piramidal o cónica dando origen a esterigmas con extremos haurados, las fiálides son más estrechas en la base que en la parte superior, simples o en grupos, no verticilados, las esporas que emergen de las fiálides, son unicelulares, ovoides y de color verde en la mayoría de especies, sin embargo, escasamente se llegan a presentar especies con formación de esporas hialinas (Barnett y Hunter, 1982).

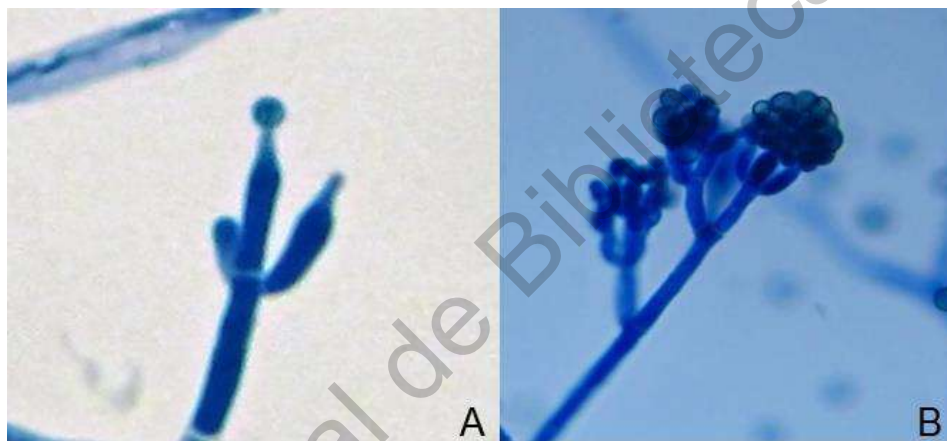


Figura 2. Conidióforo de *Trichoderma* sp. vista al microscopio compuesto, objetivo de 40 X. A) Conidióforo en formación, fiálides con extremos ahusados y en producción de una conidiospora; B) Conidióforo desarrollado, ramificado y con esporas agrupadas en la parte terminal de las fiálides.

2.2 Hábitat y distribución

El género *Trichoderma* está compuesto por un grupo de hongos micromicetos que se encuentran presentes en diversos tipos de suelo, principalmente aquellos con abundancia de materia orgánica y con alta densidad de raíces de plantas. *Trichoderma* se puede encontrar en diferentes nichos ecológicos, se puede hallar además asociado a la superficie de plantas y cortezas de madera en descomposición (Harman, 1990).

De acuerdo a lo señalado por Samuels (2006), se han colectado especies de *Trichoderma* en todas las latitudes, sin embargo, *T. polysporum* y *T. minutisporum* están restringidas a zonas frías (5.6 a 13.1 °C), por otro lado *T. viride* es poco frecuente en este tipo de zonas, lo mismo se puede decir de las especies *T. aeuroviridae*, la cual se reporta limitada al Reino Unido y al norte de Europa (Lieckfeldt *et al.* 2001). La especie *T. reesei* ha sido aislada de las Islas Salomón del Pacífico (Kuhls *et al.* 1996) y está limitada a una banda ecuatorial estrecha, también ha sido aislada por Lieckfeldt *et al.* (2000) en la Guayana Francesa y Brasil. Samuels *et al.* (2000) aislaron *T. stromaticum* en zonas tropicales de sur América y en asociación con árboles de cacao en una distribución muy restringida. La especie *T. longibrachiatum* ha sido encontrada en América del Norte y del Sur, Europa, África e India, pero no se ha encontrado en el Sudeste Asiático o Australasia, por otro lado *T. citrinoviride* se encuentra distribuida en Norte y Sur America, Europa, Australasia sudeste de Asia, sin embargo, en África e India no se ha detectado. Como especies verdaderamente cosmopolitas se tienen a *T. harzianum* y *T. asperellum* (Observación personal, J.G, Samuels).

En los últimos años se tienen un mayor número de reportes de especies de *Trichoderma* por lo cual Harman y Kubicek (2014) lo consideran un hongo cosmopolita que crece en diversos tipos de suelo y en materia orgánica en descomposición, además están presentes como componentes dominantes de la microflora edáfica en diversos hábitats.

En México se tienen registros del género *Trichoderma* en la región sur del estado de Chihuahua (Guigón y Gonazález, 2004). Por otro lado, Mendoza *et al.* (2011) aislaron e identificaron *T. hammatum*, *T. koningiopsis* y *T. asperellum* en la región noreste del país en el estado de Tamaulipas. En el estado de Tabasco, fueron encontrados *Trichoderma asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. pleuroticola*, *T. reesei*, *T. spirale* y *T. virens* por Torres-De la Cruz *et al.* (2015). Para el caso particular del estado de Querétaro, se han aislado e identificado diversas especies como *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T.*

atrobrunneum, *T. tomentosum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* y *T. atroviride* (García-Sánchez, 2019).

2.3 Condiciones de crecimiento

Los factores físicos y nutricionales son los que más afectan el crecimiento de este hongo en condiciones naturales.

El rango de pH para su crecimiento es amplio, va desde 2.0 a 9.0, sin embargo, se considera de 4.0 a 7.0 como el rango óptimo de crecimiento (Domsch *et al.* 1980). La temperatura óptima para su desarrollo utilizada en laboratorio es de 25 °C (Alexopoulos *et al.* 1996).

Como fuentes de carbono puede degradar sustratos ricos en almidón, pectina y celulosa, debido a la secreción de enzimas hidrolíticas producto de su versátil metabolismo. La germinación de las esporas depende del tipo la fuente de carbono, ya sea un disacárido o un polisacárido, el hongo usa enzimas como las amilasas, α -glucosidasas, endo y exocelulasas, que hidrolizan los azúcares para dar inicio a la germinación de las esporas (Astudillo, 1999).

Como fuente de nitrógeno puede utilizar aminoácidos, nitritos, urea y sulfato de amonio (Moore, 1996).

2.4 Control biológico

Dentro del contexto del presente trabajo, la definición de control biológico por inoculación, expuesta por Eilenberg *et al.* (2001) y modificada de Crump *et al.* (1999) es la más adecuada: “*la liberación intencional de un organismo vivo como agente de control biológico, con la expectativa de que se multiplicará y controlará la plaga por un periodo prolongado de tiempo, pero no de forma permanente*”.

2.4.1 *Trichoderma* en el control biológico

El empleo de microorganismos para el control de plagas y enfermedades agrícolas es cada vez más frecuente. Están reportadas algunas bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, pero también hongos del género *Trichoderma*, que tienen

la doble función de promover crecimiento vegetal y proteger contra fitopatógenos (Nakkeeran *et al.* 2005; Saravanakumar *et al.* 2007; Van Loon, 2007).

En el control biológico se utilizan las esporas y los metabolitos exudados por los microorganismos, que actúan sobre la pared, membrana celular y ácidos nucleicos de sus hospederos. En el micoparasitismo, los organismos antagónicos forman estructuras especializadas y logran la muerte de los fitopatógenos alimentándose de ellos, controlando o disminuyendo las poblaciones considerablemente (Elad y Katan, 1980).

Hjeljord y Tronsmo (1998) explican que *Trichoderma* es un agente de control biológico sobresaliente debido a la maquinaria enzimática que posee y la rapidez con que crece en diversos tipos de sustratos, característica que lo hace un organismo de fácil cultivo.

2.4.2 Mecanismos de acción de *Trichoderma* involucrados en el control biológico

Los principales mecanismos de acción de *Trichoderma* para el control de fitopatógenos son: la competencia por espacio y nutrientes, la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas, como las proteasas, quitinasas, y glucanasas, que degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos y posteriormente los parasita (Benítez *et al.* 2004; Harman *et al.* 2004; Solanki *et al.* 2011; Rai *et al.* 2016).

Trichoderma además induce la resistencia sistémica en asociación con las plantas, aumenta el crecimiento y desarrollo de raíces, mejora la toma de nutrientes y otorga a las plantas resistencia a estrés, mejorando el rendimiento de los cultivos (Studholme *et al.* 2013; Cornejo-Contreras *et al.* 2016;).

2.4.2.1 Micoparasitismo

El micoparasitismo es el ataque directo de un hongo sobre otro, un proceso complejo que involucra varias etapas.

Esta reportado que *Trichoderma* produce constitutivamente enzimas que inician la degradación de la pared celular de otros hongos, entonces se liberan oligómeros que inducen la producción de exo y endoquitinasas en mayor cantidad y comienza el crecimiento hacia el hospedero (Harman *et al.* 2004). Posteriormente, *Trichoderma* se adhiere a carbohidratos y lectinas de la pared celular del hospedero dándose el proceso de enrollamiento, al mismo tiempo, segrega enzimas líticas como proteasas, quitinasas y glucanasas, que ayudan a perforar la hifa, en esta etapa *Trichoderma* forma estructuras tipo apresorio y además libera peptaiboles que facilitan la entrada al citoplasma del hongo parasitado, facilitando la asimilación del contenido de la pared celular (Howell, 2003; Carsolio *et al.* 1999). Finalmente, *Trichoderma* se alimenta de los nutrimentos del hongo parasitado causándole la muerte. En este proceso juegan un papel muy importante la producción de enzimas líticas, involucradas en varios procesos como son la degradación de la pared celular por quitinasas (Mach *et al.* 1999; Howell, 2003) y por glucanasas con efecto sobre la inhibición de la germinación de esporas (El-Katatny *et al.* 2001).

2.4.2.2 Compuestos volátiles

Las plantas, así como los microorganismos y hongos, producen y emiten un gran grupo de moléculas químicamente diversas que juegan un rol importante en la comunicación, interacción y defensa (Baldwin *et al.* 2006; Simpraga *et al.* 2016). Debido a su volatilidad funcionan como moléculas de señalización sobre y bajo el suelo a través de los poros de la matriz del mismo (Schulz-Bohm *et al.* 2017).

Los hongos producen diversos compuestos químicos volátiles como son: ácidos, alcoholes, aldehídos, aromáticos, ésteres, heterocíclicos, cetonas y tioles (Hung *et al.* 2015). Específicamente se han desarrollado trabajos que han explorado la emisión de compuestos volátiles de cepas de *Trichoderma*, mostrando que los perfiles de emisión dependen de la especie o cepa que se utilice, así como el tipo de sustrato y condiciones ambientales de cultivo (Stoppacher *et al.* 2010; Crutcher *et al.* 2013). Se han detectado más de 480 compuestos volátiles producidos por cepas de *Trichoderma* (Siddique, 2014). Algunos de estos compuestos, fueron

dañinos para hongos fitopatógenos, indicando que los compuestos volátiles juegan un papel importante en el biocontrol (Morath *et al.* 2012; Contreras-Cornejo *et al.* 2014; Li *et al.* 2018).

2.4.2.3 Antibiosis

La definición de antibiosis dada por Waksman (1945) dice que la palabra se refiere a “*la inhibición del crecimiento o la actividad metabólica de una bacteria u otro microorganismo, por una sustancia química de origen microbiano*”. En este sentido, los metabolitos liberados por *Trichoderma* spp. podrían denominarse sustancias antibióticas.

Trichoderma secreta diversos metabolitos secundarios con propiedades antibióticas que incluyen poliketidos, terpenoides, polipéptidos y metabolitos de α -amino ácidos (Taylor, 1986).

Es frecuente que *Trichoderma* produzca estas sustancias como producto de su metabolismo secundario, ya sean volátiles o no volátiles, que muestran capacidad de inhibir el crecimiento o germinación de hongos fitopatógenos (Degenkolb *et al.* 2006). El compuesto 6 pentil- α -pirona (6-PP) es uno de los más estudiados en cuanto a su papel en el biocontrol, este compuesto es el responsable del característico olor a coco de algunas especies, y de la pigmentación amarilla. Rubio *et al.* (2009) alteraron el gen *Tchtf1* que codifica para un factor de transcripción de cutinasa 1 alfa, el cual inhabilita a *Trichoderma* para producir dos compuestos relacionados con la pigmentación amarilla, estos están correlacionados con metabolitos derivados de la 6-PP, y posteriormente demostraron que la cepa carente de este gen mostró menor capacidad antimicrobiana contra *Fusarium* spp.

Otros compuestos producidos por *Trichoderma* con efecto antibiótico y ampliamente descritos, son los peptaiboles, son una familia de polipéptidos de cadena corta de 15 a 20 residuos aproximadamente, denominados péptidos antibióticos, estos poseen actividad antimicrobiana, ya que forman poros en la membrana lipídica de los hospederos, lo cual provoca la fuga de iones a través de la membrana alterando

el equilibrio osmótico celular y ocasiona la muerte. Los peptaiboles incluyen los producidos por *T. harzianum* como son las trichorzianinas, trichokindinas, trichorzinas y harzianinas (El Hajji *et al.* 1987; Rebuffat *et al.* 1989; Goulard *et al.* 1995; Duval *et al.* 1998.). Por otro lado, existen reportes de que *T. virens* produce alameticinas y trichotoxinas (Kleinkauf y Rindflesich, 1975; Brewer *et al.* 1987; Irmischer *et al.* 1978).

2.4.2.4 Competencia por nutrientes

Trichoderma es capaz de crecer a tasas de velocidad superiores a otros microorganismos del suelo, así como de aprovechar con mayor eficacia los nutrientes disponibles para obtener glucosa y generar ATP (adenosín trifosfato) a partir del metabolismo de diferentes polímeros como son: celulosa, glucano y quitina entre otros (Chet *et al.* 1997). Además, posee enzimas de asimilación y permeasas, que son claves para metabolizar la glucosa, junto con proteínas involucradas en las modificaciones de la membrana y pared celular (Delgado *et al.* 2003).

2.4.2.5 Resistencia sistémica inducida

Trichoderma tiene la capacidad de producir moléculas denominadas elicitores, las cuales, mediante una cascada de señalización, activan genes de respuesta de defensa en las plantas, cuando están sujetas a condiciones de estrés biótico o abiótico. Estos compuestos han sido identificados principalmente como ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico, entre otros (Pieterse *et al.* 2014; Domínguez *et al.* 2016). Dependiendo del tipo de elicitador liberado por el hongo, se desencadena una vía específica de señalización, en una primera etapa se da el reconocimiento y adhesión del hongo con la planta, posteriormente se induce la resistencia sistémica (Nawrocka y Melolepsza, 2013). Junto con el ácido salicílico, las fitohormonas jasmonato y etileno, son importantes reguladores del sistema inmune en las plantas (Thomma *et al.* 2001).

El papel de *Trichoderma spp.* en la inducción de resistencia sistémica por la producción del ácido salicílico ha sido reportada por Contreras-Cornejo *et al.* (2011),

dicha respuesta también incluye proteínas enzimáticas como xilanasas y celulasas, así como proteínas y péptidos con funciones más específicas de activación de defensa como Sm1, de *Trichoderma virens* (Djokovic *et al.* 2007). Estudios de genómica comparativa de *Trichoderma* y hongos micorrízicos, revelan la presencia de múltiples genes que codifican elicitores y efectores putativos, los cuales ofrecen un gran potencial para futuras investigaciones sobre el papel de *Trichoderma* en la inducción de resistencia sistémica (Mukherjee *et al.* 2013).

2.5 Hongos que controla

Son diversos los estudios en los que se ha comprobado el efecto antagonista de especies de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos en la tabla 1, se muestra una lista con algunos de los antecedentes.

Tabla 1. Reportes de hongos fitopatógenos antagonizados por *Trichoderma* spp.

Especies	Fitopatógeno que afecta	Referencia
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Ceratobasidium cornigerum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>P. myriotylum</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Bell <i>et al.</i> (1982)
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Phomopsis viticola</i> , <i>Cylindrocarpon</i> sp.	Riquelme (2006)
<i>Trichoderma ovalisporum</i> , <i>T. theobromicola</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. stilbohypoxyli</i> , <i>T. caribbaeum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	Bae <i>et al.</i> (2011)
<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Bogumil <i>et al.</i> (2013)
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Zehra <i>et al.</i> (2017)

2.6 *Trichoderma* en la promoción del crecimiento vegetal

Trichoderma ha demostrado efecto sobre el crecimiento de las plantas, entre los mecanismos involucrados en este fenómeno se encuentran la producción de fitohormonas promotoras de crecimiento vegetal como el ácido indol acético, el etileno, entre otras. Otro mecanismo por el cual los hongos de este género influyen en el crecimiento vegetal, es la solubilización de nutrientes poco disponibles o secuestrados por factores físico-químicos, como son: fosfatos tricálcicos (Ca_3PO_4), fitatos ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$), fosfatos de aluminio (AlPO_4) y fosfatos de hierro (FePO_4) (Vinale *et al.* 2006; Adams *et al.* 2007; Huang *et al.* 2011; Altomar, 2011; Cai *et al.* 2013).

2.6.1 Mecanismos involucrados en el crecimiento vegetal

Existen reportes que especies de *Trichoderma* pueden segregar ácidos orgánicos, que ayudan a solubilizar nutrientes poco disponibles, como los fosfatos, hierro, magnesio y manganeso (Benítez *et al.* 2004). De igual manera Li *et al.* (2015), señalan que *Trichoderma harzianum* promovió significativamente la toma de nutrientes y el crecimiento en plantas de tomate ya que en dicho estudio se observó un aumento del 31 % en biomasa en plántulas inoculadas con respecto a las no inoculadas, en tanto que la absorción de K, Fe y Zn aumentó entre 15 - 40 % en las hojas nuevas de tomate, la captación de P, Fe, Cu y Zn por las raíces también aumentó entre 21-73 % respecto a las plantas no inoculadas.

2.6.2 Solubilización de fosfatos

El fósforo (P) tiene un papel clave en la nutrición vegetal, después del nitrógeno (N). Participa en prácticamente todos los procesos metabólicos de las plantas, tales como: fotosíntesis, transferencia de energía, transducción de señales, biosíntesis macromolecular y respiración (Khan *et al.* 2010). A pesar de que el fósforo se encuentra abundantemente en la mayoría de los suelos, en formas orgánicas e inorgánicas, es poco disponible para la mayoría de las plantas, debido a la alta fijación de fósforo por factores inherentes a cada tipo de suelo, solo el 0.1 % del

total es fósforo disponible para las plantas (Zhou *et al.* 1992). Por otro lado, los microorganismos son un componente integral de los suelos, y son importantes en la transferencia de fósforo en la solución del suelo, mediante mecanismos de solubilización y mineralización de fósforo inorgánico y orgánico. Esta biodisponibilidad permite la toma del nutriente por parte de las raíces de las plantas (Khan *et al.* 2012). El proceso de solubilización es causado por la producción y liberación de ácidos orgánicos y fosfatasas producidas por los microorganismos (Ramesh *et al.* 2011). El efecto positivo de la inoculación de cepas de *Trichoderma* en la transferencia de diferentes fuentes de fósforo ha sido reportado por varios autores (Saravanakumar *et al.* 2013; Stewart y Hill, 2014; García-López *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2017).

2.6.3 Producción de sideróforos

Los sideróforos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular con una alta afinidad para quelar hierro III (Hider y Kong, 2010), producidos por diferentes microorganismos, entre ellos *Trichoderma*. La alta afinidad de los sideróforos para secuestrar este micronutriente, limita la disponibilidad para el uso de otros organismos, principalmente patógenos, sin embargo, no se considera perjudicial para las plantas, ya que éstas pueden tomarlo en la forma de complejo sideróforo-hierro, siendo así un mecanismo de biocontrol al limitar las fuentes de hierro y por otro lado promueve la tasa de transferencia de hierro para las plantas (Leong, 1986).

2.6.4 Producción de ácido indol acético

Por muchos años ha sido conocido el efecto benéfico de *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetal, en condiciones controladas e *in vivo* (Chang *et al.* 1986; Yedidia *et al.* 2001; Adams *et al.* 2007). En plantas de maíz, la inoculación de *Trichoderma* modifica la estructura radicular, lo cual fue relacionado con el rendimiento de las plantas, específicamente con el número de raíces secundarias y la biomasa de la raíz (Bjorkman *et al.* 1998; Harman *et al.* 2004). Un sistema radicular sano es de suma importancia ya que mejora las condiciones de anclaje, y por ende la toma de agua y nutrientes (López-Bucío *et al.* 2005). Contreras-Cornejo *et al.* (2009),

investigaron el papel de la auxina en la regulación del crecimiento y desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, en respuesta a la inoculación con *Trichoderma virens* y *T. atroviride* mediante el desarrollo de un sistema de interacción planta-hongo en condiciones *in vitro*. *T. virens* produjo compuestos relacionados con las auxinas: ácido indol-3-acético, indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol. Un análisis comparativo de los tres compuestos indólicos proporcionó información detallada sobre la relación en la modulación de la arquitectura del sistema radicular. Estos resultados destacan el importante papel de la señalización de auxinas para la promoción del crecimiento en plantas por *T. virens*.

2.7 Importancia económica del cultivo de tomate

En México, la producción de tomate rojo en el año agrícola 2017-2018 en territorio nacional alcanzó una producción de 2.2 millones de toneladas (SIAP, 2018) con una superficie sembrada de 47 mil hectáreas. El estado de Sinaloa es el mayor productor del país aportando a la fecha 813 mil toneladas de la producción y representando el 37% del total, le siguen estados como San Luis Potosí con el 9.9%, Zacatecas con 6.7%, Sonora con 4.9%; Querétaro con una producción del 3.9%, se coloca entre los principales 5 estados en la producción de tomate en el país. En cuanto a las divisas generadas en el país, la representación del valor del cultivo del jitomate en México en el año 2016 fue de 3.46% del PIB agrícola nacional. En el mercado internacional para el mismo año, el jitomate cubrió el 90.67% de las importaciones de Estados Unidos y el 65.31% de Canadá (SIAP-SAGARPA, 2017).

2.8 Requerimientos nutrimentales del cultivo de tomate

Como principio básico y general, los requerimientos nutricionales en el reino vegetal son los mismos, las cantidades requeridas varían de acuerdo a su genotipo, Salisbury y Ross (1994) señalan 17 elementos como esenciales para la constitución y metabolismo de los vegetales, estos son: molibdeno, níquel, cobre, zinc, manganeso, boro, hierro, cloro, azufre, fósforo, magnesio, calcio, potasio, nitrógeno, oxígeno, carbono e hidrógeno. Según las cantidades absorbidas por las plantas son clasificados en macronutrientes (0.1 % en base a la materia seca) y en

micronutrientes (requeridos en cantidades menores a los 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomasa seca) (Rodríguez y Flores, 2004). Particularmente en el cultivo comercial de jitomate, los 17 elementos antes señalados son necesarios para la salud y metabolismo de la planta, pero los criterios para el suministro de las diferentes fuentes nutrimentales están determinados por el sistema de producción específico, es decir, de acuerdo a la fertilidad del suelo o sustrato, tipo de riego, sistema de producción, bajo cubierta (invernadero) o a campo abierto.

2.9 Enfermedades fúngicas más comunes que afectan al tomate

A continuación, en la tabla 2, se muestran las enfermedades más comunes causadas por hongos en México.

Tabla 2. Reportes de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en cultivo de jitomate en México.

Enfermedad fúngica	Referencia
Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>) Cenicilla (<i>Oidiopsis taurica</i> , <i>Oidium neolycopersici</i>) Marchitez (<i>Rhizoctonia</i> spp) Marchitez (<i>Fusarium</i> spp)	Rodríguez <i>et al.</i> (2011)
Ahogamiento o secadera (damping-off) (<i>Pythium aphanidermatum</i> y <i>Rizoctonia solani</i>) Tizón temprano (<i>Alternaria solani</i>) Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>) Pudrición basal de tallo (<i>Sclerotium rolfsii</i>) Pudrición de fruto (<i>Alternaria</i> sp, <i>Pythium</i> sp y <i>Geotrichum</i> sp)	Quiroga <i>et al.</i> (2007)
<i>Pythium</i> sp, <i>Phytophthora solani</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Oidiopsis taurica</i> , <i>Cladosporium fulvum</i> , <i>Sclerotinia sclerotium</i> ,	Rodríguez (2013)
<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i> spp, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria solani</i>	Gómez <i>et al.</i> (2011)

III. JUSTIFICACIÓN

Frente a la problemática actual del efecto nocivo de los plaguicidas empleados para el control de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas, se busca una alternativa de reemplazo eficiente y sin consecuencias negativas sobre la salud humana y medioambiental. Especies del género *Trichoderma*, representan un organismo potencial para el reemplazo de algunos plaguicidas, debido a su versatilidad metabólica y su capacidad de adaptación. Por ello se pretende conocer la interacción de 65 cepas de *Trichoderma* spp., nativas del estado de Querétaro, con mayor actividad bioprotectora frente a patógenos de tomate y bioestimuladora de crecimiento vegetal en plantas del mismo cultivo.

La presente investigación servirá para conocer las características particulares de cada cepa, generando nuevas líneas de investigación enfocadas al desarrollo de bioproductos, así mismo, se resalta la importancia de este estudio, para poder incorporar tecnologías biológicas en los sistemas agrícolas de producción en nuestro país con una adecuada base científica.

IV. HIPÓTESIS

Especies del género *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro tienen capacidad promotora de crecimiento vegetal y actividad bioprotectora frente a hongos patógenos de tomate como: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*.

Dirección General de Bibliotecas UNO

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto antagónico de 65 cepas de *Trichoderma* contra siete fitopatógenos de tomate, así como su actividad solubilizadora de nutrientes en condiciones de laboratorio y determinar el efecto promotor de crecimiento vegetal de 50 cepas de *Trichoderma* sobre plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de invernadero.

5.2 Objetivos específicos:

Determinar el efecto antagónico de 65 cepas de *Trichoderma* sobre siete hongos patógenos de tomate en condiciones *in vitro*, por la vía del micoparasitismo, compuestos volátiles y metabolitos difusibles.

Determinar y cuantificar la capacidad de solubilizar fosfatos tricalcicos por 65 cepas de *Trichoderma*.

Determinar y cuantificar la producción de sideróforos por 65 cepas de *Trichoderma*

Determinar y cuantificar la producción de ácido indol acético por 65 cepas de *Trichoderma*.

Determinar el efecto de la inoculación de 50 cepas de *Trichoderma*, sobre plántulas de tomate.

Analizar la interacción *in vitro* de *Trichoderma-gfp* contra *R. solani*.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico utilizado y condiciones de cultivo

6.1.1 Cepas de *Trichoderma*

Se utilizaron 65 cepas del hongo del género *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro aisladas e identificadas por García-Sánchez (2018) y son parte de los organismos de importancia biotecnológica que se encuentran en el Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO), campus aeropuerto de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro. Esta colección de cepas fue identificada molecularmente mediante secuenciación de dos marcadores moleculares: el gen ribosomal 5.8S utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 y un fragmento del gen *tef-1 α* , con los cebadores EF1-728F y EF1-986R (Nagy *et al.* 2007; Jaklitsch y Voglmayr, 2015).

En el trabajo de tesis de García-Sánchez se obtuvieron 133 aislados, y a partir de las secuencias editadas se realizaron análisis filogenéticos con los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y el Método Bayesiano, las cepas de *Trichoderma* se agruparon dentro de 4 clados utilizando por separado ambos marcadores moleculares, los cuales corresponden al clado Hamatum, el clado Viride, el clado Longibrachiatum y el clado Harzianum, posteriormente se realizaron análisis independientes de cada clado utilizando las secuencias concatenadas.

De cada uno de los cuatro clados (4 árboles filogenéticos en total) del trabajo anterior, se seleccionó al menos una cepa de cada taxa terminal, dando como resultado 65 cepas, a continuación, en la tabla 3, se presentan las cepas empleadas en el presente trabajo con los datos generales de cada una como son: clave, especie, nicho ecológico (suelo de rizosférico) y lugar de procedencia (municipio del estado de Querétaro).

Tabla 3. Lista de cepas de *Trichoderma* utilizadas en el presente trabajo.

Clave	Especie	Nicho ecológico	Municipio
*028	<i>T. atroviride</i>	Pino	Pinal de Amoles
AD3	<i>T. atroviride</i>	Pino	Tolimán
AJUM1	<i>T. harzianum</i>	Maíz	Colón
AJUM2	<i>Trichoderma sp.</i>	Maíz	Colón
AJUM3	<i>T. harzianum</i>	Maíz	Colón
AJUM6	<i>T. atroviride</i>	Maíz	Colón
CHM1	<i>T. atroviride</i>	Frijol	Querétaro
CHQ1	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Querétaro
CHQ3	<i>T. atrobrunneum</i>	Maíz	Querétaro
CM1	<i>T. atroviride</i>	Maíz	Pedro Escobedo
GAM1	<i>T. asperellum</i>	Guayaba	Tolimán
GY1	<i>T. asperellum</i>	Guayaba	Tolimán
GY2	<i>T. koningiopsis</i>	Guayaba	Tolimán
MB1	<i>T. atroviride</i>	Maíz	San Joaquín
MB3	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	Tolimán
MLP2	<i>T. atroviride</i>	Maíz	El Marques
MLP3	<i>T. atroviride</i>	Frijol	El Marques
NI-1	<i>T. asperellum</i>	Nispero	Tolimán
NI3	<i>Trichoderma sp.</i>	Nispero	Tolimán
RE-01	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-04	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-05	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-07	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-09	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-11	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-12.1	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-13	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-13.1	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-15	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-20	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	Pinal de Amoles
RE-21	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	Pinal de Amoles
SM3-1	<i>T. capillare</i>	Frijol	San Joaquín
SV2M3	<i>T. capillare</i>	Maíz	El Marques

Continuación tabla 3.

Clave	Especie	Nicho ecológico	Municipio
SV4	<i>T. atrobrunneum</i>	Frijol	El Marques
T1-1	<i>T. harzianum</i>	Maíz	Toliman
T2-1	<i>T. harzianum</i>	Maíz	Toliman
TC2	<i>T. asperellum</i>	Cebada	Corregidora
TC7	<i>T. asperellum</i>	Cebada	Corregidora
TEH1	<i>T. atroviride</i>	Maíz	El Marques
TEH3	<i>T. harzianum</i>	Maíz	El Marques
TEH4	<i>Trichoderma sp.</i>	Maíz	El Marques
TEH5	<i>T. asperellum</i>	Higuerilla	Querétaro
TEH7	<i>T. harzianum</i>	Maíz	El Marques
TEM1	<i>Trichoderma sp.</i>	Maíz	Toliman
TM9	<i>T. atrobrunneum</i>	Maíz	Toliman
TQ1	<i>T. asperellum</i>	Maíz	Querétaro
TQ2	<i>T. atroviride</i>	Maíz	Querétaro
TQ3	<i>T. asperellum</i>	Maíz	Querétaro
TQ4	<i>T. asperellum</i>	Maíz	Querétaro
TRT3	<i>T. asperellum</i>	Maíz	Querétaro
TSJ5	<i>T. harzianum</i>	Aguacate	San joaquín
TSJ6	<i>T. harzianum</i>	Aguacate	San joaquín
TSJ7	<i>T. atrobrunneum</i>	Aguacate	San joaquín
TSJ8	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	San joaquín
TSJ9	<i>T. atroviride</i>	Aguacate	San joaquín
TSJ14	<i>T. capillare</i>	Aguacate	San joaquín
TSJ15	<i>T. asperellum</i>	Aguacate	San joaquín
TSR1-2	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	San Juan del Río
TSR1-5	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	San Juan del Río
TSR1-6	<i>T. tomentosum</i>	Maíz	San Juan del Río
TSR1-7	<i>T. capillare</i>	Maíz	San Juan del Río
TTX2	<i>T. atroviride</i>	Maíz	Tequisquiapan
GM1	<i>T. capillare</i>	Guayaba	Toliman
LGMIC	<i>T. atroviride</i>	Maíz	El Marques
MUM5	<i>T. koningiopsis</i>	Maíz	Querétaro

6.1.2 Cepas de hongos fitopatógenos

Los hongos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* fueron proporcionados por el Dr. Alfredo Herrera Estrella, CINVESTAV, Irapuato (Velazquez-Robledo *et al.* 2011). El hongo *Phytophthora capsici*, fue proporcionada por el Dr. Julio Vega Arreguín de la UNAM, campus León, y el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* fue aislado e indentificado de frutos de aguacate con roña por Pérez-Resendiz (2015), en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la UAQ.

6.1.3 Planta como modelo de estudio

La planta para realizar el estudio de validación de la inoculación de cepas de *Trichoderma* fue tomate (*Solanum lycopersicum* var. Rio Grande). Las semillas fueron adquiridas en una empresa comercializadora de insumos para la agricultura.

6.2 Efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos

6.2.1 Antagonismo *in vitro* por micoparasitismo

La actividad micoparasítica de las 65 cepas de *Trichoderma*, se probó frente a los siete hongos fitopatógenos antes citados: *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *P. capsici*, *R. solani* y *S. rolfsii*, utilizando la técnica de cultivos duales (Fokkema, 1978), la cual consiste en inocular los dos organismos en una misma caja de Petri con medio de cultivo sólido papa-dextrosa-agar (MCD-Lab), sembrando un disco de micelio de 5 mm de diámetro de un hongo fitopatógeno y una cepa de *Trichoderma* (antagonista) de lados opuestos a 1.5 cm del borde hacia el centro de la caja en línea recta. Los hongos *S. rolfsii* y *R. solani* se sembraron al mismo tiempo que las cepas de *Trichoderma*, por otro lado, los hongos *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* y *P. capsici*, se sembraron 3 días antes que las cepas de *Trichoderma*, debido a que son hongos de lento crecimiento con la finalidad de generar una interacción en el centro de la caja más adecuada. Las cajas con los cultivos duales se colocaron en una incubadora Thermo Scientific Precision-818, durante 14 días a 27 °C, con luz blanca constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron fotografías con una cámara réflex

digital Nikon D3300 y con apoyo de las imágenes se evaluó del efecto micoparasítico, basado en la escala de Bell *et al.* (1982), que clasifica el efecto micoparasítico, por la capacidad de sobre-crecimiento de un hongo sobre otro, agrupándose en cepas de clase I (excelente), II (buena), III (intermedia) IV (poco activa) y V (nula), se detallan las características de cada clase en la tabla 4. Los confrontamientos de las 65 cepas de *Trichoderma* contra los 7 fitopatógenos se hicieron por triplicado. Una vez obtenidos los datos y clasificadas las cepas de acuerdo a su capacidad micoparasítica de excelente, es decir, clase I en la escala de Bell, contra cada uno de los fitopatógenos estudiados, se realizó una comparación de listas de las cepas de *Trichoderma* presentes en cada uno de los fitopatógenos, para obtener una representación gráfica de los grupos de interés, se generaron dos diagramas de Venn, con la ayuda del programa (Bioinformatics & Evolucionary Genomics) <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, debido a que el programa no permitió elaborar el número de comparaciones generadas en total, se realizó en dos partes, una comparación para las cepas de *Trichoderma* presentes como excelentes micoparasíticas para los fitopatógenos *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *R. solani* y *S. rolfsii* y otra para las cepas presentes contra *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*.

Tabla 3. Escala de Bell.

Clasificación de la actividad micoparasítica de <i>Trichoderma</i> vs fitopatógenos	
Clase 1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente el hongo fitopatógeno y llena la superficie del medio
Clase 2	<i>Trichoderma</i> crece 2/3 partes la superficie del medio
Clase 3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno crecen por igual ocupando la mitad de la caja cada uno
Clase 4	El fitopatógeno crece al menos 2/3 partes de la superficie del medio
Clase 5	El fitopatógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y llena la superficie del medio

6.2.2 Antagonismo *in vitro* por compuestos volátiles

Para medir el efecto de los compuestos volátiles liberados por *Trichoderma* spp. contra los siete fitopatógenos, se usó la técnica de placas invertidas (Dennis y Webster, 1971). La cual consiste en sembrar los hongos en cajas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (MCD-Lab), colocando un disco de micelio de 5 mm de diámetro del antagonista (*Trichoderma*) en el centro de una caja y otro disco de 5 mm del patógeno en el centro de otra caja, para después, cuidadosamente colocarse de frente y sellarse con película plástica auto-adherible por los lados, de tal manera que unidas formen una cámara, y el hongo *Trichoderma* se encuentre debajo en una caja con medio de cultivo y en la misma dirección de arriba hacia abajo el hongo fitopatógeno, compartiendo un espacio determinado, pero sin tocarse. Este procedimiento se estableció con los mismos 7 fitopatógenos mencionados en el experimento anterior y las 65 cepas de *Trichoderma*, como control se utilizó el mismo sistema, colocando el hongo fitopatógeno con otro explante de la misma especie, se tomo como referencia el radio de crecimiento del hongo control, una vez que el hongo cubrió $\frac{3}{4}$ partes del medio de cultivo en la caja. El experimento se realizó por triplicado. Se incubaron a 27 °C y luz constante, en una incubadora Thermo Scientific Precision-818 durante el tiempo que el control llego a ocupar la superficie mencionada para realizar la toma de datos (variable debido a la diferencia en la velocidad de crecimiento en cada fitopatógeno), posterior al tiempo de cultivo necesario, se tomaron fotografías con una cámara réflex digital Nikon D3300, de las fotografías y con el uso del programa computacional imageJ (versión 1.52u) se midió el diámetro de crecimiento de los hongos fitopatógenos confrontados con las cepas de *Trichoderma*, y el de los controles.

Los datos obtenidos se calcularon y expresaron en porcentajes de inhibición con respecto al crecimiento del control. Para localizar y seleccionar las cepas de *Trichoderma* con mayor capacidad y espectro de acción de inhibir fitopatógenos por compuestos volátiles, se ordenaron las listas con los valores de las medias muestrales de mayor a menor y se seleccionaron las cepas capaces de inhibir en

más de un determinado punto de corte porcentual, distinto para cada patógeno, los puntos de corte seleccionados para cada fitopatógeno fueron los siguientes: *A. alternata* y *B. cinerea* 40%, *P. capsici* 30%, *R. solani* 25%, *S. rolfsii* 50%, como los fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* fueron los de menor grado de inhibición se seleccionaron las cepas que lograron inhibir en un 25% y 20% respectivamente.

Una vez seleccionadas por su capacidad de inhibir los 7 fitopatógenos y en los diferentes grados de inhibición porcentual para cada uno, se realizó una comparación de listas para obtener una representación gráfica de los grupos de cepas de interés con la ayuda del programa (Bioinformatics & Evolucionary Genomics) <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, debido a que el programa no permitió elaborar el número de comparaciones generadas en total, por que la cantidad de datos a procesar sobrepasaron la capacidad del programa para comparar listas y se realizó en dos partes, una comparación para las cepas de *Trichoderma* presentes afectando a los fitopatógenos *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *R. solani* y *S. rolfsii* y otro para las cepas de *Trichoderma* contra los fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*.

Para conocer las diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza con los datos de las medias muestrales (diámetro de las colonias en cm) ANOVA y una prueba *post-hoc* mediante un test de Tukey a nivel de significancia del 0.05%, para cada uno de los hongos fitopatógenos confrontados con las cepas de *Trichoderma*.

6.2.3 Antagonismo *in vitro* por metabolitos difusibles

El efecto de los compuestos difusibles, secretados por las cepas *Trichoderma* spp. contra los 7 fitopatógenos ya mencionados se estableció usando la técnica de Dennis y Webster (1971). La cual consistió en colocar una mebrana de celofan sobre la superficie del medio de cultivo papa-dextrosa-agar (MCD-Lab), para posteriormente sembrar en el centro de la caja un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada una de las 65 cepas de *Trichoderma*, las placas se incubaron a

27 °C expuestos a luz blanca constante en una incubadora Thermo Scientific Precision-818 y durante el periodo necesario que necesitaron para cubrir la totalidad de la superficie, debido a que la velocidad de crecimiento es variable, el tiempo de incubación fue de aproximadamente 48 h, después con ayuda de unas pinzas estériles y en campana de flujo laminar, se retiraron cuidadosamente los celofanes conteniendo el micelio de las cepas de *Trichoderma*, para después sembrar un disco de micelio de 5 mm de diámetro del fitopatógeno a probar, en el centro de la caja los cuales estarían en contacto con los metabolitos difundidos en el medio de cultivo por las cepas de *Trichoderma* previamente. Como control se sembraron los 7 fitopatógenos en medio de cultivo papa-dextrosa-agar sin haber sembrado cepas de *Trichoderma* en celofán y sobre la superficie del medio, de tal manera que no estaban presentes los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. El tiempo de incubación estuvo marcado por la velocidad de crecimiento de cada fitopatógeno en particular, cuando el control creció en toda la superficie de la caja se procedió a tomar fotografías con una cámara réflex digital Nikon D3300, de las fotografías y con el uso del programa computacional imageJ (versión 1.52u) se midió el diámetro de crecimiento de los hongos fitopatógenos crecidos en presencia de metabolitos secretados por las cepas de *Trichoderma* y el de los controles.

Los datos obtenidos se calcularon y expresaron en porcentajes de inhibición con respecto al crecimiento de la cepa control. Para localizar y seleccionar las cepas de *Trichoderma* con mayor capacidad y espectro de acción de inhibir fitopatógenos por metabolitos difusibles, se siguió la misma estrategia de comparación de listas de las cepas de interés que en los dos experimentos anteriores y se elaboraron diagramas de Venn. Debido a que la inhibición por metabolitos difusibles en medio de cultivo es más alta que por los compuestos volátiles, se seleccionaron puntos de corte de inhibición porcentual más altos que el experimento anterior, estos fueron de la siguiente manera: 50 % para *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *R. solani*, y *S. rolfsii*, como los fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* fueron los de menor

grado de inhibición se seleccionaron las cepas que lograron inhibir en un 25% y 20% respectivamente.

Del mismo modo que el experimento anterior, para conocer las diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza con los datos de las medias muestrales (diámetro de las colonias en cm) ANOVA y una prueba *post-hoc* mediante un test de Tukey a nivel de significancia del 0.05%, para cada uno de los hongos fitoátógenos en contacto con los metabolitos de *Trichoderma*.

6.3 Actividad solubilizadora de nutrientes

6.3.1 Producción, colecta y cuantificación de conidios.

Para poder realizar las siguientes pruebas (secciones 6.3.2, 6.3.3, 6.4, 6.5 y 6.6.1), previamente se sembraron las cepas de *Trichoderma* en placas de Petri con medio de cultivo PDA (MCD-Lab) y se incubaron durante 7 días a 27 °C en luz constante para inducir la esporulación, una vez transcurrido este tiempo, las esporas producidas en la superficie del medio se agregaron 2 ml de agua destilada estéril con una punta y micropipeta de 1000 µl, posteriormente con una varilla de vidrio estéril en forma de L, se frotó suavemente para desprender las esporas de los conidióforos y concentrarlas en la suspensión de agua, después se recuperó 1 ml en tubos de plástico de 1.5 ml de plástico estériles, cada tubo se marcó con la clave de la cepa recuperada. Las suspensiones finales se diluyeron hasta 10^{-2} y se determinó la concentración mediante conteo directo en microscopio compuesto utilizando cámara de Neubauer (BRAND™).

6.3.2 Solubilización de fosfato tricálcico en medio líquido

En el presente trabajo se realizaron pruebas en medio de cultivo sólido Pikovskaya-agar, el cual permite identificar microorganismos solubilizadores de fosfatos tricálcicos mediante la formación de un halo traslucido alrededor de las colonias en crecimiento. Sin embargo, aunque todas las cepas de *Trichoderma* crecieron en este medio de cultivo, indicando la capacidad de solubilizarlo e integrarlo a su

metabolismo, no formaron halos bien definidos de solubilización, por lo tanto, no se pudo evaluar dicha capacidad por este método.

Esta primera aproximación llevo a la necesidad de abordar dicho experimento utilizando el mismo medio de cultivo en estado líquido y cuantificar por espectrofotometría.

La actividad solubilizadora de fosfatos por las 65 cepas de *Trichoderma* se determinó utilizando como referencia la metodología empleada por Nopparat *et al.* (2009) con algunas modificaciones.

Se preparó el medio de cultivo líquido Pikovskaya, específico para esta prueba que tiene como única fuente de fósforo, fosfato tricálcico, una forma insoluble y no disponible por absorción de las plantas, la composición del medio de cultivo es la siguiente: 0.5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 0.1 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.004 g de sulfato manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.2 g cloruro de sodio (NaCl), 10 g de D-Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 0.002 g de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.5 g extracto de levadura y 5.0 g de fosfato tricálcico (Ca_3PO_4) en 1000 ml de ddH₂O. La solución del medio de cultivo se distribuyó en tubos de plástico conicos de 50 ml con 10 ml de medio de cultivo cada uno, debido a que el fosfato tricálcico es insoluble primero se distribuyó el medio de cultivo con todos los componentes excepto el fosfato tricálcico, éste fue agregado directamente a cada tubo con su parte correspondiente para 10 ml, los tubos conteniendo el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 22 psi y 121 °C. Una vez estériles los tubos con el medio de cultivo, con una micropipeta Thermo Scientific de 20 µl se sembraron las esporas de cada cepa, tomando el volumen necesario (variable para cada cepa, de acuerdo al conteo previo) para agregar una concentración de 1×10^6 esporas por ml de medio de cultivo. Los tubos se incubaron en un agitador orbital Wisecube WIS-20R a 140 rpm y 25 °C durante 48 h. Cada una de las 65 cepas se sembró por triplicado.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se agitaron en vortex Genie2-560, durante 30 segundos, con apoyo de una micropipeta Thermo Scientific de 1000 μ l se recuperaron 1.5 ml de líquido del cultivo en tubos de plástico estériles de 1.5 ml, y se colocaron en una microcentrifuga PrismR-C2500R a 10,000 rpm durante 10 min, este paso se repitió, usando tubos estériles nuevamente y en las mismas condiciones para asegurar que los sobrenadantes estuvieran libres de células.

Una vez finalizado el cultivo de las cepas, con los sobrenadantes de cada una se procedió a cuantificar el fosfato soluble mediante el método colorimétrico de azul de molibdeno de Ben *et al.* (2009). En este método el medio ácido el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, reaccionan con ortofosfatos formando un complejo heteropoliácido fosfomolibdico el cual es reducido a ácido ascórbico por azul de molibdeno, visible como una sustancia azul. La absorbancia del complejo a una longitud de onda de 882 nm es proporcional a la concentración de ortofosfatos en la muestra.

Dicho método requiere de una curva de calibración, la cual fue generada a partir de muestras patrón con concentraciones ascendentes conocidas del analito (ortofosfato P-PO₄) de 0.13 a 0.67 mg L⁻¹, para las técnicas colorimétricas se contó con el apoyo del Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar, profesor-investigador de la Facultad de Química de la UAQ, quien proporcionó asesoría y las curvas de calibración necesarias para llevar a cabo los experimentos.

Las soluciones necesarias para llevar a cabo la reacción y las especificaciones del procedimiento se describen a continuación:

Todo el material empleado durante las reacciones, se lava cuidadosamente con 6 M de HCl, y se enjuaga 4-5 veces con agua destilada, esto con la finalidad de eliminar trazas de fosfato contenido en los recipientes.

Solución 1.- A) solución de tartrato de antimonio y potasio K₂Sb₂(C₄H₂O₆)₂ al 0.5%: se pesó 0.5 g de tartrato de antimonio y potasio, agregándose a un matraz

volumétrico de 100 ml y se aforó con agua destilada. B) solución de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$: se disolvió 20 g de molibdato de amonio en 300 ml de H_2O destilada, se adicionó lentamente y agitación constante 450 ml de ácido sulfúrico H_2SO_4 14 N, posteriormente se adicionaron 100 ml de la solución A para después aforar a 1 L. En caso de ser necesario, esta solución debe guardarse en un frasco ambar de cristal, ya que pierde estabilidad con la luz.

Solución 2.- Solución reductora de ácido ascórbico: se pesó 0.05 g de ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ y disolvieron en un poco de la solución 1, posteriormente se aforó a 100 ml con la misma solución. Ésta solución debe ser preparada al momento en que vayan a realizarse las reacciones.

La mezcla de reacción se hizo en tubos conicos de plástico de 15 ml agregando 500 μl de sobrenadante y 500 μl de la solución reductora, posteriormente se agregaron 4 ml de agua destilada, y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de reacción la lectura del complejo formado se hizo a una longitud de onda de 882 nm en un espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis (Thermo Scientific). Como blanco se utilizó el mismo medio de cultivo sin inoculación de esporas.

Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro, la recta de calibrado elaborada previamente y con la ecuación $y = ax + b$ (x: concentración mg L^{-1} , y: $\text{DO}_{882\text{nm}}$) nos permite determinar la concentración de las muestras problema a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas.

6.3.3 Producción de sideróforos por *Trichoderma* spp.

Para abordar los estudios de producción de sideróforos por cepas de *Trichoderma*, se hizo una prueba preliminar en medio sólido CAS-agar (Schwyn y Neilands, 1987).

El cual sirve para detectar la producción de sideróforos en aquellos organismos que logran crecer y cambiar el color del medio de cultivo de azul a naranja alrededor de sus colonias, sin embargo, en dicha prueba se observó que no todas las cepas de *Trichoderma* lograban crecer en el medio de cultivo, debido muy probablemente a la elevada toxicidad del reactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio HDTMA o

CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$) presente en el medio de cultivo. Por ello, se optó por utilizar la técnica modificada de Milagres *et al.* (1999), la cual consiste en sembrar los microorganismos de interés en cajas de Petri conteniendo dos medios de cultivo en la misma caja, el medio óptimo de crecimiento, en este caso papa-dextrosa-agar (MCD-Lab) y el medio específico donde lleva a cabo la reacción química para la identificación de los compuestos CAS-agar (Schwyn y Neilands, 1987).

La composición y procedimiento para elaborar el medio de cultivo CAS-agar, fue la siguiente: Primero se lavó toda la cristalería y material para manipular los reactivos con una solución 6 M de HCl, con la finalidad de remover cualquier traza de hierro presente adherida en los materiales.

Se prepararon soluciones stock: A) tintura azul: que consiste de 3 soluciones; solución 1: se disolvió 0.06 g de cromoazurol sulfonato (Sigma-Aldrich) en 50 ml de H_2O destilada; solución 2: se pesó y disolvieron 0.0027 g de cloruro ferrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6 H_2O$) en 10 ml de 10 mM de HCl; solución 3: disolver 0.073 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA o CTAB) en 40 ml de H_2O destilada, posteriormente se mezcla la solución 1 con 9 ml de la solución 2, entonces se mezclan con la solución 3, en este punto la solución tornó a color azul oscuro, posteriormente se esterilizó y se almacenó en un contenedor plástico. Solución salina MM9: se compone de 15 g de fosfato de potasio di-hidrogenado (KH_2PO_4), 25 g de cloruro de sodio (NaCl), y 50 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) en 500 ml de H_2O destilada. Solución de glucosa: la concentración de esta solución es al 20%. Solución de casaminoácidos: se disolvieron 3 g en 27 ml de H_2O y posteriormente se hizo una extracción con una solución de 8-hidroxiquinolina al 3% en cloroformo, con la finalidad de eliminar cualquier traza de hierro contenido en los casaminácidos. Para ajustar el pH se utilizó una solución de hidróxido de sodio (NaOH), compuesta de 25 g disueltos en 150 ml de H_2O destilada.

Una vez elaboradas las soluciones stock, se tomaron 100 ml de la solución salina MM9 y se agregaron a 750 mL de H_2O , se pesó y se disolvieron 32.24 g de

piperazina-N, N'-Bis (2-ácido etnanosulfónico) PIPES, dicho componente no se disuelve a pH inferior a 5, de tal manera que conforme se agregó la solución se controló elevando el pH, adicionando gotas de la solución de hidróxido de sodio (NaOH) previamente preparada. Una vez disuelto, se ajustó el pH a 6.8, no se excede dicho valor debido a que si sube el medio de cultivo se torna color verde. Se adicionaron 15 g de agar bacteriológico y se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos. Una vez estéril se enfrió a 50 °C, y en condiciones asépticas se adicionaron 30 ml de la solución de casaminoácidos esterilizados por filtración y 10 ml de la solución de glucosa al 20% previamente estéril, finalmente se agregaron 100 ml de la tintura azul lentamente por la pared del frasco con suficiente agitación para mezclar a fondo.

Previamente, se preparó papa-dextrosa-agar MCD-Lab al 3.9 % en agua destilada, se esterilizó por 15 minutos a 120 °C y 15 psi y se vertió en cajas de Petri, una vez solidificadas, se cortó el medio de cultivo con una navaja estéril justo a la mitad de la caja, y se transfirió la mitad del medio a una caja nueva vacía, de tal manera que las cajas contenían una mitad de su superficie con medio y la otra no, posteriormente, en el espacio vacío de las cajas se vertió el medio de cultivo CAS-agar, y se dejaron solidificar en condiciones asépticas. Una vez obtenidas las cajas con ambos medios de cultivo sólidos, se sembraron las cajas con las cepas de *Trichoderma* del lado del medio de cultivo PDA, se incuban a 27 °C en luz constante durante 6 días. Debido a la naturaleza del experimento, se pudo realizar únicamente una evaluación semicuantitativa considerando la velocidad de reacción en el medio de cultivo, es decir, velocidad de la producción de sideróforos y avance de coloración en el medio de cultivo en milímetros por día.

Por las condiciones del experimento anterior, y para obtener datos cuantitativos sobre la eficiencia en la producción de sideróforos por las diferentes cepas de *Trichoderma*, se optó por realizar la prueba en medio de cultivo líquido y cuantificar la producción de sideróforos por método colorimétrico.

La estrategia experimental, medio de cultivo empleado y condiciones para llevar a cabo el análisis se describen a continuación:

Las cepas de *Trichoderma* se cultivaron en medio de cultivo líquido, el cual es óptimo para el crecimiento de este género, la composición del medio de cultivo GEYEC es la siguiente: glucosa al 1.5 %, extracto de levadura al 0.30 %, hidrolizado de caseína al 0.5 %. El medio de cultivo se distribuyó en tubos de ensaye de vidrio con 10 ml de medio cada uno, los tubos conteniendo el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 22 psi y 121 °C. Una vez estériles los tubos con el medio de cultivo, con una micropipeta Thermo Scientific de 20 µl se sembraron las esporas de cada cepa, tomando el volumen necesario (variable para cada cepa, de acuerdo al conteo previo) para agregar una concentración de 1×10^6 esporas por ml de medio de cultivo. Los tubos se incubaron en un agitador orbital Wisecube WIS-20R a 140 rpm y 25 °C durante 6 días. Cada una de las 65 cepas se sembró por triplicado.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se agitaron en vortex Genie2-560, durante 30 segundos, con apoyo de una micropipeta Thermo Scientific de 1000 µl se recuperaron 1.5 ml de líquido del cultivo en tubos de plástico estériles de 1.5 ml, y se colocaron en una microcentrifuga PrismR-C2500R a 10,000 rpm durante 10 min, este paso se repitió, usando tubos estériles nuevamente y en las mismas condiciones para asegurar que los sobrenadantes estuvieran libres de células.

Para estimar el número de sideróforos presentes en los sobrenadantes de cultivos fúngicos se utilizó la prueba de cromo azurol sulfonato líquido (Pyne, 1994). En este método, los sideróforos remueven el hierro del complejo de la tintura azul resultando una reducción del color azul a naranja.

Como en el anterior, también se utilizó una curva de calibración, la cual es generada a partir de muestras patrón con concentraciones ascendentes conocidas del analito, es decir, un sideróforo sintético comercial (mecilato de ferroxamina HDFO)

de 5.72 μM a 34.32 μM . Como se mencionó anteriormente, la asesoría y curva estándar fue proporcionada por el Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar.

Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 500 μl del sobrenadante con 500 μl de la tintura azul CAS, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, transcurrido el tiempo de reacción la lectura del complejo formado se hizo a una longitud de onda de 630 nm en espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis (Thermo Scientific).

Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia dadas por el espectrofotómetro, la recta de calibrado elaborada previamente mediante la ecuación $y = ax + b$ (x: concentración (mg L^{-1}), y: absorbancia ($\text{DO}_{630\text{nm}}$) nos permite determinar la concentración de sideróforos en las muestras problema.

6.4 Producción de ácido indol acético por *Trichoderma* spp.

Para determinar la producción de ácido indol acético por las 65 cepas de *Trichoderma* se utilizó el método colorimétrico descrito por Pilet y Collet, (1970) con algunas modificaciones. En este método el indol producido por los hongos en los sobrenadantes reacciona con el medio ácido del reactivo Salkowski para formar un compuesto de color rosa/rojo.

Para esta prueba las cepas de *Trichoderma* se cultivaron en medio de cultivo líquido GEYEC: (glucosa al 1.5 %, extracto de levadura al 0.30 %, hidrolizado de caseína al 0.5 %).

El medio de cultivo se distribuyó agregando 10 ml en tubos conicos de plástico de 50 ml cada uno, los tubos conteniendo el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 15 psi y 121 °C. Una vez estériles los tubos con el medio de cultivo, con una micropipeta Thermo Scientific de 20 μl se sembraron las esporas de cada cepa, tomando el volumen necesario (variable para cada cepa, de acuerdo al conteo previo) para agregar una concentración de 1×10^6 esporas por ml de medio de cultivo. Los tubos se incubaron en un agitador orbital Wisecube WIS-20R a 140 rpm y 25 °C durante 6 días. Cada una de las 65 cepas se sembró por triplicado.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se agitaron en vortex Genie2-560, durante 30 segundos, con apoyo de una micropipeta Thermo Scientific de 1000 μ l se recuperaron 1.5 ml de líquido del cultivo en tubos de plástico estériles de 1.5 ml, y se colocaron en una microcentrifuga PrismR-C2500R a 10,000 rpm durante 10 min, este paso se repitió, usando tubos estériles nuevamente y en las mismas condiciones para asegurar que los sobrenadantes estuvieran libres de células.

Para la determinación de la concentración de ácido indol acético en mg L^{-1} , se elaboró una curva estándar de 3.6 a 25.2 mg L^{-1} de AIA. El proceso para elaborar la curva estándar es el siguiente: se prepara una solución patrón con 3.6 mg de AIA y se diluyen en un matraz aforado de 10 ml en metanol, posteriormente de la solución patrón se toma 1 ml y es llevado a 10 ml volumen final en metanol (solución estándar), a partir de esta solución se realiza la curva agregando 100 μ l de solución estándar en 900 μ l de metanol en 2 ml de reactivo Salkowski, esto se realiza consecutivamente aumentando el volumen de solución estándar y reduciendo el volumen del solvente (metanol) hasta llegar a la concentración más alta necesaria de AIA. De cada solución y reacción se mide la absorbancia espectrofométrica por triplicado a 530 nm longitud de onda. Como se mencionó anteriormente, también en este caso la asesoría y curva estándar fue proporcionada por el Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar.

Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 400 μ l del sobrenadante con 800 μ l de reactivo Salkowski (1 ml de 0.5 M de FeCl_3 con 50 ml de HClO_4 al 35 %) (Thakuria *et al.* 2004), se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, transcurrido el tiempo de reacción la lectura del complejo formado se hizo a una longitud de onda de 530 nm en espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis (Thermo Scientific).

Una vez obtenidas las señales de absorbancia dadas por el espectrofotómetro, la recta de calibrado elaborada previamente mediante la ecuación $y = ax + b$ (x:

concentración (mg L^{-1}), y: $\text{DO}_{530\text{nm}}$) nos permite determinar la concentración de las muestras problema a partir de las lecturas obtenidas.

6.5 Efecto de la inoculación de *Trichoderma* spp. en plántulas de tomate en condiciones de invernadero

Debido a que los trabajos de validación sobre inoculación con microorganismos son muy diversos y se llevan a cabo en regiones y condiciones distintas, la metodología fue ajustada tomando como referencia a Menzies, (1993), Newman *et al.* (2002), Colla *et al.* (2005) y Gravel *et al.* (2007).

En este experimento se utilizaron 50 cepas de *Trichoderma* que habían sido validadas por García-Sánchez (2019) por su capacidad de inhibir a 4 fitopatógenos por acción de metabolitos difusibles en condiciones *in vitro*.

Las semillas de tomate variedad Rio Grande, se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 10 min, después se enjuagaron en agua destilada estéril 5 veces agitando vigorosamente. La inoculación de las semillas se hizo agregando 24 semillas previamente desinfectadas en tubos de plástico de 1.5 ml y posteriormente se agregaron 500 μl de una suspensión de esporas en adherente comercial (Inex-A, COSMOCEL) al 0.1 % en agua destilada. La concentración de la suspensión de esporas se ajustó igual para todas a 1×10^7 esporas ml^{-1} , se colocaron a temperatura ambiente durante 1 hora sin agitación. Como tratamiento control se colocó el mismo número de semillas en un tubo y se adicionó únicamente la solución de adherente, sin esporas, modificado de Ozbay *et al.* (2004).

Previamente, se preparó un sustrato a base de peat-moss, vermiculita y perlita, 50:25:25 v/v/v respectivamente, se esterilizó en autoclave a $120\text{ }^\circ\text{C}$ y 15 psi, durante 1 hora, una vez estéril y a temperatura ambiente, fue colocado en charolas de poliestireno de 242 cavidades. Las semillas tratadas se sembraron a 0.5 cm de profundidad y se colocaron 2 semillas por cavidad (con la finalidad de asegurar el 100% de plántulas), al final de la siembra se colocó una capa de sustrato estéril

para cerrar los orificios de la siembra. Una vez germinadas las plántulas se retiraron manualmente 1 planta de las cavidades que habían germinado las dos semillas, dejando una plántula por cavidad.

Las charolas se colocaron a temperatura ambiente con luz filtrada a través de una malla sombra de 50 %. Se realizaron riegos diariamente con agua potable, hasta la emergencia del primer par de hojas verdaderas (8-10 días), a partir de esta condición se regaron 3 veces por semana con agua y dos fertirriegos por semana con la fórmula foliar N, 20 % -P, 20 %- K, 20% más micro-elementos (TRICEL-20 de COSMOCEL) al 0.2%. El periodo de cultivo fue de 33 días a partir de la siembra.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 51 tratamientos y 4 repeticiones, la unidad experimental fue constituida por 3 plantas. Las variables a evaluar fueron altura de la planta, peso fresco del área radicular y peso fresco del área superficial. Una vez cumplidos los días de cultivo de las plántulas, la altura se midió con una regla, después fueron lavadas con agua de la llave, y para determinar el peso por separado de la parte aérea y radicular de la planta, se cortaron en el cuello de la raíz y se pesaron por separado.

Con los datos obtenidos se realizaron un análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables, se realizó una prueba de comparación de medias post-hoc de Dunnett que compara las medias de los tratamientos con respecto al control, en un nivel de significancia del 0.05 %.

6.6 Interacción *in vitro* de *Trichoderma-gfp* vs *R. solani*

Para conocer la interacción *in vitro* de *Trichoderma* contra *R. solani* fitopatógeno de tomate, primero se realizó una prueba de concentración mínima inhibitoria para 17 cepas con 3 antibióticos empleados como marcadores de selección, una vez obtenidos los resultados de esta prueba preliminar, se utilizaron únicamente las cepas más sensibles a los antibióticos para etiquetarse con el gen reportero que codifica la proteína verde fluorescente y entonces realizar los estudios de interacción *in vitro*.

6.6.1 Pruebas de concentración mínima inhibitoria

Se utilizaron 17 cepas de *Trichoderma*, seleccionadas inicialmente por su capacidad de inhibir el crecimiento en más de un 50% a 4 hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*, por la vía de metabolitos difusibles (García-Sánchez, 2019), y *T. atroviride* IMI206040 como cepa de referencia. Los antibióticos empleados para las pruebas de sensibilidad fueron higromicina-B, nourseotricina (ambas GoldBio) y el herbicida-fungicida glufosinato de amonio (Finale-BAYER). La finalidad de realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria con 3 antifúngicos, es por que son usados como marcadores de selección de cepas transformadas genéticamente, además de que en el LAMIMO se tienen los plásmidos que confieren resistencia a cada uno de ellos. Por otro lado, utilizar las cepas silvestres más sensibles representa utilizar menos antibióticos durante la transformación, reduciendo el impacto económico, algo que se debe tomar en cuenta al momento de realizar un proyecto de investigación.

Se utilizó medio de cultivo papa-dextrosa-agar (MCD-Lab) al 3.9 %, una vez esterilizado en autoclave durante 15 min a 121 °C y 15 psi y, se agregaron por separado concentraciones ascendentes de higromicina-B (0, 25, 50, 100 y 200 µg ml⁻¹ de medio), nourseotricina (NTC) (0, 25, 50 y 100 µg ml⁻¹ de medio) y glufosinato de amonio (Finale) (0, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg ml⁻¹ de medio), después se agitó lentamente cada frasco conteniendo el medio y su respectivo antibiótico para posteriormente vertirse en cajas de Petri. Una vez solidificados los medios de cultivo se inocularon con 5 µl de una suspensión de esporas, con una concentración de 1 x 10⁶ esporas ml⁻¹, en el centro de la caja. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 27 °C en luz constante en un incubador Thermo Scientific Precision-818, transcurrido este tiempo se tomaron fotografías para documentar la sensibilidad de las cepas a los antibióticos probados.

6.6.2 Producción de protoplastos de cepas sensibles

Derivado de los resultados de las pruebas de concentración mínima inhibitoria se seleccionaron 6 cepas silvestres nativas del estado de Querétaro para llevar a cabo

las reacciones de producción de protoplastos y su posterior transformación con el gen reportero *gfp*.

Para la producción de micelio, se sembraron 1×10^6 esporas ml^{-1} de medio de cultivo líquido GEYEC: (glucosa al 1.5 %, extracto de levadura al 0.30 %, hidrolizado de caseína al 0.5 %), se incubaron en un agitador orbital Wisecube WIS-20R durante 18 h a 27 °C y 160 rpm, el tiempo necesario hasta llegar a la obtención de micelio joven (germínulas), éste se colectó por filtración a través de un embudo con un cono de magitel estéril, y se lavó con 50 ml de agua destilada estéril, se recuperó el micelio con una espátula metálica y se pesaron 0.17 g de micelio en condiciones asépticas, el micelio se colocó en un tubo plástico estéril de 50 ml con 7 ml de solución osmótica: (50 mM de CaCl_2 , 0.5 mM de manitol, 50 mM de buffer MES, pH 5.5), se agregó 0.1 g de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* Sigma-Aldrich para degradar la pared celular de las hifas. Posteriormente se mezcló en vortex Genie2-560 durante 30 segundos, se incubaron en un agitador de balanceo CScientific CVP-9550 a 160 rpm, durante 3 horas aproximadamente, durante este tiempo se tomaron muestras en condiciones de campana de flujo laminar para observar la formación y desprendimiento de los protoplastos en un microscopio compuesto, cuando se observaron cepas con protoplastos liberados del micelio se detuvo el tiempo de incubación. Los protoplastos se recuperaron pasando la solución a través de filtros Miracloth y colectándolos en tubos cónicos de plástico de 50 ml, para finalmente, distribuir la suspensión de protoplastos en tubos plásticos de 1.5 ml y se centrifugaron a 4 °C y 8000 rpm por 10 min en una microcentrifuga PrismR-C2500R. Los protoplastos se resuspendieron en un volumen mínimo de solución osmótica, este volumen se dividió en 4 tubos estériles de 1.5 ml con 240 μl de protoplastos en suspensión para realizar las transformaciones y un control por cepa.

6.6.3 Transformación de las cepas de *Trichoderma* con *gfp*

Para llevar a cabo la transformación de *Trichoderma* se utilizaron las mismas 6 cepas seleccionadas para la producción de protoplastos y la cepa de referencia

IMI602040, aún cuando algunas mostraron muy baja producción de protoplastos. Se utilizaron cuatro plásmidos, pCB1004, pPK2-NTC, pPK2-Bar-eGFP y pUE10-H1:GFP. En la sección siguiente se describen el origen y constitución de los plásmidos. Sin embargo, se señala que se utilizaron cuatro plásmidos, dos plásmidos (pCB1004) y pUE-10:GFP) que portan el marcador de resistencia a higromicina-B ampliamente usado en *Trichoderma* y dos plásmidos con los marcadores de resistencia NTC y a glufosinato de amonio que se expresan bajo secuencias regulatorias (promotor y terminador) de diferentes hongos que no habían sido implementados en *Trichoderma*. El objetivo fue establecer el protocolo de transformación y nuevos marcadores de selección en las cepas silvestres de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro.

La transformación se realizó mezclando 240 µl de protoplastos con 60 µl de solución osmótica conteniendo 10 µg de plásmido, se incubaron durante 20 min en hielo. Se adicionó a la mezcla de transformación, 300 µl de PGE-8000 (polietilenglicol) al 40% estéril y precalentado a 42 °C. El control se realizó agregando 60 µl de solución osmótica a 240 µl de protoplastos, se incubaron 20 min en hielo y se les agregó 300 µl de PGE-8000 (polietilenglicol) al 40% precalentado a 42°C, el control no contiene plásmido. Las mezclas de transformación y el control se incubaron 30 min a temperatura ambiente.

Los tubos 1, 2 y 3 que contenían los plásmidos, se vertieron en top agar (PDB, 1 M sorbitol y agar bacteriológico al 0.7 %) sobre una caja Petri con PDA selectivo (concentraciones de antibiótico variables para cada cepa y plásmido). La mitad del contenido del tubo control, se adicionó en top agar sobre una caja Petri con PDA selectivo para un control negativo y en PDA sin antibiótico como un control positivo de viabilidad de los protoplastos. Posteriormente se incubaron a 26 °C de 4-6 días en luz constante. Las cepas resistentes a los antibióticos fueron seleccionadas durante 3 cultivos monospóricos para obtener cepas homocariontes que portarán un solo genotipo.

6.7 Descripción de los plásmidos empleados en la transformación

Las bacterias de *E. coli* que contenían los plásmidos pPK2-NTC con resistencia al antibiótico NTC y pPK2-Bar-eGFP, con el gen de resistencia al herbicida glufosinato de amonio, empleados para la transformación fueron proporcionadas por el Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero, profesor-investigador de la Universidad de Guanajuato. El plásmido pCB1004 y pUE10:GFP, con resistencia a higromicina-B, se tenía previamente en LAMIMO y fueron construidos por el Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo. A continuación, se muestran en las figuras 3, 4, 5 y 6, el mapa y la descripción de cada uno de los plásmidos utilizados.

6.7.1 Purificación de los plásmidos pPK2-NTC, pPK2-Bar-eGFP, pCB1004 y pUE10:gfp

Para multiplicar y purificar los plásmidos se prepararon matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo líquido LB: cloruro de sodio (NaCl), al 0.5 %, extracto de lavadura 0.5 % y peptona de caseína 1.0 %, más kanamicina GoldBio (50 µg/ml). En cada matraz se inoculó una colonia de *E. coli* que porta el plásmido pPK2-NTC y en otro la cepa que tiene el plásmido pPK2-Bar-eGFP se colocaron en agitación orbital en una incubadora Labnet-I5311-DS, a 37 °C a 180 rpm durante 16 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, la purificación se realizó con el kit QIAGEN Plasmid Midi Kit, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se vertieron los 50 ml de cultivo bacteriano en tubos conicos estériles, para empastillar las células de *E. coli* por centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 6000 xg en una centrifuga Heraeus Megafuge 40R Thermo Scientific. La pastilla bacteriana se resuspendió en 4 ml del buffer P1 (50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNasa A), mezclando en vortex. Para el lisado celular se agregaron 4 ml de buffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS p/v), mezclando por inversión de 4-6 veces e incubando a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 4 ml de buffer P3 (3.0 M acetato de potasio pH 5.5) y se mezcló vigorosamente por inversión 4-6 veces incubando en hielo por 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 20,000 xg por 30 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó en un tubo conico estéril, para volver a centrifugar por 15

min a 20,000 xg a 4 °C. El sobrenadante se recuperó en otro tubo de plástico conico estéril y se agregó a una columna QIAGEN-Tip 100 previamente equilibrada aplicando 4 ml de buffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol v/v, 0.15 Tritón X-100 v/v) pasando a través de la columna por gravedad. El ADN plasmídico se lavó dos veces con 10 ml de buffer QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol v/v). El ADN plasmídico se recuperó por elución con 5 ml de buffer QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris.Cl pH 8.5, 15 % isopropanol v/v). El ADN plasmídico en suspensión se distribuyó en tubos de plástico de 1.5 ml y se les agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, se mezcló y centrifugó inmediatamente a 15,000 xg por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente, se lavó la pastilla de ADN con 300 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 15,000 xg por 10 min. El sobrenadante se decantó y se dejó secar las pastillas por 10 min, después se resuspendieron en 25 µL de agua HPLC. El contenido de cada tubo se concentró en uno solo y se cuantificó el ADN contenido en la suspensión final usando un Nanodrop. La integridad del ADN plasmídico se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio, visualizando las muestras de ADN en un foto-documentador de luz UV-C (GelDoc XR+, Bio-Rad). Los plásmidos pCB1004 y pUE10:*gfp* se tenían purificados y almacenados a -20 °C, por ello no implicó realizar la multiplicación y purificación.

6.7.2 Identificación de cepas transformadas y etiquetadas con *gfp*

Como dos de los plásmidos no poseen el gen *gfp*, pPK2-NTC y pCB1004, la transformación se consideró exitosa, mediante la observación y registro de transformantes resistentes a los antibióticos con capacidad de crecer en medio de cultivo selectivo solo en presencia de los plásmidos y validando el resultado con el control negativo. Las cepas que se transformaron con el plásmido pUE10:*gfp* que poseen el gen que codifica para la proteína verde fluorescente fusionada a la histona H1 para etiquetar nucleos se comprobó su transformación por su capacidad de crecer en medio selectivo y mediante microscopia confocal para detectar los núcleos con emisión de fluorescencia verde.

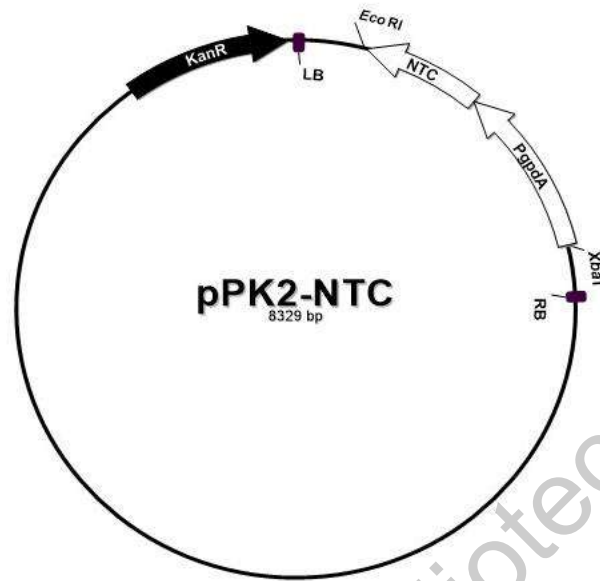


Figura 3. Mapa del plásmido pPK2-NTC. Plásmido de 8329 pb, con un gen de resistencia a kanamicina para *E. coli* y la región codificante de nourseotricina acetil transferasa 1 (NAT1) de *Streptomyces noursei* bajo el control del promotor constitutivo *PgpdA* de *Aspergillus nidulans*.

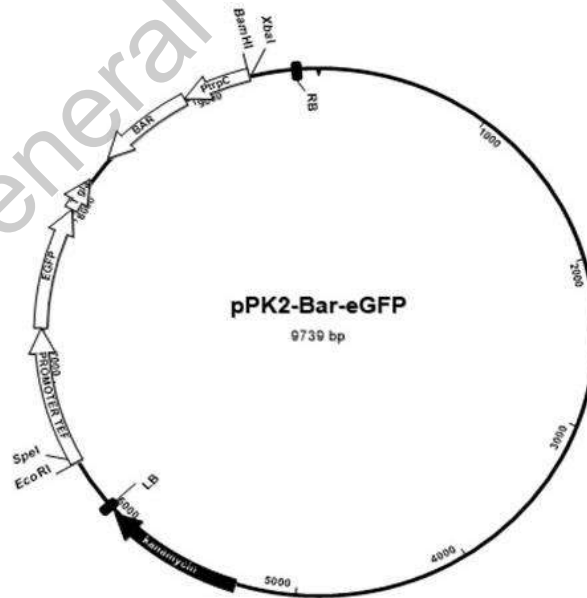


Figura 4. Mapa del plásmido pPK2-Bar-eGFP. Plásmido de 9739 pb y porta la región codificante de la PPT acetil transferasa (gen de resistencia *Bar*) de *S. hygroscopicus* bajo el control del promotor constitutivo *TrpC* de *A. nidulans*. Además, tiene la región codificante

de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor constitutivo TEF de *A. pullulans* y el terminador de la glucoamilasa de *A. awamori*.

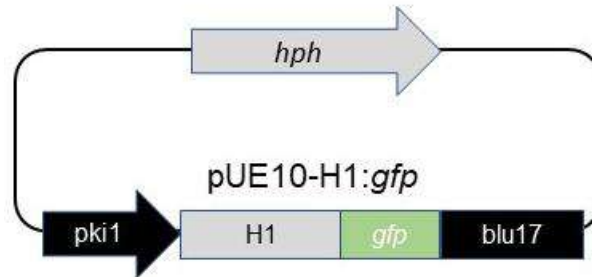


Figura 5. Mapa del plásmido pUE10-H1:gfp. Plásmido de 8.8 kb, porta el gen *hph* de *Escherichia coli* que codifica una fosfotransferasa de higromicina, confiriendo resistencia a este antibiótico. Con un promotor *pki1* de *T. reesei* y el gen *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente fusionado a la histona H1, con un terminador del gen *blu17* de *T. atroviride*.

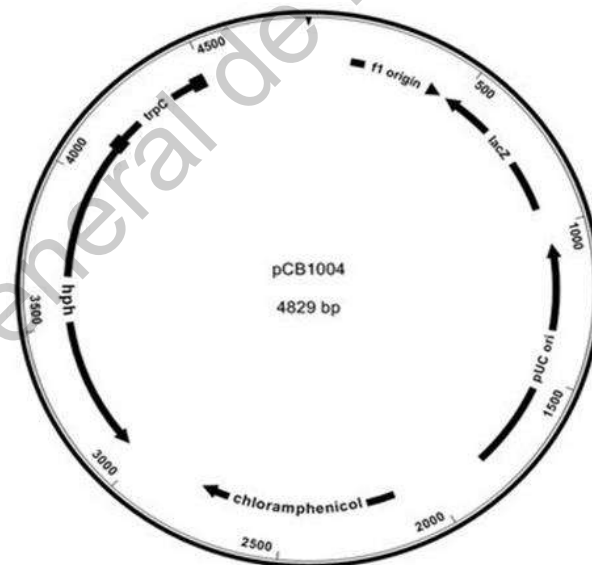


Figura 6. Mapa del plásmido pcB1004. Plásmido con un tamaño de 4829 pb, que porta el gen *hph* de *E. coli* que codifica una fosfotransferasa de higromicina, confiriendo resistencia a este antibiótico. Para usar *hph* como marcador de selección de hongos, la región codificante fue fusionada al promotor constitutivo *trpC* de *A. nidulans*. Para la manipulación del plásmido en *E. coli*, pcB1004 tiene un gen de resistencia a cloranfenicol.

Para comprobar la transformación de las cepas con *gfp* mediante microscopía confocal, se siguió la metodología descrita por Lichius y Zeilinger, (2019) con algunas variaciones, la cual consiste en cultivar la cepa deseada en papa-dextrosa-agar MCD-Lab más marcador de selección (antibiótico) durante 5 días a 27 °C en periodos de 12 h luz / 12 h oscuridad. Para hacer los cultivos experimentales, con un bisturí estéril se cortó un pequeño bloque de agar con micelio de cultivo previo de aproximadamente 3 mm x 3 mm, colocándolo en el centro de una placa de medio selectivo sólido nuevo, y se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente durante 22-24 h para desarrollar colonias de aproximadamente 2 cm de diámetro en PDA.

Una vez desarrollado el micelio se montaron mediante el método de bloque de agar invertido, cortando una pieza de medio de cultivo con micelio, con un bisturí estéril de 1 cm de ancho por 3 cm de largo, en una zona de crecimiento activa, justo entre una parte invadida por el micelio y otra sin invadir, se agregaron 20 µl de medio mínimo líquido y se colocó el bloque de agar en el cubreobjetos de 24 x 60 mm del lado del bloque que contenía el micelio y haciendo contacto con el medio mínimo y el cristal. Se colocaron en incubación durante 30 min a 25 °C en oscuridad para que las hifas se recuperaran del estrés causado por el corte. Otras muestras fueron montadas de la misma manera, pero añadiendo 2 µl del colorante FM 4-64 Sigma-Aldrich, con la finalidad de teñir las membranas y septos de las hifas.

Para detectar la localización de la proteína verde fluorescente en el núcleo fue mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio de escaneo láser confocal invertido FluoView™ FV1000, Olympus Corp. Se tomaron fotografías y videos de hifas y esporas de las cepas etiquetadas, utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros EGFP (excitación 488 nm; emisión 510 nm) y otro de luz transmitida para imágenes en contraste de interferencia diferencial. Se usó el objetivo 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite.

6.7.3 Análisis microscópico de la interacción *Trichoderma*-patógeno

Para analizar la interacción *Trichoderma*-fitopatógeno, se hicieron cultivos duales de los hongos *T. asperellum* H1:*gfp* vs *R. solani*, y la cepa de referencia IMI206040 *T. atroviride* H1:*gfp* vs *R. solani*.

Se cultivaron las cepas marcadas con GFP, en medio de cultivo sólido papa-dextrosa-agar MCD-Lab selectivo y las del fitopatógeno *R. solani* en PDA sin antibióticos durante 5 días a 27 °C en periodos de 12 h luz / 12 h oscuridad. Para hacer los cultivos experimentales, con un bisturí estéril se cortó un pequeño bloque de medio con micelio del cultivo previo de cada hongo, de aproximadamente 3 mm x 3 mm colocándolos en una misma caja de medio de cultivo PDA de lados opuestos. Posteriormente se incubaron durante 18 a 20 h a 25 °C en oscuridad. Cuando las hifas de los hongos estaban a 2 mm de encontrarse se realizaron cortes de la zona de confrontamiento mediante la técnica de bloques de agar invertidos, se agregaron 20 µl de medio mínimo líquido y se colocó el bloque de agar en el cubreobjetos de 24 x 60 mm del lado del bloque que contenía el micelio de ambos hongos, haciendo contacto con el medio mínimo y el cristal. Se colocaron en incubación durante 30 min a 25 °C en oscuridad para que las hifas se recuperaran del estrés causado por el corte. Para observar la interacción de los hongos se realizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio de escaneo láser confocal invertido FluoView™ FV1000, Olympus Corp, utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros EGFP (excitación 488 nm; emisión 510 nm) y otro de luz transmitida para imágenes en contraste de interferencia diferencial. Se usó el objetivo 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite. Se tomaron fotografías y videos de hifas creciendo en tiempo real. Esta sección de interacción y microscopía, se realizó durante una estancia de investigación en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), con el apoyo y asesoría de la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez y el Dr. Diego Luis Delgado Álvarez.

VII. RESULTADOS

7.1 Efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos

7.1.1 Antagonismo *in vitro* por micoparasitismo.

Una de las técnicas diseñadas para medir el efecto micoparasítico de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos, fue elaborada por Bell *et al.* (1982), que clasifica la actividad micoparasítica por la capacidad de sobrecrecimiento de un hongo sobre otro, de acuerdo a ese comportamiento se clasifican en clases de I al V. Durante este proceso *Trichoderma* secreta enzimas líticas que degradan la pared celular de los hospederos, para alimentarse de ellos inhibiendo su crecimiento y/o causándoles la muerte (Kubicek *et al.* 2001).

En el presente trabajo, las 65 cepas de *Trichoderma* confrontadas *in vitro* contra siete fitopatógenos de plantas de tomate, mostraron diferentes grados de micoparasitismo. En términos generales, los siete fitopatógenos son susceptibles de micoparasitismo por las cepas nativas del estado de Querétaro, el hongo *S. rolfsii* fue el único que presentó las 5 clases de interacciones micoparasíticas de acuerdo a la escala de Bell y por ende el hongo más difícil de ser micoparasitado por un mayor número de cepas de *Trichoderma*. Las cepas de *Trichoderma* micoparasitaron a los hongos *A. alternata*, *B. cinerea* y *P. capsici*, en clases I y II de la escala de Bell, y solo *A. alternata* presentó una cepa de clase III, es decir, intermedia. Sin embargo, el mayor porcentaje corresponde a las escalas más agresivas de micoparasitismo, excelentes (I) y buenas (II), mostrando una alta capacidad de sobrecrecer y suprimir el desarrollo de estos hongos. Por otro lado, el micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* contra los hongos *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* y *R. solani*, se dio en tres clases: I, II y III de la escala de Bell mostrando que las 65 cepas de *Trichoderma* probadas pueden micoparasitar a estos hongos de manera considerable. A continuación, en la Figura 7, se muestra

el comportamiento micoparasítico de las cepas contra los siete fitopatógenos, agrupandas en porcentaje de acuerdo a su capacidad micoparasítica.

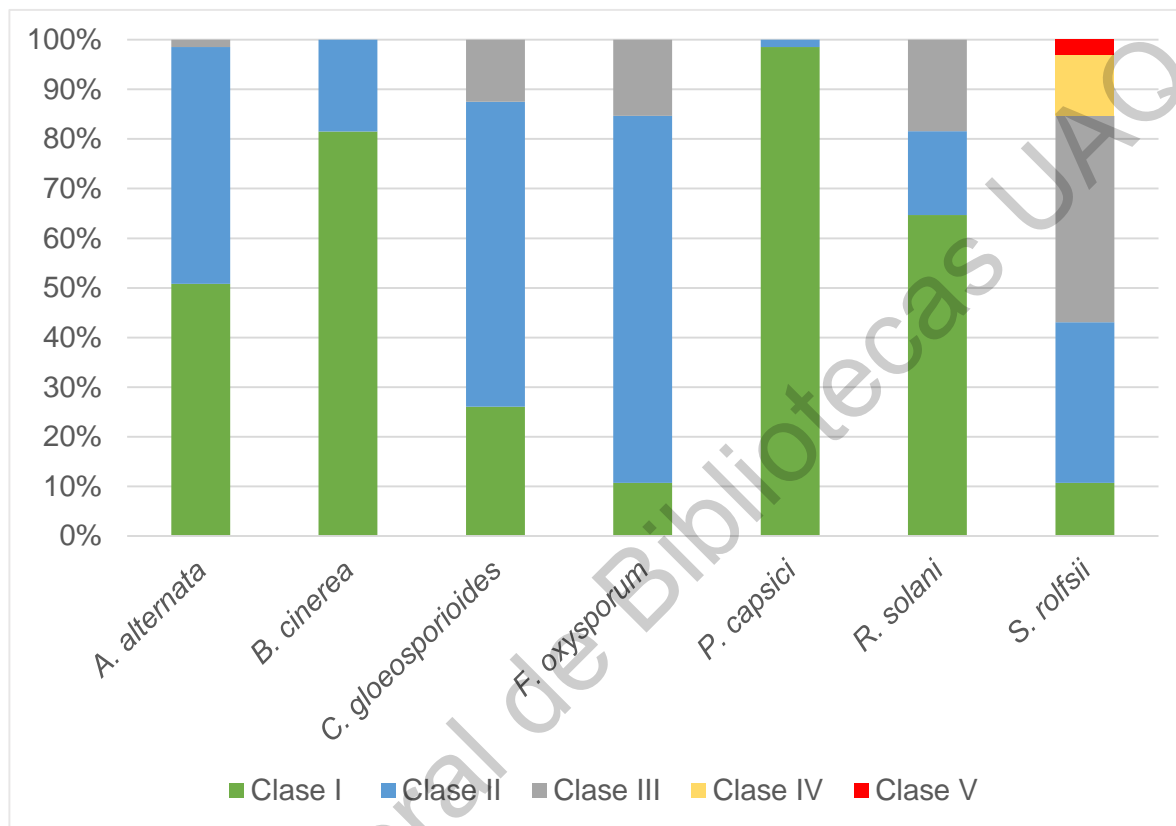


Figura 7. Porcentaje de cepas de *Trichoderma* clasificadas por su actividad micoparasítica contra siete hongos fitopatógenos. El código de colores ubica en las barras el número de cepas expresado en porcentaje relacionado con su clasificación en la escala de Bell. En verde se representa la clase en I: excelentes, clase II en azul: buenas, clase III en gris: intermedia, clase IV en naranja: poca actividad y en rojo la clase V, como nula actividad micoparasítica.

Para localizar las cepas de clase I (excelentes) micoparasitando al mayor número de fitopatógenos, es decir las de mayor espectro de acción, se realizó una comparación de listas con las cepas más agresivas de cada uno de los fitopatógenos, en dos secciones, en la primera que se compararon las cepas presentes con los cinco fitopatógenos *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *R. solani* y *S. rolfsii*, el resultado del análisis arrojó un diagrama de Venn (Figura 8-A) con

varios subconjuntos, entre ellos, un subconjunto central que contiene dos cepas presentes antagonizando a los cinco fitopatógenos que representan las cepas de mayor capacidad micoparasítica y un mayor espectro de acción contra diferentes hongos de manera agresiva, las cepas corresponden a *T. atroviride* MB1 y *Trichoderma* sp. AJUM2. Además, se observa un subconjunto de nueve cepas micoparasitando a *P. capsici*, otro de 15 afectando a *B. cinerea* y *P. capsici*, y otro subconjunto de 20 cepas que micoparasitan a *A. alternata*, *B. cinerea* y *P. capsici*, localizándose el mayor número de cepas micoparasitando los citados fitopatógenos. La segunda sección de comparación de listas se hizo para detectar las cepas de *Trichoderma* presentes como excelentes micoparasitas de los hongos *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, el resultado del análisis arrojó un diagrama de Venn (Figura 8-B) con 3 subconjuntos, sin embargo, el subconjunto central mostró seis cepas excelentes micoparasíticas. Estas cepas son: *Trichoderma* sp. TEH4, *Trichoderma* sp. AJUM2, *Trichoderma* sp. TEM1, MLP2 *T. atroviride*, *T. atroviride* TEH1 y *T. koningiopsis* RE-11.

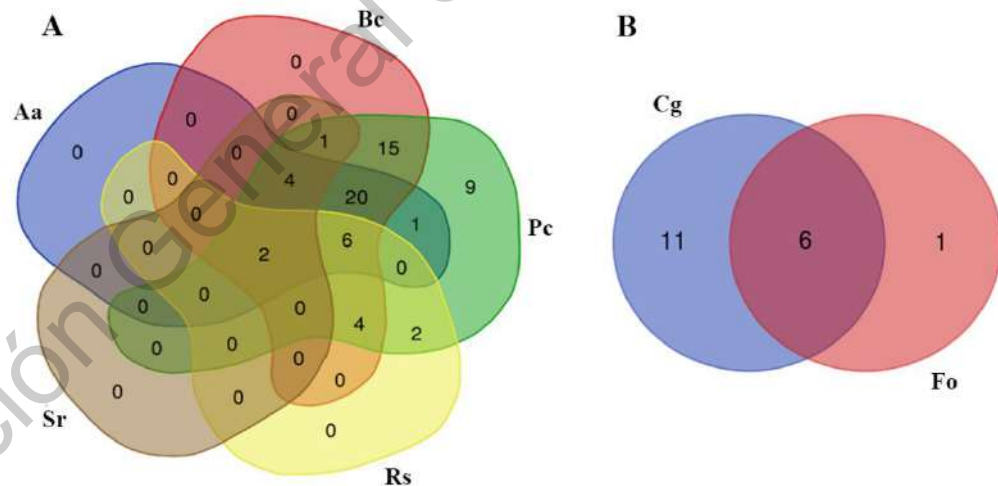


Figura 8. Cepas de *Trichoderma* presentes como excelentes micoparasíticas para siete fitopatógenos. A-B, Las cepas de *Trichoderma* que mostraron excelente capacidad micoparasítica, correspondiente a la escala I de Bell, fueron comparadas contra *A. alternata* (Aa), *B. cinerea* (Bc), *P. capsici* (Pc), *R. solani* (Rs), *S. rolfsii* (Sr),

C. gloeosporioides (Cg) y *F. oxysporum* (Fo). Se realizaron dos análisis comparativos por limitaciones del programa.

7.1.2 Antagonismo *in vitro* por compuestos volátiles

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos de manera específica, en el caso de *A. alternata*, 38 de las 65 cepas de *Trichoderma* probadas, son capaces de inhibir el crecimiento con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Tabla 5 y Figura 9), el hongo *B. cinerea*, es inhibido por los compuestos volátiles de 53 cepas *Trichoderma* con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Tabla 6 y Figura 10). Los hongos, *C. gloeosporioides* (Tabla 7 y Figura 11) y *F. oxysporum* (Tabla 8 y Figura 12) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) comparadas con el crecimiento micelial del control, además, se presentaron casos de estimulación de crecimiento del fitopatógeno. Respecto al fitopatógeno *P. capsici* (Tabla 9 y Figura 13) y *R. solani* (Tabla 10 y Figura 14) fueron inhibidos con diferencias estadísticas significativas con respecto al control por el mismo número de cepas, 23 en total con actividad fungistática.

El hongo *S. rolfsii* (Tabla 11 y Figura 15) fue inhibido por 16 cepas con diferencias estadísticas significativas con respecto al control, sin embargo, 15 cepas tuvieron efecto de estimulación de crecimiento. Debido al número de cepas empleadas en los experimentos, 65 de *Trichoderma* y 7 fitopatógenos, la comparación múltiple de Tukey por pares resulta extensa, y no se describen las agrupaciones entre cepas, se pueden consultar los detalles en las Tablas 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, los grupos que no comparten una letra en común poseen una diferencia media que es estadísticamente significativa. En el caso de las Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, que representan los datos de manera gráfica, es decir el diámetro de la colonia en centímetros, se enfatiza que las barras más pequeñas representan las colonias más afectadas y, por ende, corresponden a las cepas de *Trichoderma* de mayor interés antagónico.

Tabla 4. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. alternata*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%							Diámetro	% de inhibición
CTRL	A							5.38	0.00%
RE-21	A	B						4.67	13.25%
GAM1	A	B	C					4.33	19.60%
CHQ3	A	B		D				4.26	20.94%
TSJ7	A	B		D	E			4.22	21.58%
AJUM2	A	B		D	E			4.12	23.54%
CHQ1	A	B		D	E	F		4.08	24.28%
GY2	A	B		D	E	F		4.04	24.94%
TSJ9	A	B		D	E	F	G	4.00	25.77%
TSR1-5	A	B		D	E	F	G	3.90	27.54%
CHM1	A	B		D	E	F	G	3.85	28.57%
MUM5	A	B		D	E	F	G	3.80	29.44%
TC2	A	B		D	E	F	G	3.76	30.21%
TEH4	A	B		D	E	F	G	3.73	30.65%
TQ2	A	B		D	E	F	G	3.73	30.68%
TSR1-6	A	B		D	E	F	G	3.70	31.29%
TSR1-2	A	B		D	E	F	G	3.67	31.81%
TSR1-7	A	B		D	E	F	G	3.66	32.03%
TSJ6	A	B		D	E	F	G	3.63	32.48%
TEH1	A	B		D	E	F	G	3.63	32.58%
MB3	A	B		D	E	F	G	3.61	32.94%
NI3	A	B		D	E	F	G	3.61	32.95%
TEH5	A	B		D	E	F	G	3.59	33.22%
CM1	A	B		D	E	F	G	3.59	33.23%
TQ1	A	B		D	E	F	G	3.59	33.36%
TEH3	A	B		D	E	F	G	3.49	35.09%
TEH7	A	B		D	E	F	G	3.47	35.56%
LGMIC	A	B		D	E	F	G	3.44	36.03%
TSJ5		B		D	E	F	G	3.43	36.30%
TQ4		B		D	E	F	G	3.39	36.96%
MLP3		B		D	E	F	G	3.37	37.37%
T2-1		B		D	E	F	G	3.35	37.72%
RE-13.1		B		D	E	F	G	3.33	38.06%
SM3-1		B		D	E	F	G	3.33	38.19%
TC7		B		D	E	F	G	3.31	38.53%
GY1		B		D	E	F	G	3.29	38.85%
TEM1		B		D	E	F	G	3.25	39.64%
TSJ15		B		D	E	F	G	3.24	39.85%
GM1		B		D	E	F	G	3.22	40.13%
TSJ8		B		D	E	F	G	3.15	41.47%
TM9		B		D	E	F	G	3.13	41.93%
MB1		B		D	E	F	G	3.11	42.23%
AD3		B		D	E	F	G	3.06	43.16%
AJUM1		B		D	E	F	G	3.05	43.28%
*028		B		D	E	F	G	3.03	43.63%
TRT3		B		D	E	F	G	3.01	44.05%
RE-12.1		B		D	E	F	G	2.97	44.85%
NI-1		B		D	E	F	G	2.95	45.28%
RE-13		B		D	E	F	G	2.87	46.68%
AJUM3		B		D	E	F	G	2.85	46.97%
RE-15		B		D	E	F	G	2.77	48.52%
RE-09		B		D	E	F	G	2.76	48.73%
T1-1				D	E	F	G	2.71	49.61%
RE-07				D	E	F	G	2.64	50.96%
RE-04				D	E	F	G	2.60	51.74%
TTX2				D	E	F	G	2.57	52.22%
RE-20				D	E	F	G	2.48	53.88%
RE-01				D	E	F	G	2.47	54.08%
MLP2			C	D	E	F	G	2.44	54.65%
RE-05				D	E	F	G	2.42	55.00%
AJUM6				D	E	F	G	2.36	56.10%
SV4				D	E	F	G	2.32	56.95%
TQ3				D	E	F	G	2.29	57.46%
RE-11					E	F	G	2.16	59.85%
TSJ14						F	G	2.06	61.76%
SV2M3							H	1.73	67.89%

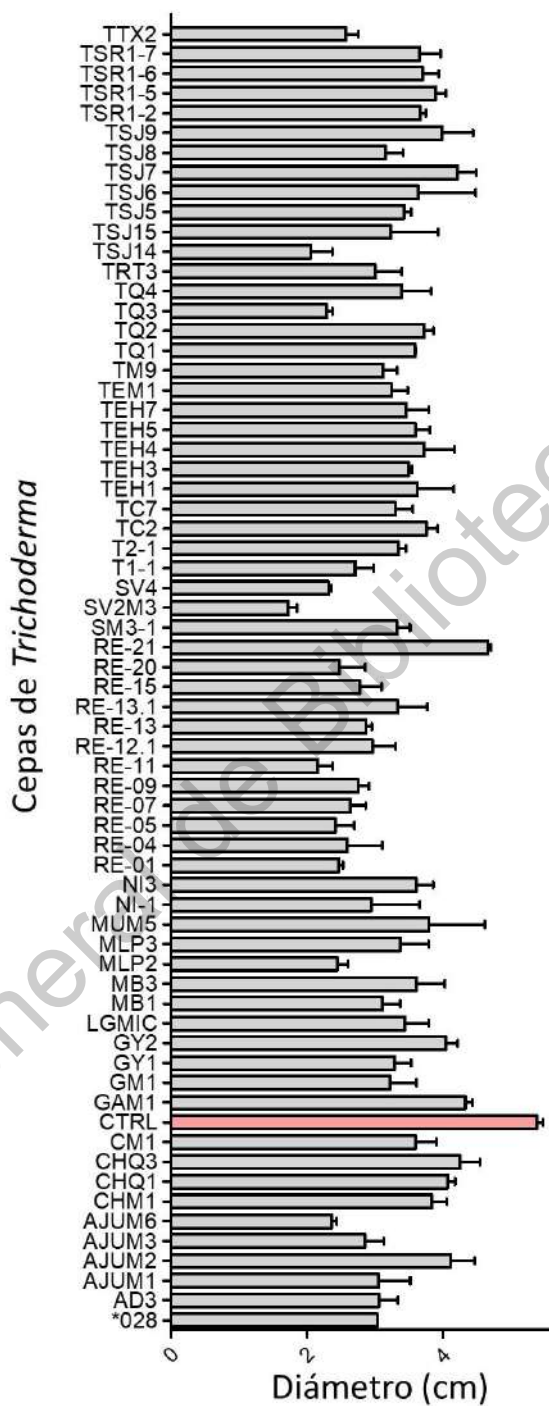


Figura 9. Diámetro del crecimiento micelial de *A. alternata* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. La barra color rosa muestra el diámetro de la colonia control y en el resto, en gris, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

Tabla 5. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *B. cinerea*.

Cepa	Agrupamiento de Tukery al 0.05 %							Diámetro	% de inhibición
CHQ1	A							8.60	-124.83%
MB1	A							8.50	-124.33%
CTRL		B						3.78	0.00%
TSR1-6		B	C					2.75	27.29%
TEH7		B		D				2.53	33.16%
TSJ8		B		D	E			2.51	33.70%
TSJ5		B		D				2.49	34.09%
TC2		B		D		F		2.46	34.81%
T2-1		B		D		F		2.44	35.44%
TEH4		B		D		F	G	2.40	36.65%
TSR1-7		B		D		F	H	2.35	37.97%
RE-15		B		D		F	I	2.32	38.70%
TEM1		B		D		F		2.26	40.13%
TTX2				D		F		2.19	42.14%
SM3-1				D		F		2.17	42.51%
SV4				D		F		2.17	42.66%
RE-05				D		F		2.14	43.46%
TSR1-2				D		F		2.13	43.69%
TEH5				D		F		2.12	43.90%
RE-07				D		F		2.10	44.35%
RE-09				D		F		2.10	44.54%
RE-11				D		F		2.07	45.12%
TSJ6				D		F		2.06	45.52%
TSJ15				D		F		2.00	47.03%
TSJ14				D		F		1.94	48.80%
RE-13				D		F		1.91	49.37%
TRT3				D		F		1.90	49.87%
AD3				D		F		1.88	50.25%
GM1				D		F		1.86	50.90%
CHQ3				D		F		1.85	51.07%
TEH1				D		F		1.84	51.29%
TSJ9				D		F		1.82	51.91%
RE-12.1				D		F		1.81	52.07%
T1-1				D		F		1.80	52.45%
GY2				D		F		1.76	53.46%
CHM1				D		F		1.75	53.61%
RE-13.1				D		F		1.75	53.63%
TQ1				D		F		1.72	54.55%
TC7				D		F		1.68	55.47%
MB3				D		F		1.66	56.16%
RE-21				D		F		1.64	56.72%
TQ4				D		F		1.62	57.22%
RE-20				D		F		1.60	57.77%
MLP2				D		F		1.59	57.94%
AJUM6				D		F		1.59	57.96%
TM9				D		F		1.57	58.46%
AJUM1				D		F		1.54	59.32%
TQ2				D		F		1.53	59.51%
TSR1-5				D		F		1.52	59.69%
MUM5				D		F		1.51	60.09%
*028				D		F		1.42	62.50%
TSJ7				D		F		1.41	62.72%
NI-1				D		F		1.40	62.96%
GY1				D		F		1.38	63.62%
GAM1				D		F		1.30	65.54%
RE-01			C	D		F		1.28	66.06%
LGMIC				D		F		1.21	68.12%
TEH3				D		F		1.18	68.74%
AJUM3				D		F		1.15	69.51%
CM1				D		F		1.13	70.21%
RE-04				D		F		1.11	70.68%
MLP3					E	F		0.99	73.88%
TQ3						F		0.95	74.90%
SV2M3						F	G	0.87	76.87%
AJUM2							H	0.85	77.62%
NI-3							I	0.80	78.93%

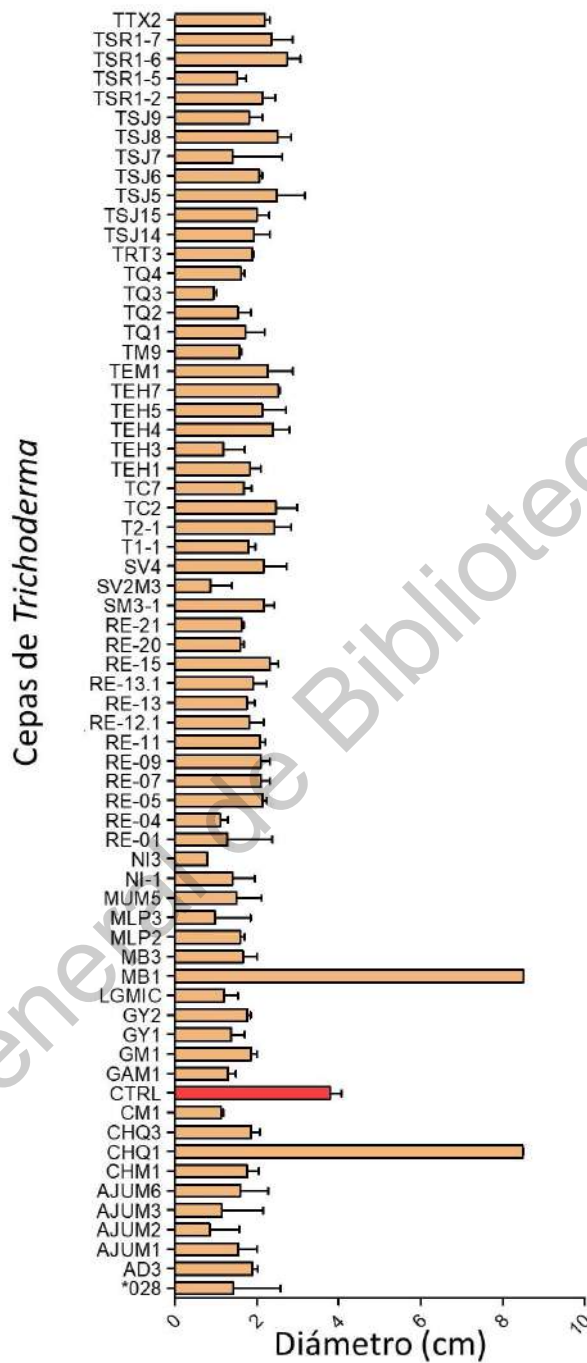


Figura 10. Diámetro del crecimiento micelial de *B. cinerea* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. La barra color rojo claro, muestra el diámetro de la colonia control y en el resto en color salmon, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

Tabla 6. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%	Diámetro	% de inhibición
RE-13	A	5.08	-6.16%
TSJ8	A	5.03	-5.04%
CM1	A	4.84	-1.02%
CTRL	A	4.79	0.00%
MLP2	A	4.79	0.03%
TSR1-5	A	4.72	1.36%
MUM5	A	4.64	3.03%
CHQ1	A	4.59	4.22%
TSR1-6	A	4.53	5.44%
LGMIC	A	4.45	7.01%
AJUM6	A	4.45	7.15%
AJUM3	A	4.39	8.24%
TSJ7	A	4.38	8.48%
TSJ9	A	4.36	8.86%
RE-05	A	4.35	9.16%
AD3	A	4.33	9.50%
GAM1	A	4.30	10.13%
GY2	A	4.28	10.69%
CHM1	A	4.08	14.81%
GM1	A	4.07	14.91%
RE-11	A	4.07	15.03%
TEH4	A	4.04	15.57%
AJUM2	A	4.04	15.71%
RE-20	A	3.96	17.36%
SV4	A	3.95	17.56%
RE-21	A	3.94	17.69%
TC2	A	3.94	17.71%
CHQ3	A	3.94	17.80%
TEH1	A	3.93	17.93%
RE-07	A	3.92	18.02%
MLP3	A	3.92	18.10%
TTX2	A	3.90	18.45%
TEH3	A	3.90	18.48%
TSR1-7	A	3.90	18.49%
TSJ15	A	3.90	18.60%
RE-15	A	3.89	18.68%
SM3-1	A	3.89	18.72%
NI3	A	3.85	19.68%
AJUM1	A	3.84	19.75%
SV2M3	A	3.83	19.99%
TC7	A	3.83	20.07%
RE-09	A	3.81	20.33%
MB1	A	3.74	21.79%
TSJ14	A	3.74	21.88%
TQ4	A	3.73	21.99%
NI-1	A	3.72	22.34%
MB3	A	3.68	23.19%
TQ3	A	3.67	23.38%
TRT3	A	3.67	23.41%
TQ1	A	3.66	23.65%
RE-13.1	A	3.65	23.85%
*028	A	3.60	24.77%
TM9	A	3.59	24.93%
RE-12.1	A	3.57	25.39%
TSR1-2	A	3.56	25.66%
RE-04	A	3.56	25.69%
GY1	A	3.52	26.55%
T2-1	A	3.41	28.69%
RE-01	A	3.40	29.03%
TEH5	A	3.36	29.81%
T1-1	A	3.30	31.02%
TSJ5	A	3.26	31.92%
TSJ6	A	3.24	32.37%
TEH7	A	3.12	34.93%
TEM1	A	3.07	35.81%
TQ2	A	2.98	37.83%

Cepas de *Trichoderma*

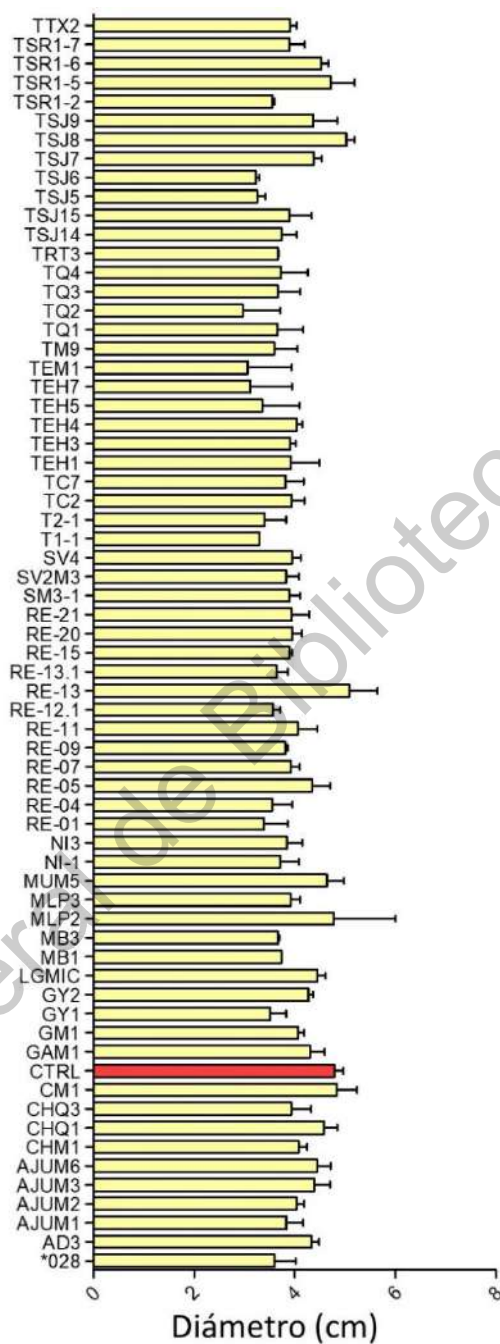


Figura 11. Diámetro del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. La barra color rojo claro, muestra el diámetro de la colonia control y en el resto en amarillo, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

Tabla 7. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *F. oxysporum*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%	Diámetro	% de inhibición
TSJ8	A	4.89	-10.52%
TSJ6	A	4.77	-7.99%
TC7	A	4.66	-5.49%
RE-21	A	4.64	-4.96%
RE-13	A	4.54	-2.70%
LGMIC	A	4.52	-2.28%
TSJ15	A	4.52	-2.20%
MUM5	A	4.50	-1.82%
SM3-1	A	4.50	-1.74%
RE-20	A	4.46	-0.86%
TSJ9	A	4.43	-0.29%
CTRL	A	4.42	0.00%
SV4	A	4.41	0.33%
CM1	A	4.40	0.47%
TSJ7	A	4.38	0.87%
TSR1-5	A	4.38	0.98%
AJUM6	A	4.34	1.79%
TSR1-2	A	4.34	1.87%
GAM1	A	4.19	5.22%
AJUM3	A	4.16	5.99%
RE-13.1	A	4.14	6.28%
TC2	A	4.10	7.31%
CHQ3	A	4.08	7.75%
RE-11	A	4.05	8.36%
T1-1	A	4.02	9.08%
TQ3	A	4.02	9.16%
TSR1-6	A	4.01	9.25%
NI3	A	4.01	9.29%
TEH7	A	4.00	9.63%
RE-15	A	3.99	9.67%
TQ4	A	3.99	9.78%
TEH5	A	3.99	9.81%
TQ1	A	3.98	9.97%
GM1	A	3.98	10.06%
MLP2	A	3.94	10.96%
RE-04	A	3.93	11.01%
RE-09	A	3.91	11.57%
RE-07	A	3.89	11.96%
TEH4	A	3.89	12.06%
TM9	A	3.88	12.31%
TSR1-7	A	3.86	12.70%
GY1	A	3.82	13.71%
TSJ14	A	3.80	14.05%
GY2	A	3.79	14.18%
RE-05	A	3.78	14.43%
RE-12.1	A	3.77	14.69%
NI-1	A	3.77	14.69%
MB1	A	3.74	15.45%
TEM1	A	3.71	16.06%
AD3	A	3.70	16.43%
CHQ1	A	3.66	17.29%
AJUM2	A	3.65	17.39%
MLP3	A	3.63	17.81%
TEH3	A	3.62	18.22%
T2-1	A	3.61	18.27%
CHM1	A	3.60	18.58%
MB3	A	3.51	20.54%
RE-01	A	3.51	20.57%
TEH1	A	3.48	21.25%
SVZM3	A	3.47	21.49%
TQ2	A	3.47	22.56%
*028	A	3.42	22.72%
AJUM1	A	3.42	23.12%
TTX2	A	3.40	23.22%
TSJ5	A	3.39	24.25%
TRT3	A	3.34	24.49%

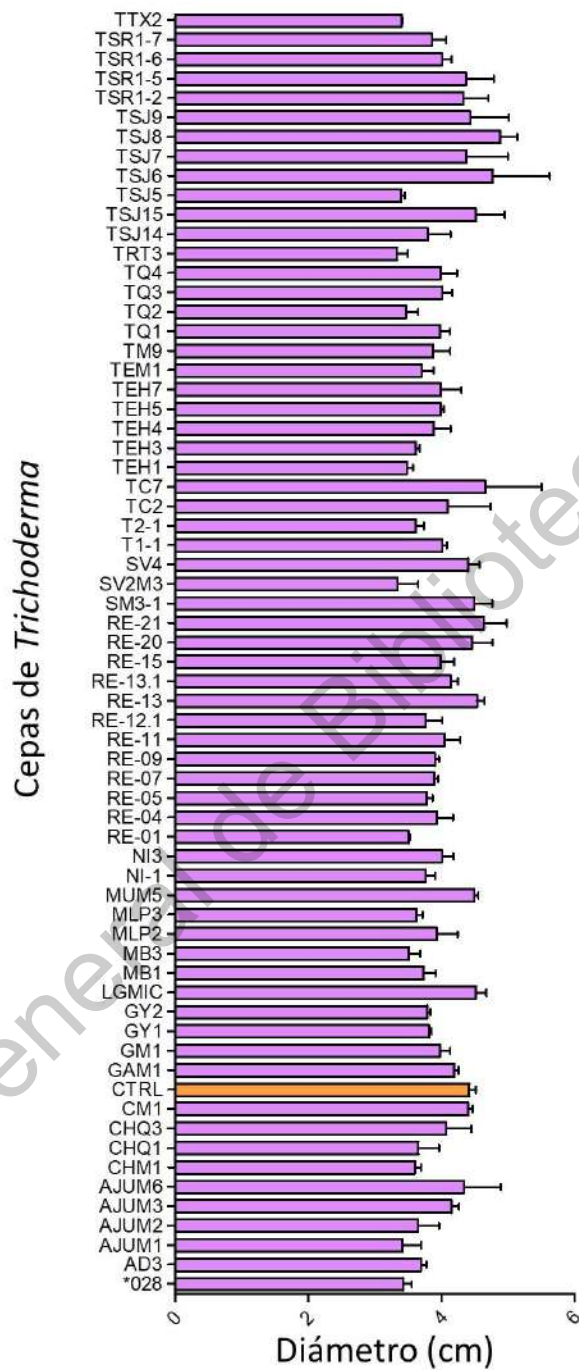


Figura 12. Diámetro del crecimiento micelial de *F. oxysporum* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. La barra color naranja, muestra el diámetro de la colonia control y en el resto en morado, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

Tabla 8. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *P. capsici*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.0%										Diámetro	% de inhibición
CTRL	A										5.60	0.00%
RE-04	A	B									5.29	5.62%
TC2	A	B	C								5.01	10.48%
TC7	A	B	C								4.97	11.31%
MUM5	A	B	C								4.97	11.34%
CM1	A	B	C	D							4.81	14.11%
AJUM3	A	B	C	D							4.77	14.78%
AJUM2	A	B	C	D							4.74	15.43%
TSJ15	A	B	C	D							4.71	15.90%
TSJ8	A	B	C	D	E						4.69	16.27%
TSJ7	A	B	C	D	E						4.67	16.62%
RE-07	A	B	C	D	E						4.66	16.88%
TQ4	A	B	C	D	E						4.63	17.41%
TSR1-2	A	B	C	D	E	F					4.55	18.69%
TQ3	A	B	C	D	E	F					4.51	19.48%
GAM1	A	B	C	D	E	F	G				4.43	20.94%
*028	A	B	C	D	E	F	G				4.42	21.06%
SV2M3	A	B	C	D	E	F	G				4.38	21.72%
RE-20	A	B	C	D	E	F	G	H			4.32	22.85%
RE-11	A	B	C	D	E	F	G	H	I		4.26	24.00%
LGMIC	A	B	C	D	E	F	G	H	I		4.23	24.94%
MLP2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.20	25.53%
TTX2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.17	26.50%
CHQ3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.12	27.73%
RE-09	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.05	27.86%
T2-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.04	29.99%
TQ2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.92	32.34%
TSJ9	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.79	32.44%
TSR1-5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.78	33.02%
GY1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.75	33.62%
RE-21	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.72	36.14%
RE-13	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.58	36.52%
RE-05	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.56	36.70%
RE-12.1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.55	36.98%
T1-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.53	37.25%
MB3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.51	37.33%
RE-01	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.51	37.59%
TSJ5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.50	41.80%
TM9	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.26	41.90%
CHQ1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.25	42.00%
TRT3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.25	42.08%
TEH1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.24	42.70%
TEH3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.21	44.93%
TQ1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.08	44.94%
TSJ6	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.08	46.05%
TSR1-7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.02	46.39%
GM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.00	47.87%
AJUM6	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.95	48.05%
GY2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.91	49.07%
SV4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.85	49.15%
MLP3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.85	50.65%
TSJ14	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.76	51.58%
TEH7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.71	53.67%
NI3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.59	53.99%
AD3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.58	54.14%
TEH4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.57	54.47%
SM3-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.55	58.39%
TEM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.33	58.69%
TSR1-6	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.31	61.00%
RE-15	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.18	62.47%
MB1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.10	63.30%
AJUM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.06	63.67%
CHM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	1.97	64.79%
RE-13.1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	1.88	66.52%
TEH5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	1.81	67.65%
NI-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	1.72	69.36%

Cepas de *Trichoderma*

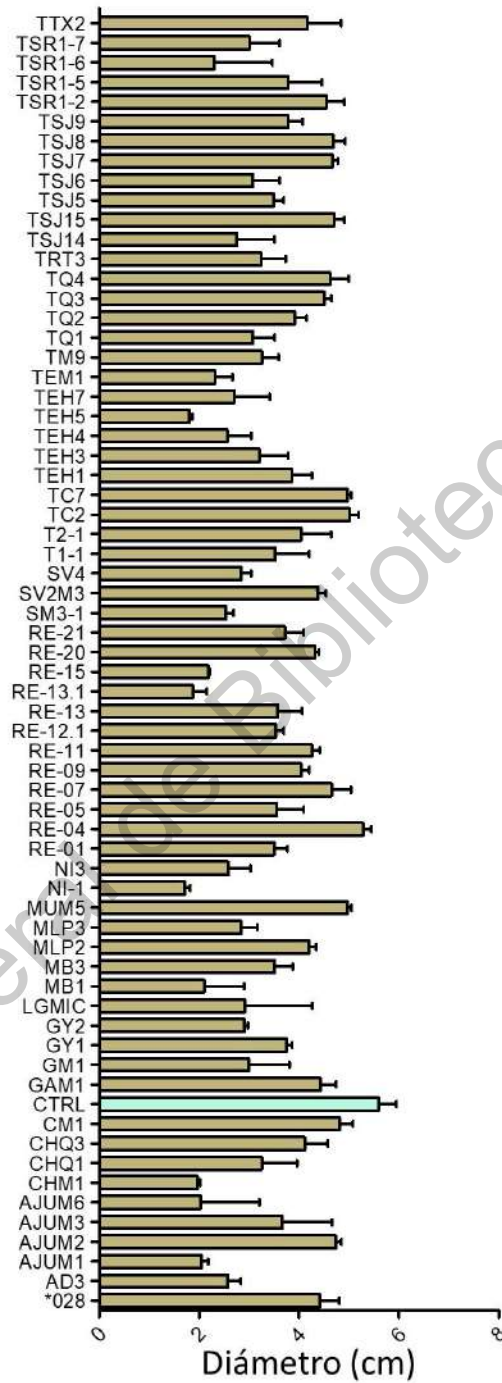


Figura 13. Diámetro del crecimiento micelial de *P. capsici* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. La barra color azul claro, muestra el diámetro de la colonia control y en el resto en café claro, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

Tabla 9. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *R. solani*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%	Diámetro	% de inhibición
TSJ15	A	8.46	-2.58%
TSJ8	A	8.42	-2.07%
TSR1-7	A	8.41	-1.92%
RE-21	A	8.27	-0.24%
CTRL	A	8.25	0.00%
MUM5	A	8.18	0.88%
TSJ14	A	8.09	1.94%
TSJ9	A	8.01	2.17%
AJUM6	A	8.00	2.88%
TSJ7	A	7.96	3.05%
RE-15	A	7.92	3.52%
RE-11	A	7.85	4.05%
CM1	A	7.84	4.88%
TEH5	A	7.82	5.01%
TTX2	A	7.77	5.24%
TSR1-5	A	7.75	5.82%
LGMIC	A	7.59	6.06%
TEH4	A	7.57	8.07%
MB1	A	7.53	8.24%
NI3	A	7.50	8.72%
TM9	A	7.48	9.06%
TC2	A	7.46	9.32%
RE-13.1	A	7.45	9.64%
AJUM3	A	7.38	9.73%
T1-1	A	7.36	10.58%
RE-05	A	7.36	10.76%
RE-01	A	7.32	10.79%
RE-07	A	7.30	11.24%
TSR1-2	A	7.23	11.51%
TQ1	A	7.23	12.34%
RE-04	A	7.18	12.42%
TEH3	A	7.15	12.43%
RE-20	A	7.11	12.94%
AJUM2	A	7.03	13.39%
AJUM1	A	7.02	13.88%
CHQ3	A	7.02	14.87%
TEH1	A	7.00	14.90%
GAM1	A	6.99	14.97%
CHM1	A	6.99	15.12%
RE-13	A	6.94	15.33%
TRT3	A	6.94	15.89%
GM1	A	6.92	15.95%
MB3	A	6.91	16.24%
TSJ5	A	6.89	16.52%
TQ4	A	6.88	16.61%
CHQ1	A	6.86	16.82%
TEM1	A	6.84	17.15%
MLP3	A	6.80	17.54%
TSJ6	A	6.61	19.94%
RE-12.1	A	6.58	20.28%
TEH7	A	6.46	21.68%
MLP2	A	6.41	22.27%
GY1	A	6.39	22.68%
TSR1-6	A	6.38	26.35%
GY2	A	6.08	27.02%
SV2M3	A	5.98	27.50%
*028	A	5.91	28.38%
T2-1	A	5.86	29.04%
SM3-1	A	5.83	29.41%
TQ2	A	5.67	31.35%
SV4	A	5.45	33.91%
NI-1	A	5.40	34.55%
TC7	A	5.39	34.67%
TQ3	A	5.19	37.09%
RE-09	A	3.95	52.09%
AD3	A	2.93	64.47%

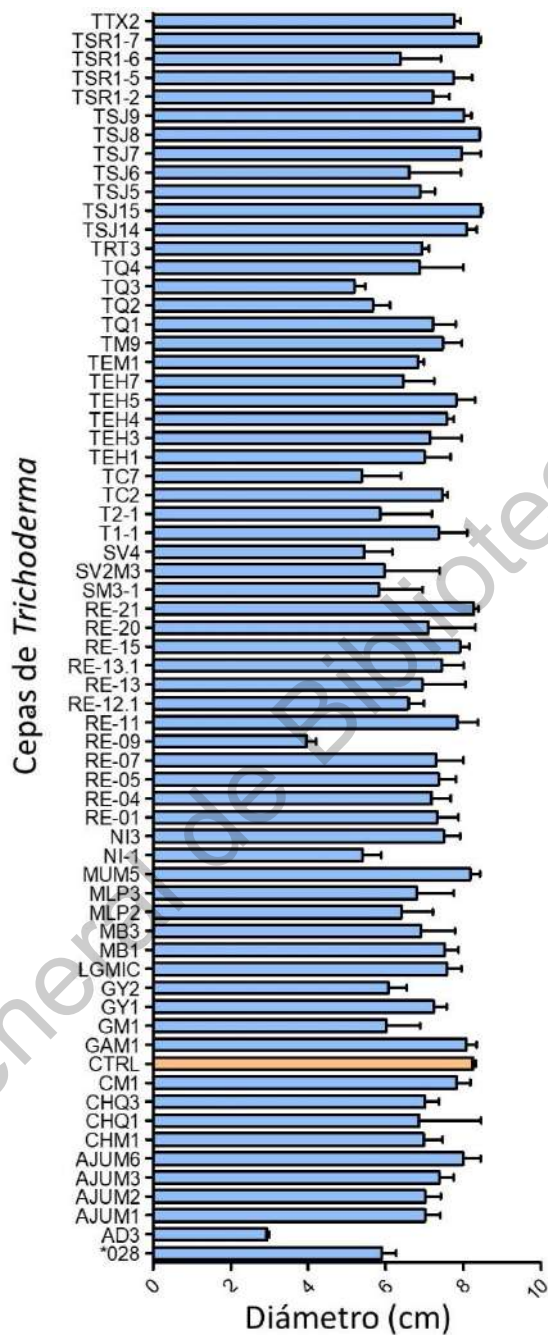


Figura 14. Diámetro del crecimiento micelial de *R. solani* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. La barra color naranja, muestra el diámetro de la colonia control y en el resto en azul, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

Tabla 10. Efecto de compuestos volátiles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *S. rolfsii*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%				Diámetro	% de inhibición
TSJ8	A				8.10	-47.79%
TSR1-6	A	B			7.65	-39.65%
TSJ7	A	B	C		7.06	-28.82%
RE-21	A	B	C	D	6.40	-16.82%
TSJ15	A	B	C	D	6.30	-15.00%
RE-15	A	B	C	D	6.25	-14.09%
RE-11	A	B	C	D	6.22	-13.49%
TSR1-5	A	B	C	D	6.22	-13.48%
RE-13.1	A	B	C	D	6.07	-10.78%
CHQ3	A	B	C	D	5.93	-8.28%
TSJ9	A	B	C	D	5.86	-6.89%
AJUM3	A	B	C	D	5.83	-6.41%
TEH4	A	B	C	D	5.77	-5.22%
LGMIC	A	B	C	D	5.73	-4.56%
T2-1	A	B	C	D	5.64	-2.88%
CTRL	A	B	C	D	5.48	0.00%
GY2	A	B	C	D	5.33	2.73%
TEH1	A	B	C	D	5.22	4.80%
GAM1	A	B	C	D	5.15	5.95%
T1-1	A	B	C	D	5.01	8.53%
RE-12.1	A	B	C	D	4.98	9.14%
AJUM6	A	B	C	D	4.97	9.37%
CM1	A	B	C	D	4.86	11.34%
CHQ1	A	B	C	D	4.86	11.36%
TEH3	A	B	C	D	4.81	12.12%
TTX2	A	B	C	D	4.75	13.38%
RE-05	A	B	C	D	4.63	15.44%
NI3	A	B	C	D	4.62	15.72%
MUM5	A	B	C	D	4.62	15.75%
TSR1-7	A	B	C	D	4.60	16.10%
TEH5	A	B	C	D	4.57	16.50%
TSJ14	A	B	C	D	4.56	16.81%
TM9	A	B	C	D	4.55	17.01%
TSR1-2	A	B	C	D	4.50	17.85%
RE-01	A	B	C	D	4.50	17.91%
TRT3	A	B	C	D	4.47	18.35%
RE-07	A	B	C	D	4.46	18.50%
TSJ6	A	B	C	D	4.38	20.11%
RE-13	A	B	C	D	4.34	20.75%
TEH7	A	B	C	D	4.32	21.19%
RE-09	A	B	C	D	4.31	21.30%
SV4	A	B	C	D	4.14	24.36%
SM3-1	A	B	C	D	4.13	24.54%
TEM1	A	B	C	D	4.11	24.93%
TC2	A	B	C	D	4.06	25.90%
RE-20	A	B	C	D	4.02	26.69%
MB3	A	B	C	D	4.01	26.85%
TC7	A	B	C	D	3.99	27.24%
*028	A	B	C	D	3.95	27.81%
TQ1	A	B	C	D	3.90	28.72%
TQ3		B	C	D	3.87	29.38%
TSJ5		B	C	D	3.86	29.53%
TQ2		B	C	D	3.79	30.73%
GM1		B	C	D	3.79	30.78%
MB1		B	C	D	3.61	34.00%
SV2M3		B	C	D	3.54	35.39%
GY1			C	D	3.38	38.26%
CHM1			C	D	3.35	38.87%
MLP2			C	D	3.34	38.99%
MLP3			C	D	3.28	40.04%
AJUM1			C	D	3.25	40.71%
RE-04			C	D	3.23	41.03%
AJUM2			C	D	3.19	41.82%
TQ4			C	D	2.89	47.14%
NI-1				D	2.68	51.02%
AD3				D	2.58	52.92%

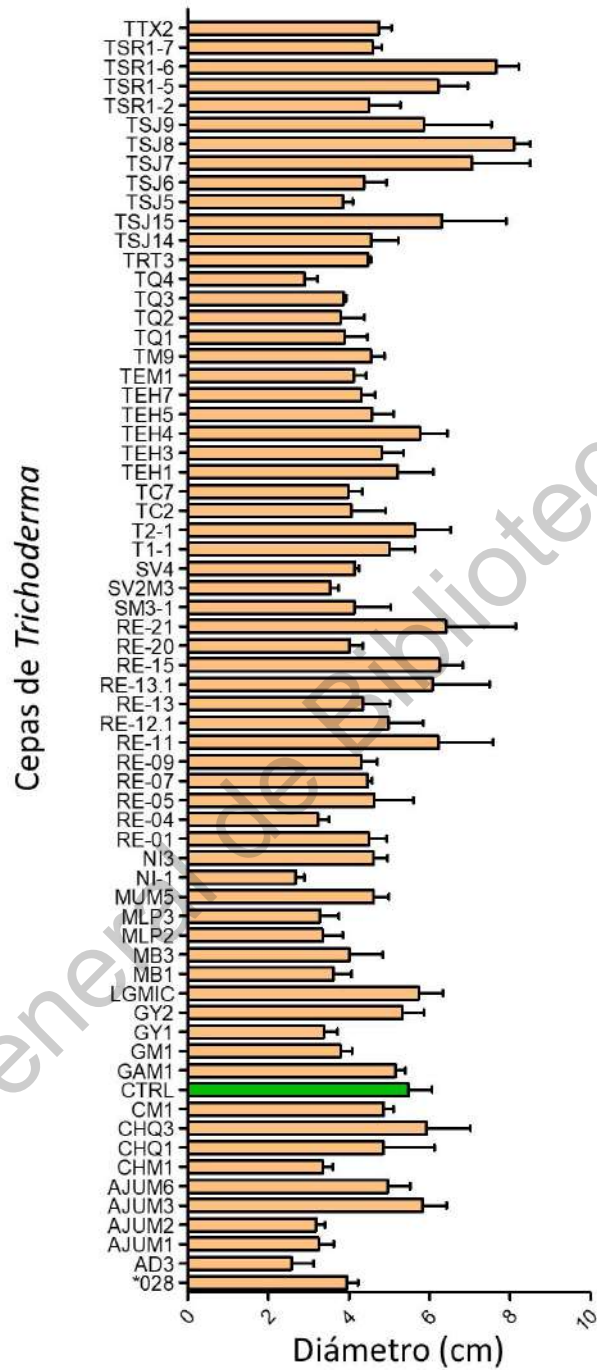


Figura 1. Diámetro del crecimiento micelial de *S. rolfsii* al ser expuesto a los compuestos volátiles de *Trichoderma spp.* La barra color verde, muestra el diámetro de la colonia control y en el resto en naranja, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los compuestos volátiles.

La comparación de listas de las cepas de *Trichoderma* presentes como inhibidores del crecimiento de fitopatógenos en un amplio espectro, por la vía de los compuestos volátiles, arrojó un subconjunto central de dos cepas: *T. asperellum* NI-1 y *T. atroviride* AD3 (Figura 16), que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de los primeros cinco fitopatógenos en diferentes grados porcentuales. Sin embargo, existen 14 cepas afectando a *B. cinerea*, otras 11 inhibiendo a *A. alternata* y *B. cinerea*, y otras cuatro cepas, afectaron a *A. alternata*, *B. cinerea* y *R. solani*, se encontraron el mayor número de cepas distribuido en los fitopatógenos citados.

Respecto a los hongos *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, los análisis estadísticos revelaron que las cepas de *Trichoderma* no inhibieron el crecimiento con una diferencia significativa con respecto al control, por ello, no se efectuó la comparación de listas.

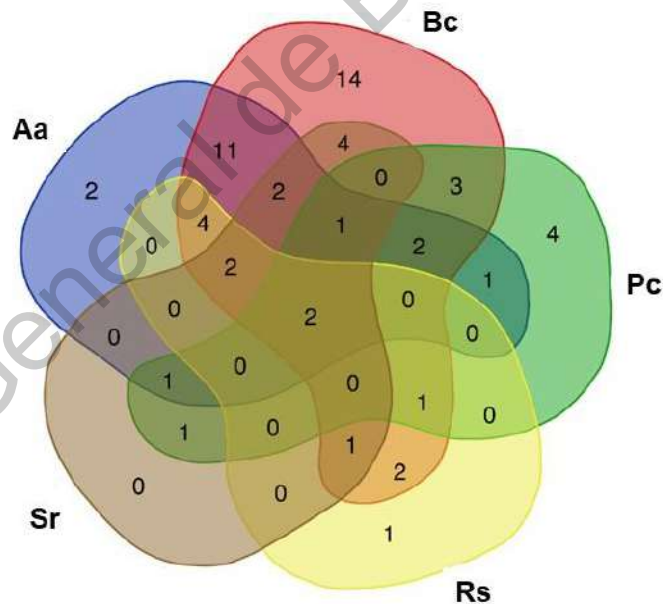


Figura 16. Cepas de *Trichoderma* con capacidad de inhibir el crecimiento de cinco fitopatógenos por efecto de compuestos volátiles. *A. alternata* (Aa), *B. cinerea* (Bc), *P. capsici* (Pc), *R. solani* (Rs) y *S. rolfsii* (Sr).

7.1.3 Antagonismo *in vitro* por metabolitos difusibles

El antagonismo por metabolitos difusibles secretados por cepas de *Trichoderma* en medio sólido, representó un modo de acción efectivo para inhibir el crecimiento de los siete hongos fitopatógenos estudiados. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.01$) en la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos de manera y específica, para el hongo *A. alternata*, se presentaron 18 cepas del total probadas con capacidad de inhibir su crecimiento con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Tabla 12 y Figura 17), el hongo *B. cinerea*, es inhibido por los metabolitos difusibles de 30 cepas *Trichoderma* con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Tabla 13 y Figura 18). El hongo *C. gloeosporioides* (Tabla 14 y Figura 19) fue inhibido con diferencias estadísticas significativas por 50 cepas de *Trichoderma*, a su vez *F. oxysporum* fue inhibido por 7 cepas de *Trichoderma* con diferencias estadísticas significativas, pero 18 cepas estimularon el crecimiento (Tabla 15 y Figura 20). Respecto al fitopatógeno *P. capsici* (Tabla 16 y Figura 21) 19 cepas fueron las que lograron detener el crecimiento del patógeno con diferencias estadísticas significativas con respecto al control. El hongo *R. solani* (Tabla 17 y Figura 22) fue inhibido con diferencias estadísticas significativas con respecto al control por los metabolitos difusibles de 63 cepas de *Trichoderma* siendo altamente sensible. El hongo *S. rolfisii* (Tabla 18 y Figura 23) fue inhibido por 41 cepas con diferencias estadísticas significativas. Debido al número de cepas empleadas en los experimentos, 65 de *Trichoderma* y siete fitopatógenos, la comparación múltiple de Tukey por pares resulta extensa, y no se describen las agrupaciones entre cepas, se pueden observar los detalles específicos en las Tablas 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, los grupos que no comparten una letra en común poseen una diferencia media que es estadísticamente significativa. En el caso de las Figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, que representan los datos de manera gráfica, es decir el diámetro de la colonia en centímetros, se enfatiza que las barras más pequeñas representan las colonias más afectadas y por ende a las cepas de *Trichoderma* de mayor interés antagónico.

Tabla 11. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. alternata*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.0%										Diámetro	% de inhibición
*028	A										8.50	0.00%
TC2	A										8.50	0.00%
CTRL	A										8.50	0.00%
TEH7	A										8.50	0.00%
TC7	A	B									8.25	2.98%
GM1	A	B									8.19	3.67%
CHM1	A	B	C								8.02	5.64%
MLP2	A	B	C								7.98	6.17%
T2-1	A	B	C	D							7.74	8.95%
TEH3	A	B	C	D							7.71	9.28%
TM9	A	B	C	D	E						7.58	10.88%
TSJ8	A	B	C	D	E	F					7.53	11.40%
MLP3	A	B	C	D	E	F					7.40	12.95%
MB3	A	B	C	D	E	F					7.39	13.05%
TSJ9	A	B	C	D	E	F					7.38	13.16%
TTX2	A	B	C	D	E	F	G				7.36	13.44%
TSJ14	A	B	C	D	E	F	G				7.36	13.46%
TEH5	A	B	C	D	E	F	G	H			7.21	15.22%
RE-07	A	B	C	D	E	F	G	H	I		7.09	16.63%
TSJ15	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	7.01	17.57%
TEH1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.99	17.80%
RE-12.1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.93	18.45%
SM3-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.82	19.81%
RE-01	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.77	20.30%
GAM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.63	22.03%
RE-13	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.62	22.08%
SV2M3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.53	22.35%
RE-11	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.50	23.22%
RE-15	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.43	24.35%
TSJ6	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.42	24.48%
NI3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.36	25.14%
TSJ7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.27	26.25%
TEH4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.26	26.30%
TEM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	6.17	27.42%
RE-09	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	5.94	30.08%
TSR1-2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	5.92	30.88%
T1-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	5.86	31.08%
TSJ5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	5.47	35.61%
TQ1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	5.17	39.16%
MUM5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	5.17	39.18%
AJUM2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.61	45.75%
RE-05	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.45	47.71%
LGMIC	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.43	47.93%
TQ4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.33	49.06%
NI-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.29	49.55%
RE-21	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.20	50.62%
RE-13.1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.10	51.75%
AJUM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	4.09	51.91%
TSR1-5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.99	53.04%
CHQ3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.97	53.24%
RE-04	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.95	53.56%
RE-20	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.94	53.65%
SV4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.76	55.73%
TRT3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.54	58.33%
AJUM3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.34	60.67%
TQ2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.10	63.56%
AJUM6	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.98	64.99%
CHQ1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.96	65.14%
TSR1-7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.88	66.11%
MB1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.85	66.45%
TQ3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.69	68.33%
TSR1-6	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.53	70.22%
CM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.43	71.39%
GY1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	1.56	81.67%
GY2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	1.04	87.81%
AD3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	0.97	88.58%

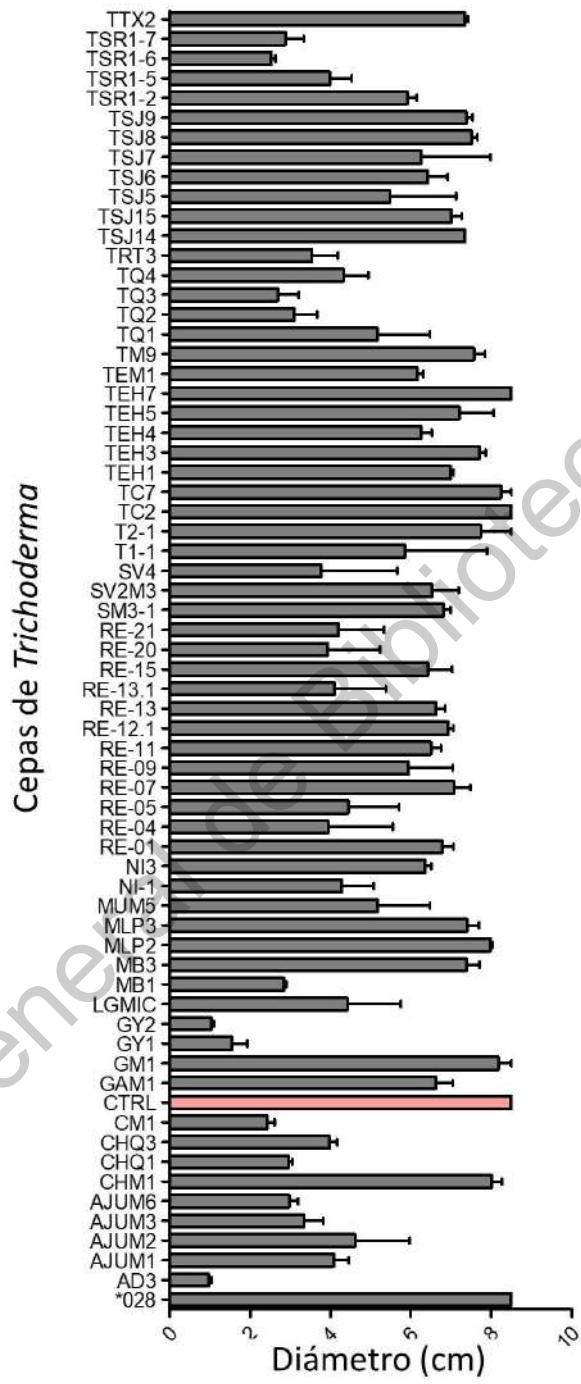


Figura 2. Diámetro del crecimiento micelial de *A. alternata* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra rosa muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en gris, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

Tabla 12. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *B. cinerea*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%	Diámetro	% de inhibición
TC7	A	8.50	-98.89%
TEH7	A	8.50	-98.89%
TEM1	A	8.50	-98.89%
TSJ7	A B	7.79	-82.16%
TM9	A B B	7.73	-80.98%
TSJ14	A B B C	7.70	-80.13%
GM1	A B B C C D	7.50	-75.60%
TEH5	A B B C C D D	7.30	-70.82%
RE-21	A B B C C D D E	6.83	-59.82%
NI3	A B B C C D D E E	6.82	-59.61%
TSJ6	A B B C C D D E E E	6.82	-59.50%
SV2M3	A B B C C D D E E E E	6.75	-58.04%
TSJ5	A B B C C D D E E E E E	6.72	-57.20%
TC2	A B B C C D D E E E E E E	6.62	-54.95%
RE-01	A B B C C D D E E E E E E F	6.61	-54.75%
RE-15	A B B C C D D E E E E E E F F	6.34	-48.32%
T1-1	A B B C C D D E E E E E E F F F	6.33	-48.16%
RE-11	A B B C C D D E E E E E E F F F G	6.16	-44.15%
AJUM2	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H	6.00	-40.43%
MB3	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H	6.00	-40.33%
TSJ9	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I	5.81	-35.92%
TSR1-2	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J	5.37	-25.70%
*028	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J	5.32	-24.50%
T2-1	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J	5.04	-17.88%
MLP2	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K	4.94	-15.52%
TTX2	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L	4.84	-13.23%
RE-13	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M	4.80	-12.36%
TSJ15	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N	4.75	-11.16%
CHM1	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N	4.72	-10.49%
RE-20	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N	4.60	-7.74%
TEH4	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O	4.51	-5.61%
TSJ8	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O	4.32	-1.15%
TEH1	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P	4.31	-0.91%
RE-05	A B B C C D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P	4.28	-0.21%
CTRL	B C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q	4.27	0.00%
TEH3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R	4.03	5.71%
GAM1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	4.03	5.80%
SM3-1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	3.54	17.19%
MLP3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	3.28	23.20%
TQ2	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.88	32.63%
RE-07	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.78	35.02%
TSR1-7	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.70	36.93%
TQ4	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.60	39.17%
TQ3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.48	41.97%
RE-13.1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.42	43.43%
AD3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.19	48.85%
RE-04	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.17	49.14%
TQ1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.14	49.89%
RE-12.1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.12	50.32%
SV4	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	2.07	51.56%
AJUM1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.78	58.30%
MB1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.73	59.61%
AJUM6	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.35	68.50%
AJUM3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.34	68.60%
CHQ3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.31	69.25%
NI-1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.19	72.08%
GY1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.13	73.48%
CHQ1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	1.13	73.54%
TSR1-5	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.94	78.06%
TSR1-6	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.82	80.88%
MUM5	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.62	85.39%
LGMIC	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.25	94.16%
GY2	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.00	100.00%
CM1	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.00	100.00%
TRT3	C C C D D D E E E E E E F F F G G G H H H I I J J K L M N N N O O O P P P Q Q Q R R R	0.00	100.00%

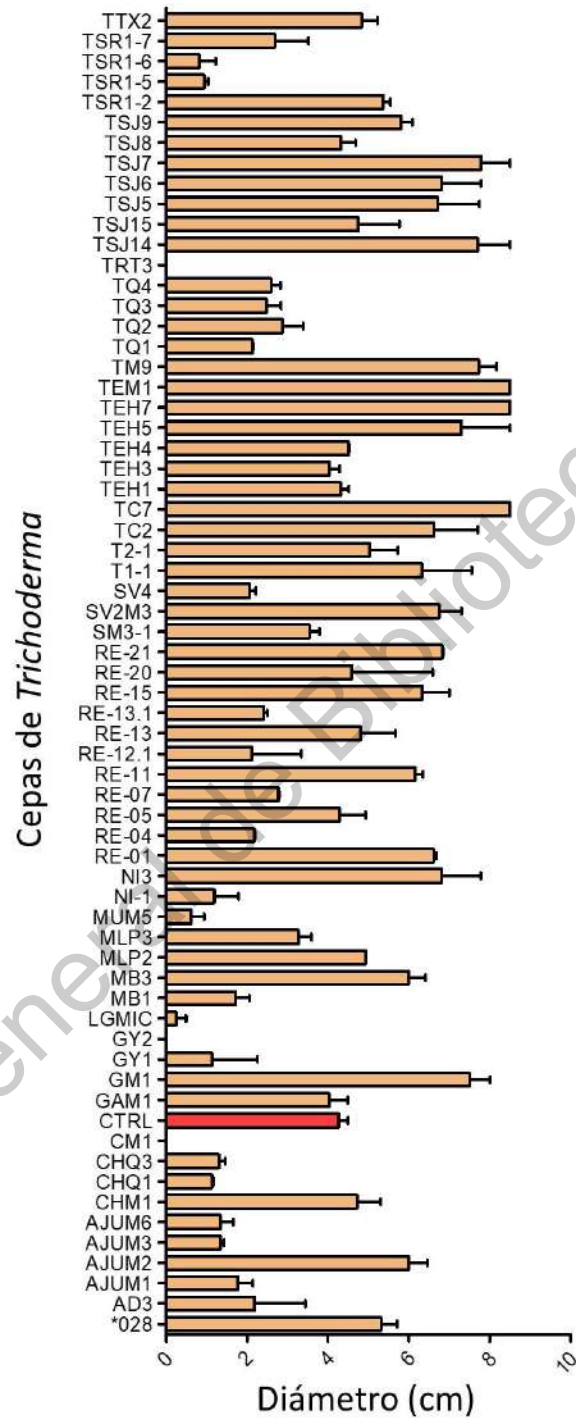


Figura18. Diámetro del crecimiento micelial de *B. cinerea* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra rojo claro, muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en salmón, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

Tabla 13. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%										Diámetro	% de inhibición			
*028	A											8.50	0.00%		
CTRL	A											8.50	0.00%		
RE-15	A	B										7.81	8.11%		
RE-20	A	B	C									7.39	13.06%		
T1-1	A	B	C									7.35	13.48%		
SV4	A	B	C									7.35	13.48%		
TQ3	A	B	C	D								7.29	14.25%		
NI3	A	B	C	D								7.28	14.38%		
TC7	A	B	C	D								7.25	14.72%		
SM3-1	A	B	C	D	E							7.20	15.25%		
MB3	A	B	C	D	E							7.20	16.36%		
TSJ6	A	B	C	D	E	F						7.03	17.33%		
TSJ7	A	B	C	D	E	F						7.03	17.35%		
NI-1	A	B	C	D	E	F						6.97	17.96%		
AD3	A	B	C	D	E	F						6.97	17.98%		
TEH5		B	C	D	E	F	G					6.87	19.23%		
TEH1		B	C	D	E	F	G					6.86	19.28%		
TC2		B	C	D	E	F	G					6.84	19.53%		
TQ1		B	C	D	E	F	G					6.80	20.05%		
AJUM2		B	C	D	E	F	G					6.79	20.14%		
T2-1		B	C	D	E	F	G					6.78	20.22%		
TEH7		B	C	D	E	F	G					6.78	20.28%		
RE-05		B	C	D	E	F	G					6.76	20.49%		
TSJ5		B	C	D	E	F	G					6.74	20.76%		
TQ2		B	C	D	E	F	G					6.73	20.78%		
TQ4		B	C	D	E	F	G					6.73	20.78%		
GY1		B	C	D	E	F	G					6.73	20.80%		
RE-13.1		B	C	D	E	F	G	H				6.62	22.08%		
RE-01		B	C	D	E	F	G	H				6.61	22.29%		
RE-12.1		B	C	D	E	F	G	H				6.58	22.60%		
TM9		B	C	D	E	F	G	H				6.56	22.78%		
TTX2		B	C	D	E	F	G	H				6.56	22.83%		
RE-04		B	C	D	E	F	G	H				6.55	23.00%		
GAM1		B	C	D	E	F	G	H	I			6.47	23.83%		
RE-21		B	C	D	E	F	G	H	I			6.46	24.04%		
TEH3		B	C	D	E	F	G	H	I			6.40	24.67%		
TSJ15		B	C	D	E	F	G	H	I			6.40	24.72%		
MLP3		B	C	D	E	F	G	H	I			6.37	25.01%		
TEM1		B	C	D	E	F	G	H	I			6.37	25.07%		
MLP2		B	C	D	E	F	G	H	I	J		6.32	25.91%		
AJUM3		B	C	D	E	F	G	H	I	J		6.30	26.06%		
TSR1-5		B	C	D	E	F	G	H	I	J		6.28	26.11%		
TSJ9		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	6.26	26.38%		
RE-07		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	6.21	26.91%	
TSJ8		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.12	28.05%
TEH4		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.98	29.62%
GY2		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.97	29.77%
AJUM1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.97	29.81%
TSR1-7		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.93	30.29%
RE-13		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.92	30.31%
GM1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.84	31.28%
TSJ14		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.80	31.74%
MB1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.67	34.65%
CHM1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.56	34.91%
MUM5		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.53	34.93%
CHQ3		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.36	36.91%
TSR1-6		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.16	39.25%
TRT3		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	5.09	40.16%
SV2M3		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	4.97	41.49%
CM1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	4.79	43.68%
AJUM6		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	4.71	44.55%
CHQ1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	4.67	45.02%
RE-09		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	4.66	45.19%
LGMIC		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	3.38	60.24%

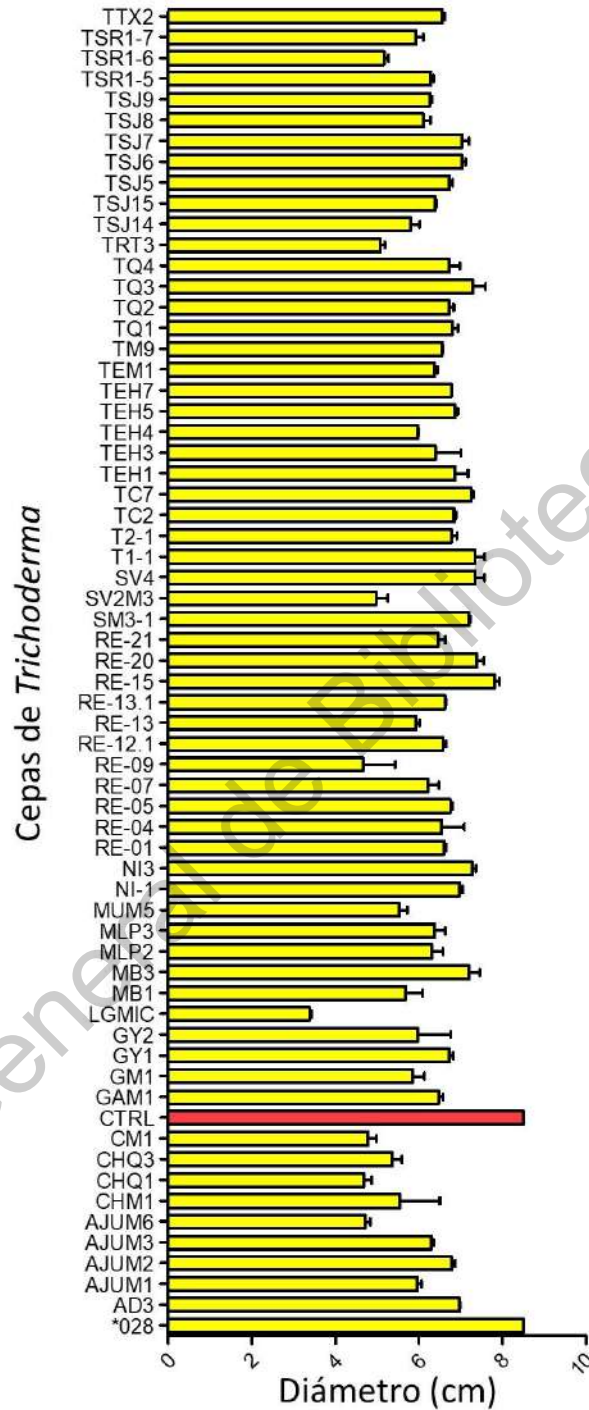


Figura 19. Diámetro del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra roja muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en amarillo, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

Tabla 14. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *F. oxysporum*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%										Diámetro	% de inhibición				
RE-15	A											8.50	-18.51%			
RE-21	A	B										8.20	-14.30%			
GM1	A	B	C									8.17	-13.91%			
TSJ9	A	B	C	D								8.08	-12.60%			
TEH5	A	B	C	D	E							8.07	-12.46%			
RE-13	A	B	C	D	E	F						8.01	-11.69%			
TSR1-7	A	B	C	D	E	F	G					7.78	-8.44%			
T2-1	A	B	C	D	E	F	G					7.70	-7.38%			
TEH3	A	B	C	D	E	F	G	H				7.68	-7.10%			
MLP3	A	B	C	D	E	F	G	H				7.65	-6.68%			
RE-11	A	B	C	D	E	F	G	H				7.57	-5.57%			
TC2	A	B	C	D	E	F	G	H				7.56	-5.41%			
TSR1-2	A	B	C	D	E	F	G	H	I			7.37	-2.72%			
TSJ5	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		7.31	-1.98%			
SV2M3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		7.26	-1.26%			
TC7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		7.26	-1.22%			
TSJ8	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.20	-0.37%			
TM9	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.20	-0.32%			
CTRL	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.17	0.00%			
TQ4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.12	0.76%			
T1-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.10	0.95%			
TEM1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.06	1.61%			
LGMIC	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.05	1.68%			
TSJ15	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	7.02	2.09%			
TEH1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.97	2.77%	
*028	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.97	2.80%	
TEH7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.95	3.04%	
SM3-1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.95	3.13%	
RE-01	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.93	3.34%	
NI3	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.88	4.15%	
TSJ6	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.86	4.37%	
TTX2	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.85	4.55%	
MB3	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.83	4.82%	
AJUM2	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.81	5.07%	
AD3	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.75	5.85%	
MLP2	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	6.75	5.94%	
RE-07	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.65	7.25%
GAM1	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.65	7.26%
RE-13.1	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.61	7.86%
AJUM3	B	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.59	8.14%
NI-1	D	D	D	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.56	8.57%
TSJ14	D	D	D	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.53	8.96%
CHM1	D	D	D	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	6.50	9.33%
RE-05	E	E	E	E	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.47	9.76%
RE-09	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.37	11.19%
TEH4	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.30	12.11%
TQ1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.30	12.21%
TQ3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.29	12.30%
RE-12.1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.28	12.43%
TSR1-6	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.28	12.50%
MUM5	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	N	6.23	13.18%
CHQ1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	N	6.18	13.89%
GY1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	N	6.03	15.90%
AJUM6	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	N	5.90	17.80%
RE-04	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	N	5.86	18.26%
GY2	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	5.74	20.01%
CM1	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	5.62	21.70%
CHQ3	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	5.60	21.86%
TQ2	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	5.44	24.10%
MB1	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	5.42	24.40%
RE-20	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	M	5.42	24.49%
SV4	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	5.14	28.27%
TSJ7	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	4.83	32.68%
TSR1-5	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	4.67	34.92%
TRT3	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	N	3.95	45.00%

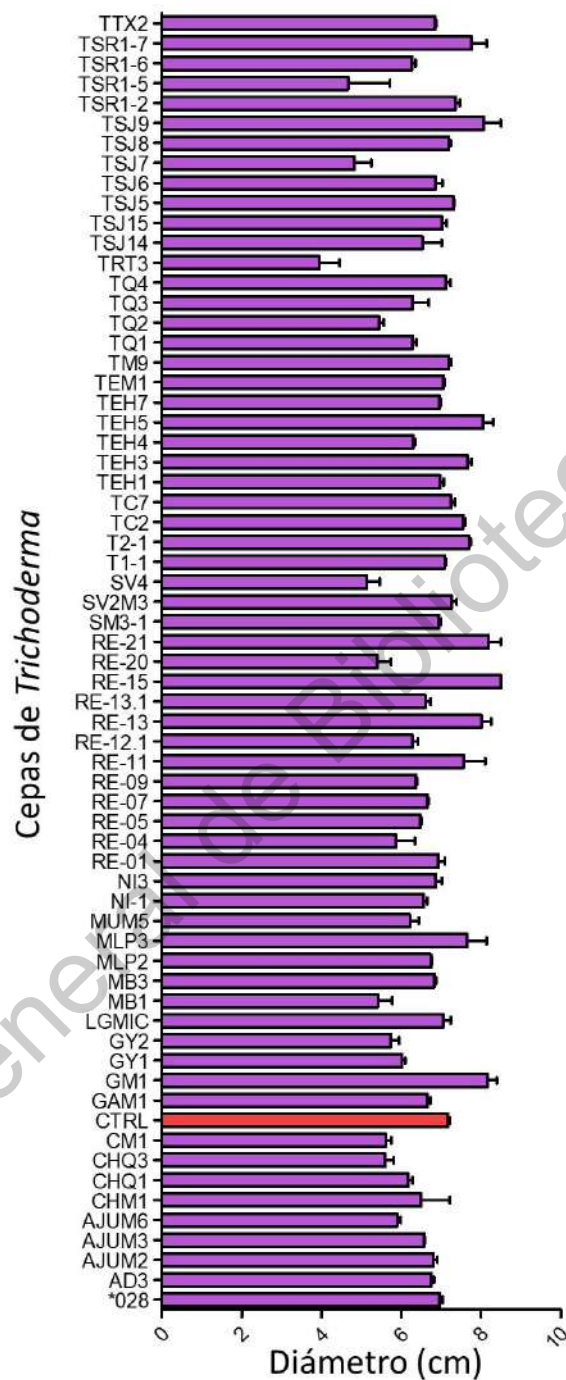


Figura 20. Diámetro del crecimiento micelial de *F. oxysporum* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra roja muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en morado, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

Tabla 15. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *P. capsici*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%										Diámetro	% de inhibición
CTRL	A										7.47	0.00%
CHQ3	A	B									7.00	6.37%
TSJ6	A	B	C								6.99	6.49%
TQ4	A	B	C								6.97	6.78%
RE-09	A	B	C	D							6.24	15.77%
RE-01	A	B	C	D							6.17	17.40%
SV2M3	A	B	C	D							6.08	18.70%
*028	A	B	C	D							6.04	19.24%
TEH7	A	B	C	D	E						5.76	22.88%
CHQ1	A	B	C	D	E						5.72	23.41%
TC7	A	B	C	D	E	F					5.56	25.59%
TSR1-5	A	B	C	D	E	F					5.48	26.63%
TSR1-7	A	B	C	D	E	F					5.48	26.65%
RE-07	A	B	C	D	E	F					5.48	26.70%
TTX2	A	B	C	D	E	F					5.45	27.10%
TSR1-6	A	B	C	D	E	F					5.40	27.66%
MUM5	A	B	C	D	E	F					5.38	27.72%
TSJ5	A	B	C	D	E	F	G				5.33	28.61%
T1-1	A	B	C	D	E	F	G				5.28	29.33%
TM9	A	B	C	D	E	F	G				5.09	31.83%
RE-05	A	B	C	D	E	F	G				5.09	34.06%
AJUM3	A	B	C	D	E	F	G	H			4.93	34.12%
AJUM6	A	B	C	D	E	F	G	H			4.92	34.13%
TEM1	A	B	C	D	E	F	G	H			4.92	34.33%
TEH1	A	B	C	D	E	F	G	H			4.91	34.79%
RE-13	A	B	C	D	E	F	G	H			4.87	35.56%
TSJ7	A	B	C	D	E	F	G	H			4.82	36.15%
TSJ9	A	B	C	D	E	F	G	H			4.77	36.24%
RE-21	A	B	C	D	E	F	G	H			4.76	36.82%
TEH4	A	B	C	D	E	F	G	H			4.72	36.85%
RE-15	A	B	C	D	E	F	G	H			4.71	36.96%
TEH3	A	B	C	D	E	F	G	H			4.14	44.53%
AJUM1	A	B	C	D	E	F	G	H			4.13	44.66%
CM1	A	B	C	D	E	F	G	H			3.95	47.06%
TSJ15	A	B	C	D	E	F	G	H			3.80	49.17%
T2-1	A	B	C	D	E	F	G	H			3.73	50.10%
TC2	A	B	C	D	E	F	G	H			3.40	54.53%
TSJ14	A	B	C	D	E	F	G	H			3.36	55.04%
TSJ8	A	B	C	D	E	F	G	H			3.28	56.04%
TEH5	A	B	C	D	E	F	G	H			3.23	56.72%
AJUM2	A	B	C	D	E	F	G	H			3.01	59.73%
RE-13.1	A	B	C	D	E	F	G	H			2.92	60.85%
NI3	A	B	C	D	E	F	G	H			2.71	63.65%
GM1	A	B	C	D	E	F	G	H			2.64	64.58%
RE-12.1	A	B	C	D	E	F	G	H			2.35	68.48%
TSR1-2		B	C	D	E	F	G	H			2.01	74.16%
AD3				D	E	F	G	H			1.69	77.37%
RE-20				D	E	F	G	H			1.62	78.21%
TQ2				D	E	F	G	H			1.57	78.89%
NI-1					E	F	G	H			1.04	86.00%
GY1						F	G	H			0.61	91.74%
LGMIC							G	H			0.40	94.63%
MLP3								H			0.01	99.32%
RE-04								H			0.01	99.77%
SM3-1								H			0	100.00%
SV4								H			0	100.00%
GAM1								H			0	100.00%
TRT3								H			0	100.00%
TQ3								H			0	100.00%
GY2								H			0	100.00%
MB1								H			0	100.00%
TQ1								H			0	100.00%
MLP2								H			0	100.00%

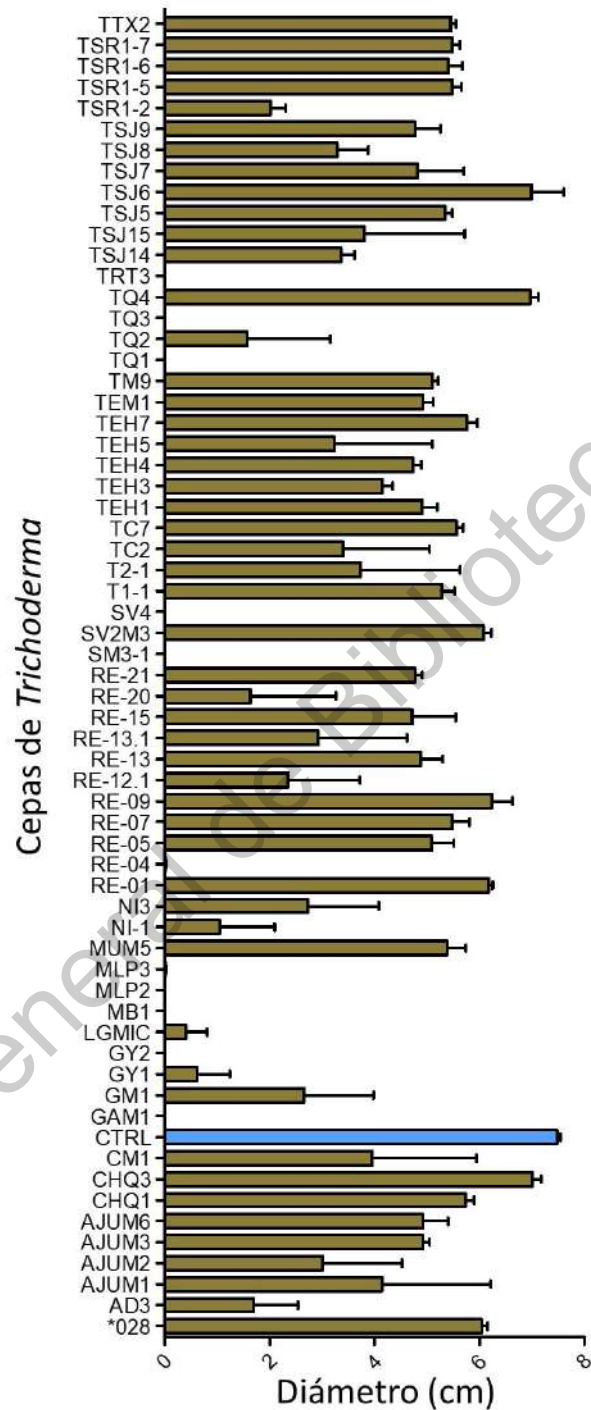


Figura 3. Diámetro del crecimiento micelial de *P. capsici* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra azul muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en café, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

Tabla 16. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *R. solani*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%										Diámetro	% de inhibición
CTRL	A										7.46	0.00%
*028	A	B									5.24	29.71%
TSJ9	A	B	C								4.52	39.38%
T1-1		B	C	D							4.28	42.60%
SV2M3		B	C	D	E						4.01	46.27%
TSJ7		B	C	D	E	F					3.95	47.01%
MLP2		B	C	D	E	F	G				3.83	48.66%
TM9		B	C	D	E	F	G	H			3.61	51.57%
TSJ5		B	C	D	E	F	G	H	I		3.52	52.79%
TEH5		B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.48	53.36%
TSJ8		B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.35	55.08%
TTX2		B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.28	55.95%
TEH7		B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.12	58.21%
TC2		B	C	D	E	F	G	H	I	J	3.08	58.65%
TC7		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.95	60.45%
TEM1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.94	60.62%
MB3		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.87	61.56%
CHM1		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.77	62.88%
RE-11		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.69	63.96%
TQ4		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.61	65.04%
TEH3		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.47	66.84%
TSR1-2		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.44	67.30%
TSJ6		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.25	69.77%
TQ2		B	C	D	E	F	G	H	I	J	2.04	72.62%
MLP3			C	D	E	F	G	H	I	J	1.90	74.47%
TEH1			C	D	E	F	G	H	I	J	1.88	74.81%
MUM5			C	D	E	F	G	H	I	J	1.59	78.64%
RE-21			C	D	E	F	G	H	I	J	1.52	79.59%
GY1			C	D	E	F	G	H	I	J	1.51	79.79%
RE-09			C	D	E	F	G	H	I	J	1.45	80.50%
T2-1			C	D	E	F	G	H	I	J	1.43	80.81%
TSJ14			C	D	E	F	G	H	I	J	1.43	80.85%
AD3			C	D	E	F	G	H	I	J	1.39	81.40%
RE-13.1			C	D	E	F	G	H	I	J	1.34	82.02%
MB1			C	D	E	F	G	H	I	J	1.30	82.50%
NI3			C	D	E	F	G	H	I	J	1.22	83.59%
TEH4			C	D	E	F	G	H	I	J	1.12	85.01%
RE-13			C	D	E	F	G	H	I	J	1.03	86.15%
AJUM3			C	D	E	F	G	H	I	J	0.97	87.05%
RE-12.1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.93	87.49%
RE-15			C	D	E	F	G	H	I	J	0.93	87.54%
NI-1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.87	88.31%
RE-01			C	D	E	F	G	H	I	J	0.87	88.38%
TSR1-5			C	D	E	F	G	H	I	J	0.85	88.67%
RE-05			C	D	E	F	G	H	I	J	0.76	89.77%
TSJ15			C	D	E	F	G	H	I	J	0.71	90.50%
RE-07			C	D	E	F	G	H	I	J	0.60	91.93%
TQ1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.54	92.82%
AJUM1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.46	93.84%
RE-04			C	D	E	F	G	H	I	J	0.35	95.28%
SV4			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
SM3-1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
LGMIC			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
TRT3			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
AJUM2			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
GY2			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
CHQ1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
CHQ3			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
CM1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
TQ3			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
GAM1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
GM1			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
AJUM6			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
TSR1-6			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
TSR1-7			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%
RE-20			C	D	E	F	G	H	I	J	0.00	100.00%

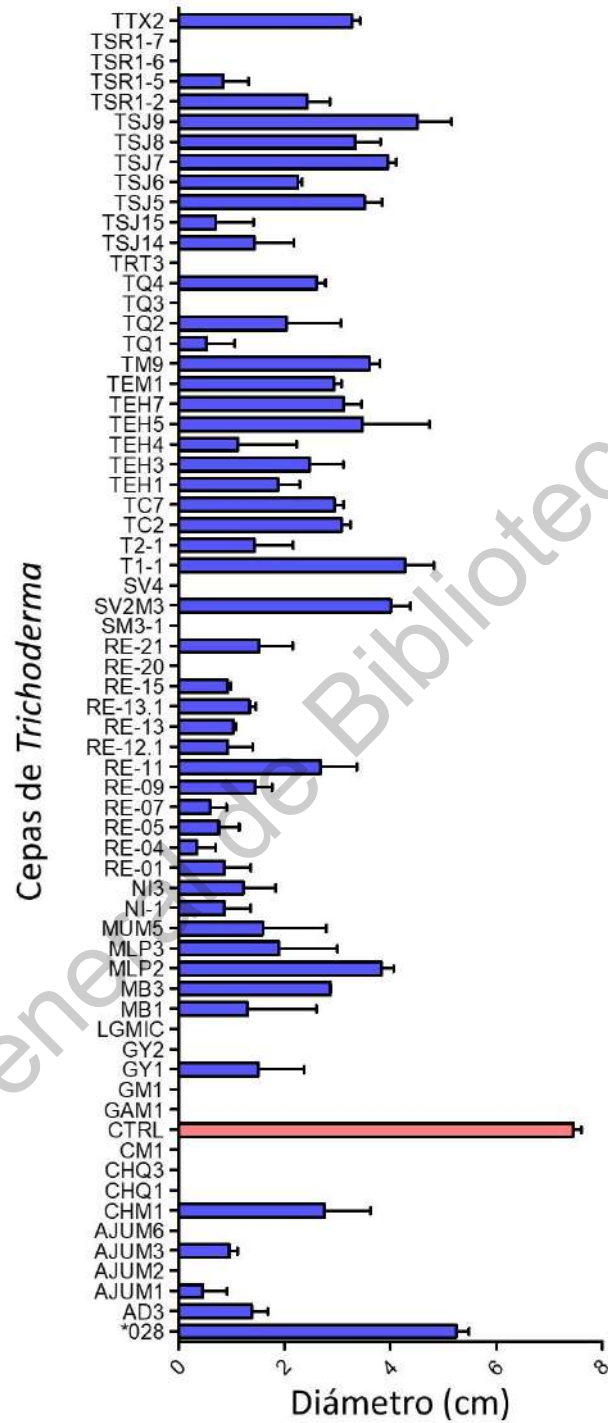


Figura 22. Diámetro del crecimiento micelial de *R. solani* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra rosa muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en azul, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

Tabla 17. Efecto de metabolitos difusibles liberados por las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *S. rolfsii*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%	Diámetro	% de inhibición
CTRL	A	8.50	0.00%
*028	A B	7.80	8.23%
MLP2	A B C	7.60	10.54%
T1-1	A B C D	7.44	12.44%
TM9	A B C D D	7.04	17.17%
TEH7	A B C D D E	6.99	17.78%
TSJ14	A B C D D E F	6.94	18.34%
GY1	A B C D D E F F	6.92	19.29%
MLP3	A B C D D E F F G	6.86	19.46%
TEH1	A B C D D E F F G H	6.82	19.73%
TEH5	A B C D D E F F G H	6.82	19.81%
TC7	A B C D D E F F G H	6.80	19.98%
TTX2	A B C D D E F F G H I	6.36	25.19%
MB3	A B C C D D E F F G H I	6.21	26.92%
RE-04	A B C C D D E F F G H I	6.20	27.05%
RE-15	A B C C D D E F F G H I	6.10	28.20%
TQ4	A B C C D D E F F G H I	6.06	28.72%
TSJ5	A B C C D D E F F G H I	6.05	28.85%
TSJ8	A B C C D D E F F G H I J	5.79	31.92%
TSJ7	A B C C D D E F F G H I J K	5.75	32.35%
TEM1	A B C C D D E F F G H I J K L	5.60	34.14%
TSJ6	A B C C D D E F F G H I J K L M	5.35	37.12%
RE-07	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N	5.16	39.33%
TSJ15	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	5.14	39.54%
RE-11	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	5.05	40.54%
SV2M3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	4.93	41.97%
RE-21	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	4.57	46.20%
TC2	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	4.28	49.60%
AJUM3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	4.21	50.48%
TSJ9	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	4.20	51.02%
TQ1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	4.03	52.64%
MB1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.85	54.75%
NI3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.64	57.19%
RE-01	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.58	57.87%
TEH3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.55	58.19%
AJUM2	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.47	59.18%
AJUM6	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.38	60.24%
TQ2	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.29	61.27%
TRT3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.18	62.58%
RE-09	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	3.03	64.38%
RE-13.1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.93	65.56%
TSR1-2	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.43	71.43%
TEH4	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.32	72.66%
T2-1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.29	73.02%
CHQ3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.24	73.67%
TSR1-6	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.17	74.49%
RE-12.1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	2.00	76.44%
TQ3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.90	77.69%
CHQ1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.89	77.74%
RE-05	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.74	79.57%
MUM5	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.70	79.95%
SM3-1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.69	80.10%
TSR1-7	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.09	87.14%
LGMIC	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.08	87.33%
AJUM1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	1.05	87.62%
RE-13	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.92	89.21%
GY2	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.75	91.23%
CHM1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.70	91.72%
RE-20	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.59	93.00%
GAM1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.54	93.67%
TSR1-5	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.34	96.04%
NI-1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.31	96.30%
AD3	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.00	100.00%
CM1	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.00	100.00%
SV4	A A A B B B C C C D D D E E E F F F G G G H H H I I I J J K L L M N N	0.00	100.00%

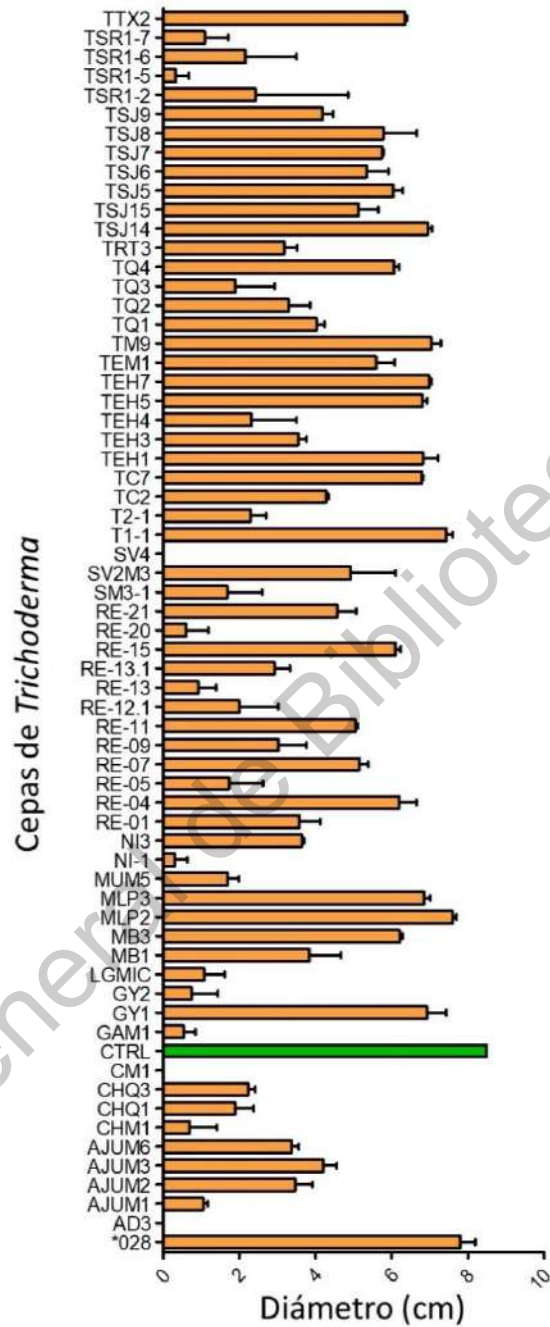


Figura 23. Diámetro del crecimiento micelial de *S. rolfsii* al estar en contacto con los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. La barra color verde muestra el diámetro de la colonia control sin tratamiento y el resto en color naranja, el diámetro alcanzado al ser expuestos a los metabolitos difusibles.

La comparación de listas de las cepas de *Trichoderma* con capacidad inhibidora del crecimiento de los primeros cinco fitopatógenos comparados con respecto al crecimiento del control (fitopatógeno sin *Trichoderma*) y con mayor espectro de acción fueron: *T. asperellum* NI-1, *T. tomentosum* TSR1-5, *T. asperellum* TRT3, *T. atroviride* MB1 y *T. atrobrunneum* SV4 (Figura 24-A). Respecto a las cepas de *Trichoderma* presentes como inhibidores del crecimiento de *C. gloeosporioides* al 25 % y *F. oxysporum* al 20 % fueron 6 cepas: *T. koningiopsis* GY2, *T. atrobrunneum* CHQ3, *T. tomentosum* TSR1-5, *T. asperellum* TRT3, *T. atroviride* CM1 y *T. atroviride* MB1 (Figura 24-B).

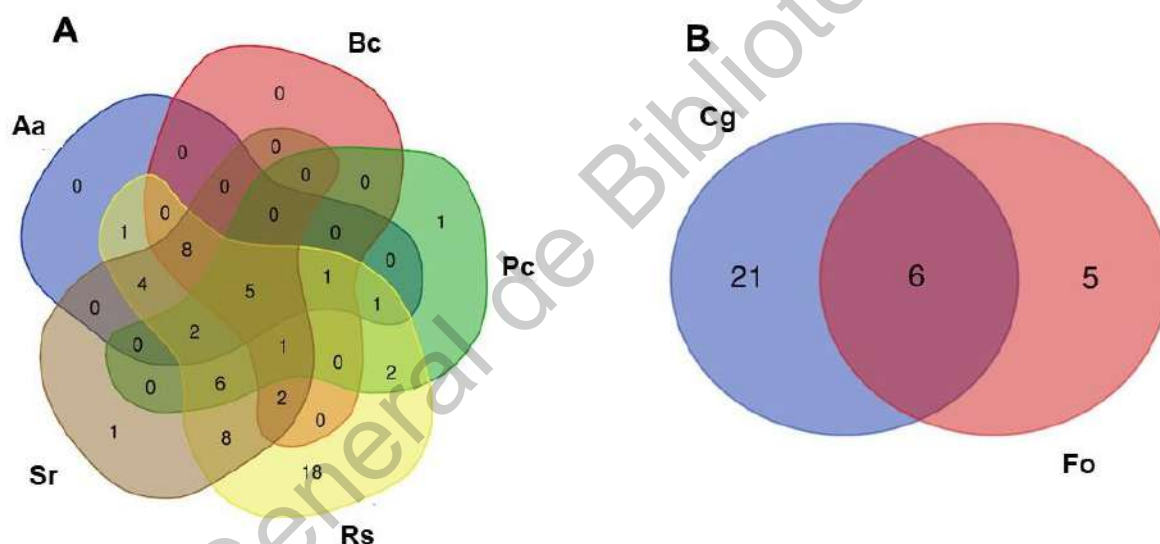


Figura 24. Cepas de *Trichoderma* presentes como antagónicas para los siete fitopatógenos por metabolitos difusibles. A-B, *A. alternata* (Aa), *B. cinerea* (Bc), *P. capsici* (Pc), *R. solani* (Rs), *S. rolfii* (Sr), *C. gloeosporioides* (Cg) y *F. oxysporum* (Fo). Se realizaron dos análisis comparativos por limitaciones del programa.

En la Tabla 19 se muestran un resumen de las cepas antagónicas por los tres mecanismos de acción evaluados: micoparasitismo, compuestos volátiles y metabolitos difusibles, se incluyeron únicamente las de mayor espectro de acción, es decir, aquellas capaces de afectar a un mayor número de fitopatógenos por mecanismo de acción específico.

Tabla 18. Resumen de las cepas de *Trichoderma* con mayor actividad antagónica.

Clave y especie de <i>Trichoderma</i>	Experimento		
	Micoparasitismo	Compuestos volátiles	Metabolitos difusibles
AJUM2 - <i>Trichoderma</i> sp.	α		
TEM1 - <i>Trichoderma</i> sp.	β		
MB1 - <i>T. atroviride</i>	β		α
TEH4 - <i>Trichoderma</i> sp.	γ		
MLP2 - <i>T. atroviride</i>	γ		
RE-11 - <i>T. koningiopsis</i>	γ		
NI-1 - <i>T. asperellum</i>		γ	γ
AD3 - <i>T. atroviride</i>		γ	
TSR1-5 - <i>T. tomentosum</i>			α
TRT3 - <i>T. asperellum</i>			α
SV4 - <i>T. atrobrunneum</i>			γ

Nota: Las letras del alfabeto griego categorizan las cepas de la siguiente manera: α = cepas con capacidad de afectar a los siete fitopatógenos, considerándose las de mayor espectro de acción; β = cepas con capacidad de afectar a seis fitopatógenos de los siete probados; γ = cepas con capacidad de afectar a cinco fitopatógenos de los siete probados.

7.2 Actividad solubilizadora de nutrientes

7.2.1 Solubilización de fosfato tricálcico en medio líquido

De las 65 cepas probadas para determinar la capacidad de solubilizar fosfatos tricálcicos en medio líquido Pikovskaya, 51 solubiliaron cantidades por encima de los 0.100 mg L⁻¹. El promedio de solubilización fue de 0.271 mg L⁻¹ de medio de cultivo líquido. La mayor producción fue de 1.226 mg L⁻¹ por la cepa TEH5 - *T. asperellum*, a las 72 h de cultivo, posteriormente la cepa MB1 *T. atroviride*, con 0.695 mg L⁻¹, después le sigue la cepa 028 *T. atroviride* con 0.688 mg L⁻¹.

De acuerdo al análisis estadístico existen diferencias estadísticas significativas entre la capacidad de solubilizar fosfatos en las cepas de *Trichoderma*. Para consultar los detalles del comportamiento de cada cepa se puede consultar la Tabla

20 con los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey al 0.05 % para la variable mg L^{-1} de fosfato soluble en medio de cultivo líquido.

7.2.2 Producción de sideróforos en medio CAS sólido y líquido

En esta prueba, realizada en medio de cultivo sólido CAS-agar, se probó la solubilización de hierro mediante compuestos sideróforos producidos por 50 cepas de *Trichoderma*. En la Tabla 21, se muestra con detalle las cepas que son sideróforo positivas, así como la velocidad de difusión de sideróforos producidos y medidos en mm por día de avance en el cambio de color del medio de cultivo, las cepas marcadas con +++ indican una velocidad de reacción alta, ++ velocidad media de reacción y + baja. Se presentaron 20 cepas con una velocidad de difusión en mm/día altas (+++), 16 con una velocidad media (++) , 10 con baja (+) y cuatro cepas sideróforo negativo. La velocidad de difusión en el medio (viraje de color) se considera una evaluación semicuantitativa y no se sometió a ningún análisis estadístico.

La producción de sideróforos en medio líquido, se logró identificar y cuantificar únicamente en diez cepas de las 65 probadas. El rendimiento en mg L^{-1} de sideróforos en medio líquido son equivalentes al sideróforo sintético con el que se elaboró la curva estándar, meclato de ferroxamina. El análisis de varianza evidenció diferencia estadística significativa ($p \leq 0.001$) en la producción de sideróforos, las cepas con mayor producción fueron GY2 *T. koningiopsis*, con 19.15 mg L^{-1} , seguida de 028 *T. atroviride* con 18.46 mg L^{-1} , TQ3 *T. asperellum*, con 17.50 mg L^{-1} , AD3 *T. atroviride* con 16.27 mg L^{-1} , TEH1 *T. atroviride* con $15.37 \text{ SM3-1 T. capillare}$ con 13.5 mg L^{-1} . Para observar los detalles de agrupamiento y rendimiento medio de producción, en la Tabla 22, se muestran los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey al 0.05 % con las especificaciones.

Tabla 19. Solubilización de fósforo por cepas de *Trichoderma* en medio de cultivo líquido a las 72 h.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05 %					mg L ⁻¹
TEH5	A					1.226
MB1	A	B				0.695
*028	A	B	C			0.688
TSJ8		B	C	D		0.605
AJUM1		B	C	D		0.592
TSJ15		B	C	D		0.589
TEH4		B	C	D	E	0.556
AJUM3		B	C	D	E	0.506
TEH7		B	C	D	E	0.460
TM9		B	C	D	E	0.434
CHM1		B	C	D	E	0.430
T2-1		B	C	D	E	0.428
TQ1		B	C	D	E	0.412
GY1		B	C	D	E	0.399
CHQ3		B	C	D	E	0.395
TTX2		B	C	D	E	0.393
AJUM6		B	C	D	E	0.365
SV2M3		B	C	D	E	0.359
GM1		B	C	D	E	0.356
TSR1-2		B	C	D	E	0.350
AJUM2		B	C	D	E	0.348
TSJ14		B	C	D	E	0.343
TC7		B	C	D	E	0.334
MLP2		B	C	D	E	0.316
TSR1-6		B	C	D	E	0.310
TEH1		B	C	D	E	0.285
RE-20		B	C	D	E	0.276
RE-13		B	C	D	E	0.275
RE-05		B	C	D	E	0.268
TSR1-5		B	C	D	E	0.262
AD3		B	C	D	E	0.258
RE-12.1		B	C	D	E	0.241
RE-15		B	C	D	E	0.216
RE-13.1		B	C	D	E	0.208
RE-09		B	C	D	E	0.200
TC2		B	C	D	E	0.199
NI-1		B	C	D	E	0.198
SV4		B	C	D	E	0.186
TEH3		B	C	D	E	0.180
TSR1-7		B	C	D	E	0.162
SM3-1		B	C	D	E	0.156
GAM1		B	C	D	E	0.151
CM1		B	C	D	E	0.151
TSJ9		B	C	D	E	0.148
TSJ7		B	C	D	E	0.147
MLP3		B	C	D	E	0.133
CHQ1		B	C	D	E	0.132
RE-21		B	C	D	E	0.125
MUM5		B	C	D	E	0.125
TSJ6		B	C	D	E	0.117
TSJ5		B	C	D	E	0.114
GY2			C	D	E	0.100
LGMIC				D	E	0.089
RE-11				D	E	0.087
T1-1				D	E	0.076
MB3				D	E	0.060
RE-07				D	E	0.059
RE-04				D	E	0.054
TEM1				D	E	0.020
TRT3				D	E	0.018
RE-01				D	E	0.017
TQ2					E	-0.015
NI3					E	-0.016
TQ4					E	-0.016
TQ3					E	-0.016

Tabla 20. Producción de sideróforos en medio sólido CAS-agar.

Cepa	Crecimiento mm/día	Difusión mm/día	Reacción	Color
*028	21	4.5	++	Purpura-naranja
AJUM1	24	3.6	++	Naranja
AJUM2	26	7.0	+++	Naranja
AJUM3	31	2.8	+	Naranja
AJUM6	11	2.5	+	Naranja
CHM1	42	3.1	+	Naranja
CHQ1	34	2.1	+	Naranja
CHQ3	8	7.0	+++	Naranja
CM1	27	7.0	+++	Naranja
GAM1	14	3.6	++	Naranja
GY1	4.2	1.8	+	Naranja
MB1	18	7.0	+++	Naranja
MB3	35	3.6	++	Naranja
MLP2	27	2.1	+	Naranja
MLP3	39	4.5	++	Naranja
NI-1	21	5.5	+++	Purpura-Naranja
NI3	22	7.0	+++	Naranja
RE-01	27	7.0	+++	Naranja
RE-04	24	3.5	+	Naranja
RE-05	23	7.0	+++	Naranja
RE-11	27	2.3	+	Naranja
RE-12.1	12	5.2	++	Naranja
RE-13	27	7.0	+++	Purpura-Naranja
RE-13.1	22	5.3	++	Naranja
RE-20	20	4.1	++	Naranja
RE-21	11	7.0	+++	Naranja
SM3-1	20	5.6	+++	Naranja
SV2M3	4.2	3.6	++	Naranja
SV4	20	0	-	Negativo
T1-1	12	7.0	+++	Naranja
T2-1	27	7.0	+++	Naranja
TC2	27	7.0	+++	Naranja
TC7	28	7.0	+++	Naranja
TEH1	23	7.0	+++	Naranja
TEH5	25	7.0	+++	Naranja
TEH7	21	4.6	++	Naranja
TEM1	29	7.0	+++	Naranja
TM9	21	5.6	+++	Naranja
TQ1	21	3.6	++	Naranja
TQ2	22	6.5	+++	Naranja
TQ3	24	5	++	Naranja
TQ4	23	3.5	++	Naranja
TSJ5	28	4.6	++	Naranja
TSJ6	29	5.1	++	Naranja
TSJ7	9	0	-	Negativo
TSJ9	17	2.8	+	Naranja
TSJ14	10	0	-	Negativo
TSJ15	31	0	-	Negativo
TSR1-2	4.2	2.1	++	Naranja
TSR1-5	31	2.1	+	Naranja

(+++) velocidad de difusión alta, (++) velocidad intermedia y (+) baja difusión.

Tabla 21. Producción de sideróforos en medio líquido por cepas de *Trichoderma*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05%			mg L ⁻¹
GY2	A			19.159
*028	A			18.469
TQ3	A			17.506
AD3	A	B		16.272
TEH1	A	B	C	15.372
SM3-1	A	B	C	13.593
RE-13		B	C	2.335
RE-04		B	C	1.937
TQ1		B	C	1.561
MB1			C	0.996

7.3 Producción de ácido indol acético por *Trichoderma* spp.

Las 65 cepas de *Trichoderma* probadas son indol positivo, las cantidades detectadas y cuantificadas fueron variables, de acuerdo al análisis estadístico ANOVA ($p \leq 0.01$), existen diferencias estadísticas significativas entre la capacidad de producir compuestos indoles por parte de las cepas de *Trichoderma*. La cepa RE-15 *T. tomentosum*, fue la de mayor producción con 35.95 mg L⁻¹ de medio de cultivo, esta cepa formó un agrupamiento de Tukey (0.05 %) individual y el más sobresaliente, seguida de GY1 *T. asperellum* con 12.11 mg L⁻¹, después RE-20 *T. tomentosum* con un rendimiento de 10.30 mg L⁻¹. La producción media de las cepas de *Trichoderma* se localizó en los 6.40 mg L⁻¹.

En total se formaron ocho agrupamientos de Tukey con diferencias estadísticas entre ellos. Como la comparación por pares resulta ser extensa en la Tabla 23, se muestran los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey al 0.05 % para la variable mg L⁻¹ de ácido indol acético en medio de cultivo líquido.

Tabla 22. Producción de ácido indol acético por cepas de *Trichoderma*.

Cepa	Agrupamiento de Tukey al 0.05 %					mg L ⁻¹
RE-15	A					35.952
GY1	B					12.114
RE-20	B	C				10.301
TSJ14	B	C	D			8.503
TEH5	B	C	D	E		7.963
RE-04	B	C	D	E		7.825
T1-1	B	C	D	E		7.562
RE-21	C					7.174
TQ1	C					6.967
MB1	C					6.912
TQ3	C					6.898
TEH3	C					6.898
AJUM2	C					6.884
TEH7	C					6.787
TM9	C					6.690
TSR1-6	C					6.566
TQ4	C					6.566
TSJ5	C					6.552
TSJ6	C					6.524
TQ2	C					6.469
T2-1	C					6.427
TEM1	C					6.192
TSR1-5	C					6.026
CHQ1	C					5.957
MUM5	C					5.929
TSJ7	C					5.915
RE-13.1	C					5.915
GY2	C					5.888
LGMIC	C					5.860
TSR1-7	C					5.846
NI3	C					5.832
GM1	C					5.805
TSJ8	C					5.805
TSJ15	C					5.708
TSR1-2	C					5.639
AD3	C					5.625
MLP3	D					5.445
RE-07	D					5.431
TSJ9	D					5.404
RE-01	D					5.362
TTX2	D					5.334
*028	D					5.334
RE-05	D					5.279
GAM1	D					5.238
TEH1	D					5.238
MB3	D					5.224
TC7	D					5.196
NI-1	D					5.182
CM1	D					4.961
RE-11	D					4.947
AJUM3	D					4.919
MLP2	D					4.878
RE-09	D					4.850
TRT3	D					4.739
TEH4	D					4.726
CHQ3	D					4.477
SM3-1	D					4.449
AJUM1	D					4.435
RE-12.1	D					4.255
SV4	D					4.186
RE-13	D					4.172
TC2	D					4.158
AJUM6	D					4.034
CHM1	D					4.020
SV2M3	E					3.743

7.4 Efecto de la inoculación de *Trichoderma* spp. en plántulas de tomate en condiciones de invernadero

En este experimento se observó un crecimiento de las plántulas considerablemente homogéneo, sin embargo, una vez sometidos los datos obtenidos al análisis de varianza (ANOVA $p \leq 0.001$), mostraron diferencia estadística significativa en las variables evaluadas.

Las variables de respuesta fueron: altura de las plántulas (cm), peso de la raíz (g) y peso del área vegetativa (g). A partir de los resultados del ANOVA para cada una de las variables, se rechazó la hipótesis nula (H_0), que dice que no hay diferencia significativa, sustituyéndose por la hipótesis alternativa (H_1), que indica la presencia de diferencias estadísticas significativas en los tratamientos, y se realizó un análisis *post hoc* de comparación de medias Dunnett al 0.05 %, el cual compara las medias de cada uno de los tratamientos con respecto al control.

Para el caso de la variable, altura de la planta, cuatro tratamientos (cepas) mostraron una diferencia estadística significativa con respecto al control. Las cepas fueron: *T. atrobrunneum* CHQ3, *T. koningiopsis* RE-01, TC7 y GAM1, ambas de la especie *T. asperellum* (Figura 25). Para la variable, peso de la raíz, tres cepas tuvieron un efecto diferente estadísticamente con respecto al control, *T. atrobrunneum* CHQ3 la cual se presentó en la variable de altura de la planta, TEH7 y AJUM1, ambas de la especie *T. harzianum*, dichas cepas representan las de mayor efecto sobre la producción de raíz (Figura 26). Finalmente, en la variable del peso de la parte aérea de la planta, encontramos únicamente una cepa con un efecto estadísticamente diferente con respecto al control, TQ4 de la especie *T. asperellum* (Figura 27). En total suman siete cepas con un efecto promotor de crecimiento vegetal.

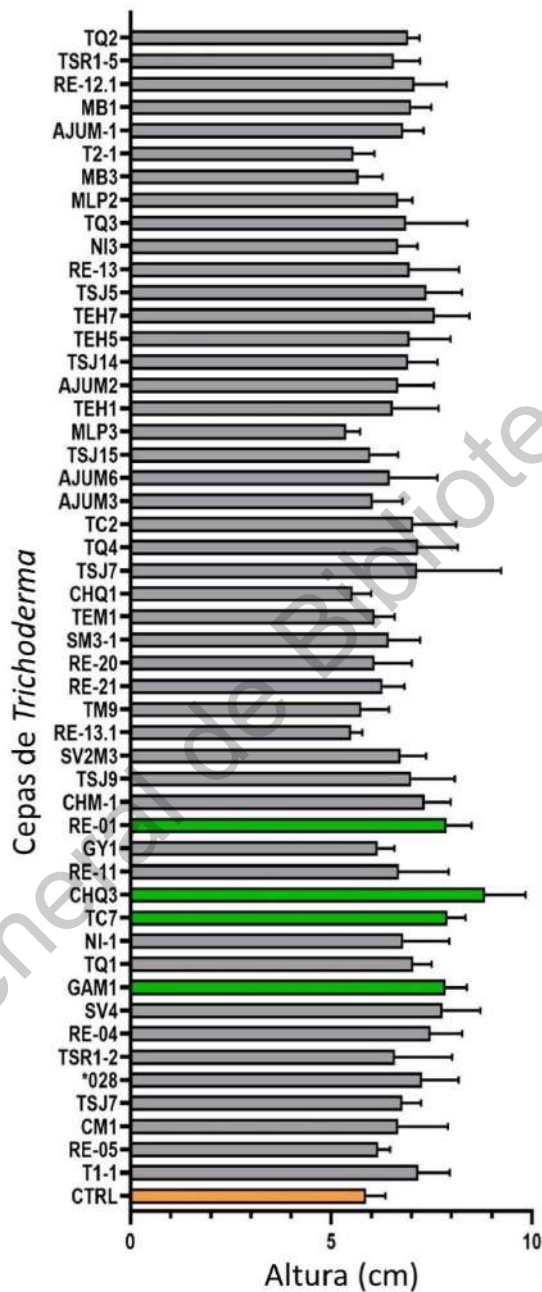


Figura 25. Cepas de *Trichoderma* promotoras de altura de plántulas de tomate. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 0.05 % de confiabilidad para la variable altura. Se muestra en color naranja la barra correspondiente al control y en color verde las barras de los tratamientos con diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) Dunnett test.

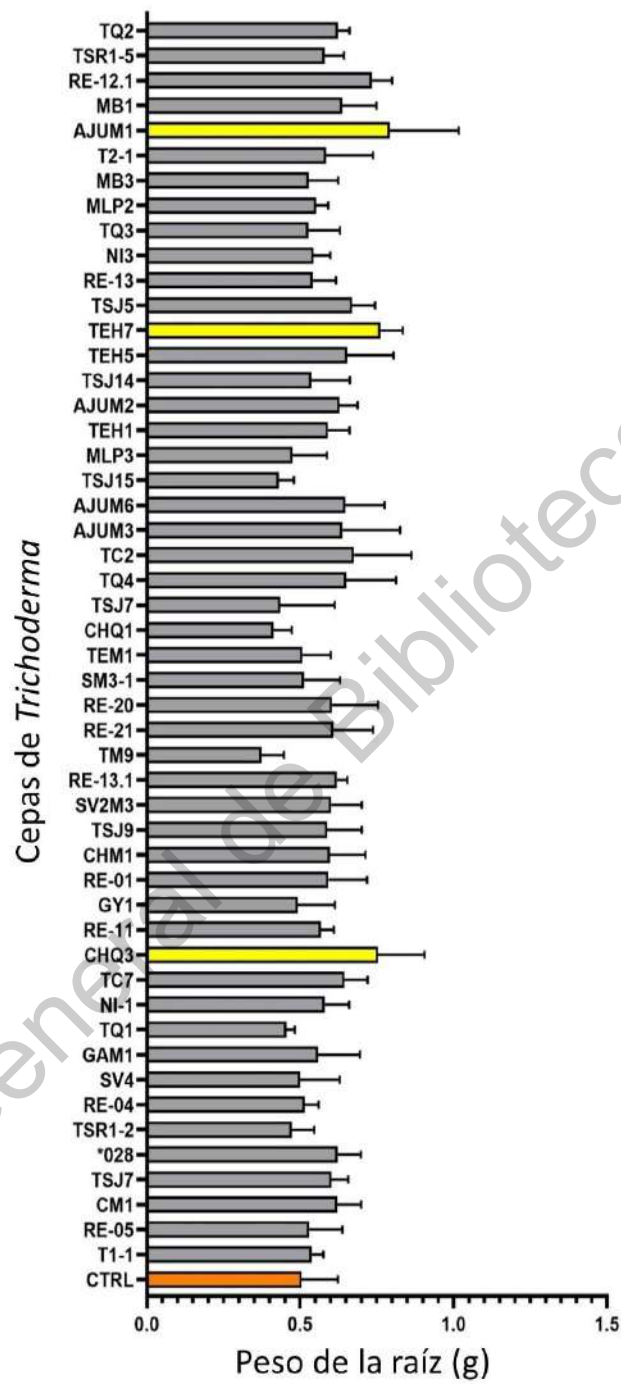


Figura 26. Cepas de *Trichoderma* promotoras del desarrollo de la raíz de tomate. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 0.05 % de confiabilidad para la variable peso de raíz. Se muestra en color naranja la barra correspondiente al control y en color amarillo las barras de los tratamientos con diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) Dunnett test.

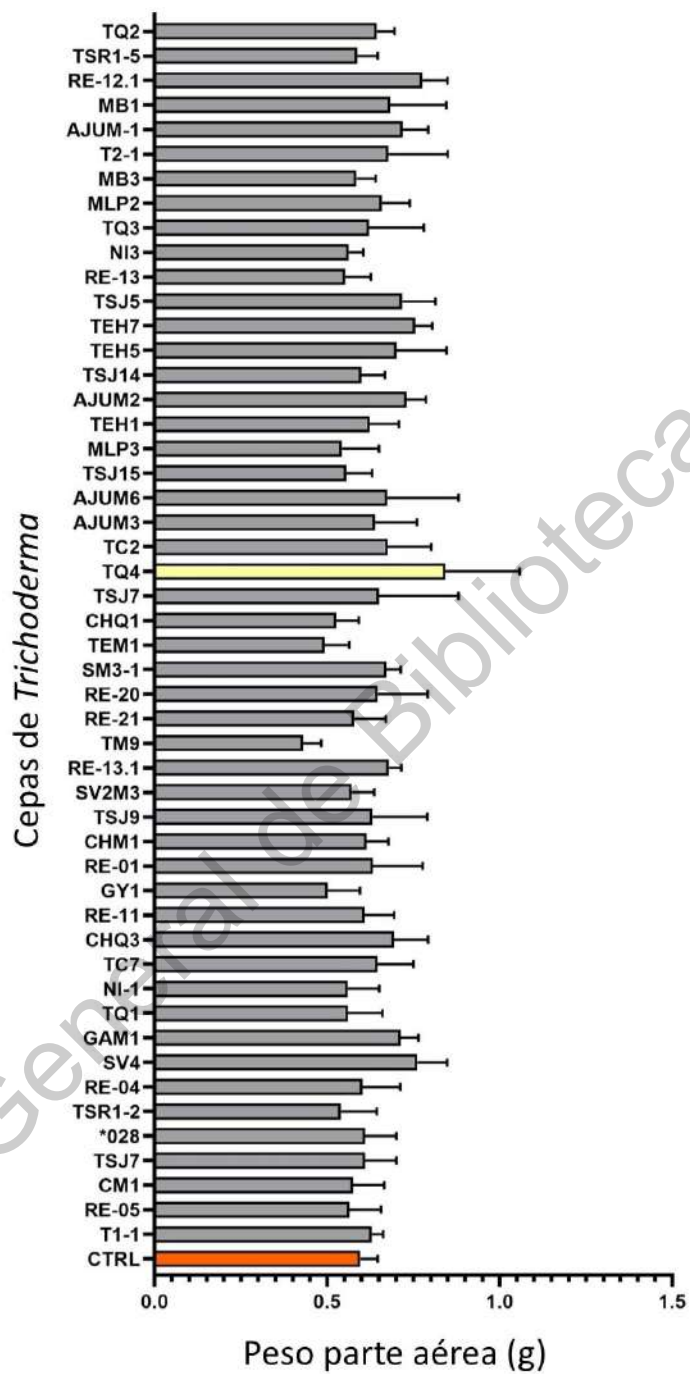


Figura 27. Cepas de *Trichoderma* promotoras de crecimiento de la parte aérea de la planta. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 0.05 % de confiabilidad para la variable peso de la parte aérea. Se muestra en color naranja la barra correspondiente al control y en color amarillo claro las barras de los tratamientos con diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) Dunnett test.

7.6 Interacción *in vitro* de *Trichoderma-gfp* vs *R. solani*

7.6.1 Pruebas de concentración mínima inhibitoria

Para realizar la manipulación genética de las cepas, como es el marcaje con genes reporteros que codifican proteínas fluorescentes, y efectuar de forma diferencial la interacción con sus hospederos, es importante determinar la sensibilidad de las cepas a los antibióticos comúnmente utilizados en protocolos de transformación genética. Actualmente, los más empleados son la higromicina-B (*hyg-b*) y la nourseotricina (NTC), que inhiben la síntesis de proteínas, para los cuales existen plásmidos con los genes que confieren resistencia en los hongos. Otro marcador de selección utilizado en hongos es el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (Finale, Bayer).

De las 17 cepas de *Trichoderma* que se evaluó su concentración mínima inhibitoria a los antibióticos: higromicina-B (Sigma-Aldrich), nourseotricina (GoldBio) y glufosinato de amonio (Finale-Bayer), se detectaron seis cepas silvestres que fueron sensibles a los tres antifúngicos y en dosis bajas, estas corresponden a: *T. harzianum* AJUM1, *T. atroviride* CM1, *T. tomentosum* MB3, *T. asperellum* NI-1, *T. koningiopsis* RE-11 y *T. atrobrunneum* SV4, a estas se sumó la cepa de referencia *Trichoderma atroviride* IMI206040. En la Tabla 24, se muestran las concentraciones específicas a las cuales se inhibieron las 17 cepas silvestres más la cepa de referencia.

7.6.2 Comprobación de los plásmidos pPK2-NTC y pPK2-Bar-eGFP por electroforesis en gel

Los plásmidos pPK2-NTC y pPK2-eGFP que fueron proporcionados por el Dr. Israel Padilla Guerrero, de la Universidad de Guanajuato, se multiplicaron y se purificaron, y se corroboró su presencia por restricción según su tamaño. Para el plásmido pPK2-NTC se emplearon las enzimas de restricción EcoRI y XbaI, la electroforesis muestra las bandas cortadas y lineales correspondientes al tamaño del plásmido lineal. En ambas se observa el tamaño esperado de 8329 bp, que corresponde al teórico (Figura 3 y 28). El plásmido pPK2-Bar-eGFP, se analizó por restricción con

las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, el patrón de restricción obtenido mediante electroforesis muestra las bandas correspondientes al tamaño esperado de 9739 bp que corresponde al indicado en el mapa plasmídico (Figura 4 y 28). El plásmido pcB-1004 y pUE10 H1:*gfp* se tenían previamente concentrados y purificados por lo cual no se realizó el mismo procedimiento para ellos.

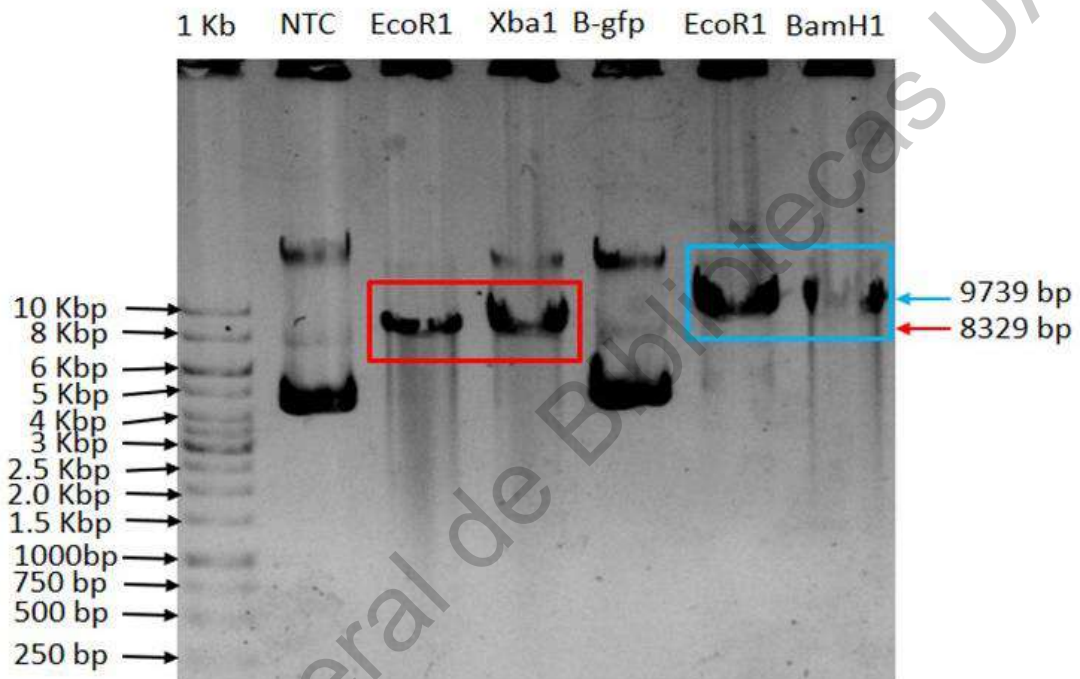


Figura. 28. Análisis de restricción de los plásmidos pPK2-NTC y pPK2-Bar-eGFP. Gel de agarosa al 1 % mostrando el tamaño de los plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción indicadas

7.6.3 Transformación de las cepas silvestres seleccionadas con los plásmidos pCB1004, pUE10 H1:*gfp*, pPK2-NTC y pPK2-Bar-eGFP.

De las 6 cepas silvestres, la única que logró generar protoplastos con la enzima lítica, fue la cepa NI-1 *T. asperellum*. Debido a esta condición, se eliminaron en esta etapa las otras 5 cepas y se procedió a hacer la transformación de la cepa NI-1 con los cuatro plásmidos.

Tabla 23. Concentración mínima inhibitoria de higromicina-B, glufosinato de amonio, y nourseotricina para 18 cepas de *Trichoderma*.

Cepa	Especie	Concentración en mg ml ⁻¹		
		Hyg-b	Finale	NTC
IMI206040	<i>T. atroviride</i>	100	200	200
AJUM1	<i>T. harzianum</i>	50	400	50
AJUM2	<i>Trichoderma</i> sp.	50	600	N/I- 100 *
CHQ1	<i>T. koningiopsis</i>	50	1000	50
CM1	<i>T. atroviride</i>	50	100	100
MB3	<i>T. tomentosum</i>	50	200	50
MLP3	<i>T. atroviride</i>	50	600	N/I- 100
NI-1	<i>T. asperellum</i>	50	600	100
NI3	<i>Trichoderma</i> sp.	50	600	N/I- 100 *
RE-04	<i>T. koningiopsis</i>	200	800	N/P **
RE-05	<i>T. koningiopsis</i>	50	400	N/I- 100 *
RE-11	<i>T. koningiopsis</i>	200	200	50
RE-13.1	<i>T. koningiopsis</i>	200	1000	N/P **
RE-21	<i>T. tomentosum</i>	200	200	100
SV4	<i>T. atrobrunneum</i>	50	400	100
TEH5	<i>T. asperellum</i>	50	400	N/I- 100
TM9	<i>T. atrobrunneum</i>	100	800	N/I- 100
TSJ6	<i>T. harzianum</i>	50	400	100

N/I = No inhibido a la concentración señalada; **N/P**= No probado, debido a que las pruebas que les precedieron ya requerían de dosis elevadas para su inhibición y fueron descartadas

La cepa NI-1 se logró transformar con 10 µg de los plásmidos pCB1004 y pUE10 H1:*gfp* con resistencia a higromicina-B y con el plásmido pPK2-NTC con resistencia a nourseotricina (NTC). Sin embargo, no fue posible transformar esta cepa con el plásmido pPK2-Bar-eGFP, aún cuando la cepa es sensible al herbicida glufosinato de amonio. La formación de colonias transformantes resistentes a los antibióticos higromicina-B y NTC fue muy abundante solo cuando en la mezcla de

transformación se incluyeron los respectivos plásmidos (Figura 29, tratamiento = T). En la primera columna de fotografías, de izquierda a derecha, se observa el control positivo de viabilidad de protoplastos (control+), el cual no contiene antibiótico ni plásmido, comprobando la integridad de los protoplastos. En la segunda columna de fotografías, de izquierda a derecha, se observa el control negativo (control-), sin plásmido y con antibiótico, se aprecia que no hay crecimiento de colonias por no poseer el plásmido que confiere resistencia para su desarrollo en el medio selectivo. Los resultados mostrados claramente demuestran que se obtuvo una transformación muy eficiente de la cepa NI-1 de *T. asperellum* utilizando los marcadores de selección a higromicina-B y NTC (columnas de la derecha).

7.6.4 Comprobación de la cepa transformada NI-1 *T. asperellum* pUE10 H1:*gfp* mediante microscopia confocal.

El marcaje molecular con el gen reportero que condifica para la proteína verde fluorescente *gfp*, se comprobó por microscopia de fluorescencia confocal, mediante el análisis de imágenes. El plásmido pUE10 H1:*gfp* posee el gen *gfp* aclopadado a la histona H1, la cual forma parte de la cromatina responsable del empaquetamiento del ADN en el núcleo, razón por la cual se le ve como un proteína de localización nuclear al momento de observar la fluorescencia verde al microscopio confocal. Se tomaron fotografías de segmentos de hifas que expresaban la proteína verde fluorescente en la zona del núcleo, las imágenes en 2D se pueden observar a detalle en la Figura 30, y en la Figura 31, se observa un fragmento en 3D, mostrando una abundancia de nucleos marcados.

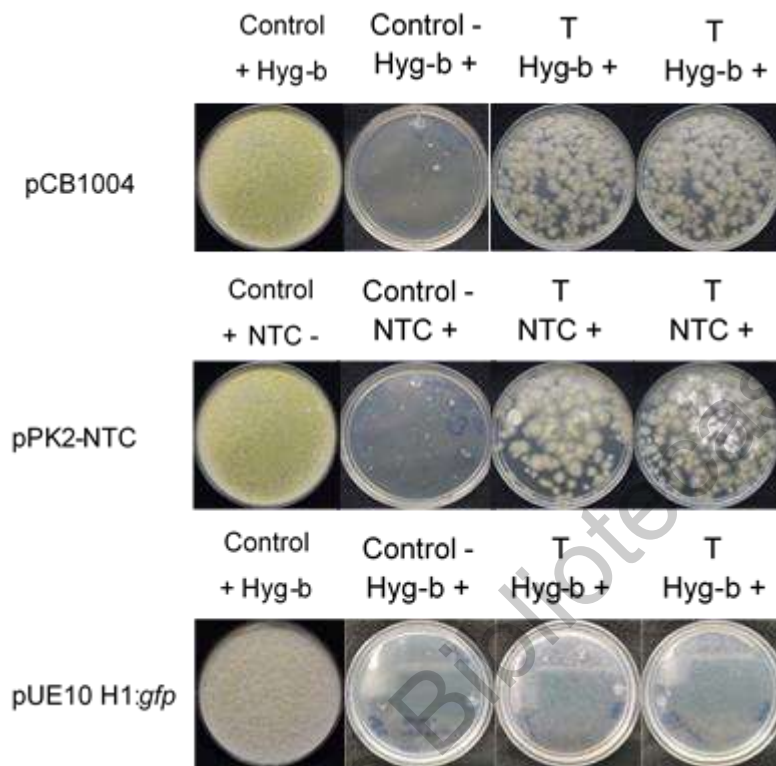


Figura 29. Fotografías de la transformación de NI-1 *T. asperellum* con los plásmidos pCB1004, pPK2-NTC y pUE10-H1-*gfp*. Control +: prueba de viabilidad de los protoplastos en PDA sin antibiótico. Control -: protoplastos tratados con solución osmótica sin incluir plásmido, se cultivaron en medio selectivo. T: protoplastos tratados con plásmido fueron cultivados en medio selectivo.

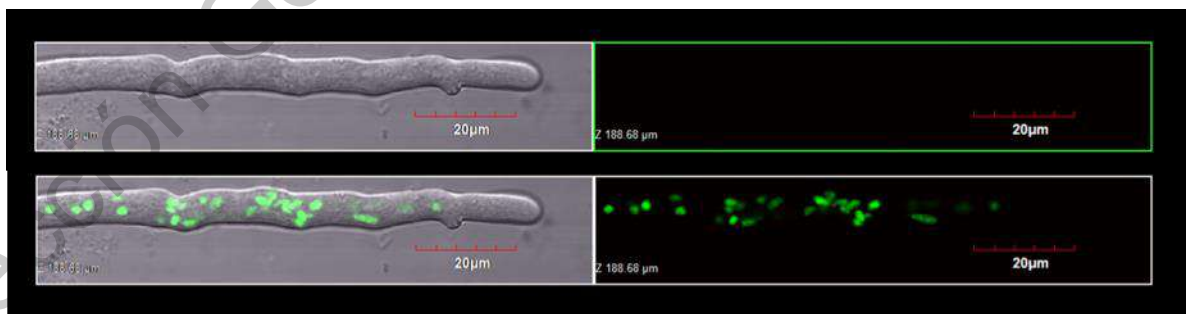


Figura 30. Hifa de *T. asperellum* NI-1, expresando la proteína verde fluorescente acoplada a la histona H1. Visualización al microscopio confocal de un segmento de una hifa con núcleos marcados con Gfp, microscopía de contraste diferencial interferencial y confocal en distintas combinaciones. Escala de Bar 20μm.

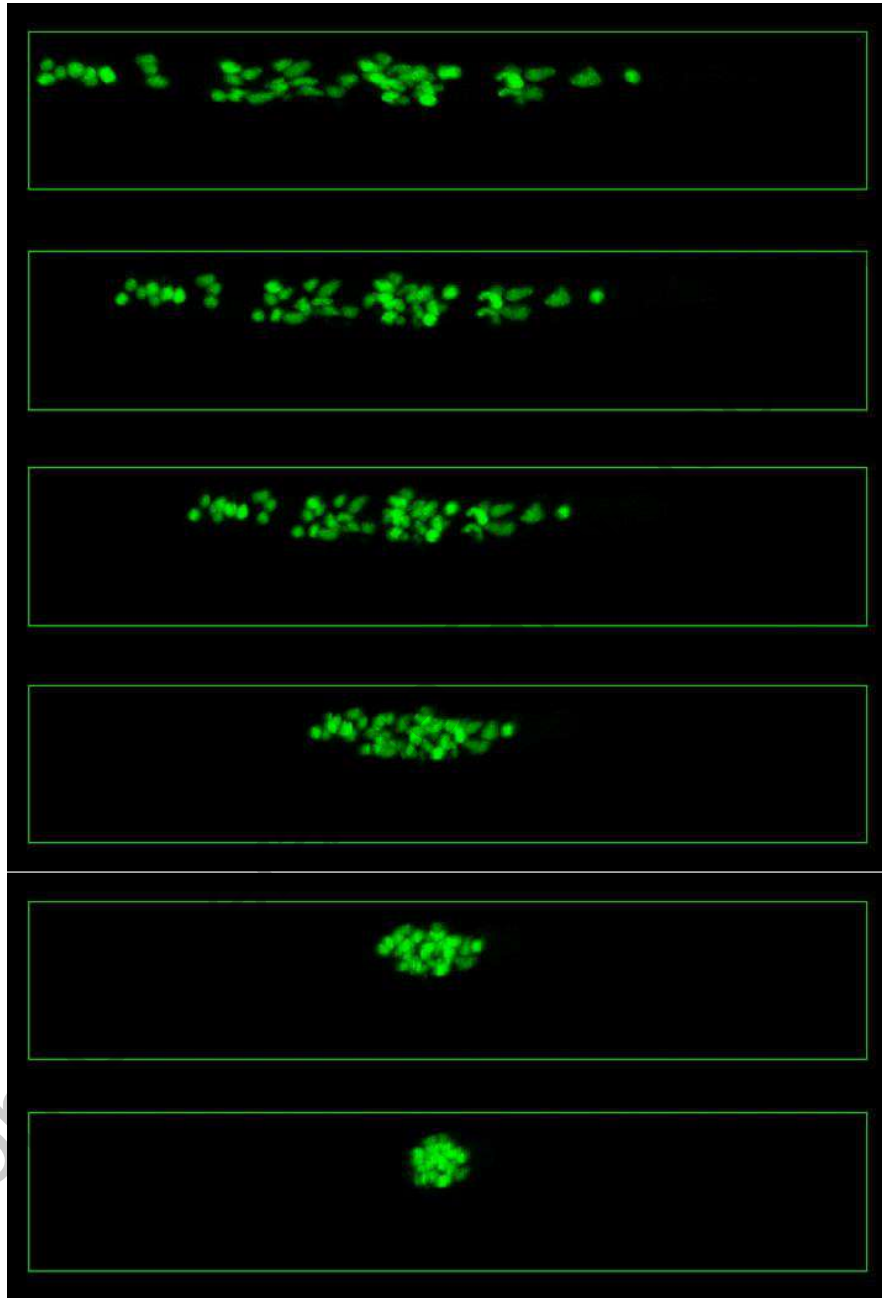


Figura 31. Segmento de una hifa en 3D, vista al microscopio confocal. Los puntos verdes observados son núcleos marcados del fragmento de una hifa. En el recuadro superior se observan núcleos marcados con Gfp en forma horizontal, posteriormente de manera secuencial y descendente ese fragmento gira en sentido contrario a las manecillas del reloj, hasta finalmente en el último recuadro alcanzar un giro de 90°.

7.6.5 Análisis microscópico de la interacción *Trichoderma* vs *R. solani*

Como resultado del experimento de interacción *Trichoderma*-patógeno, se obtuvieron dos videos de la interacción en tiempo real, tomados con el microscopio de fluorescencia confocal Olympus FV1000. Un video es de la interacción de *Trichoderma* H1:*gfp* vs *Rhizoctonia solani*, en condiciones *in vitro*, y el otro se realizó con la cepa de referencia IMI206040 de *T. atroviride* H1:*gfp*. vs *R. solani*.

Para fines de ilustrativos se agregan los videos en imágenes tomadas a cada cinco minutos de su evolución.

En la Figura 32 a-f, se muestra la zona de la interacción de *T. asperellum* H1:*gfp* vs *Rhizoctonia solani*, observando hifas del fitopatógeno dañadas y con autofluorescencia, así como un aparente derrame del citoplasma de *R. solani*, (Figura 32-b) indicando que *T. asperellum* afecta a distancia a este fitopatógeno. Las hifas de *Trichoderma* crecieron durante todo el periodo del video sin ninguna alteración en su ritmo y morfología, además se logró observar la migración nuclear durante el crecimiento micelial, por otro lado, el hongo *R. solani* no logró crecer durante todo el periodo de observación. No se logró observar las estructuras especializadas como enrollamiento de hifas y formación de estructuras tipo apresorio durante la interacción de *T. asperellum* vs *R. solani*.

Con respecto a la interacción de *T. atroviride* H1:*gfp*. vs *R. solani*, se observaron hifas vacuoladas y evidentemente dañadas, sugiriendo que ambas especies de *Trichoderma* generan efectos similares contra el patógeno (Figura 33). El crecimiento de *Trichoderma* fue continuo durante todo el periodo de la grabación mientras que el hongo fitopatógeno detuvo su crecimiento.

Además, se observó que, cada vez que una hifa de *Trichoderma* hacia contacto con otra hifa de *R. solani*, la hifa del micoparásito cambiaba el sentido de crecimiento, siguiendo la misma dirección que la hifa del fitopatógeno y adherida a él, justo cuando el contacto se daba y se adhería, observando un flujo citoplasmático en las

células del fitopatógeno, quizá debido a la presión que el micoparasito ejerce sobre el fitopatógeno.

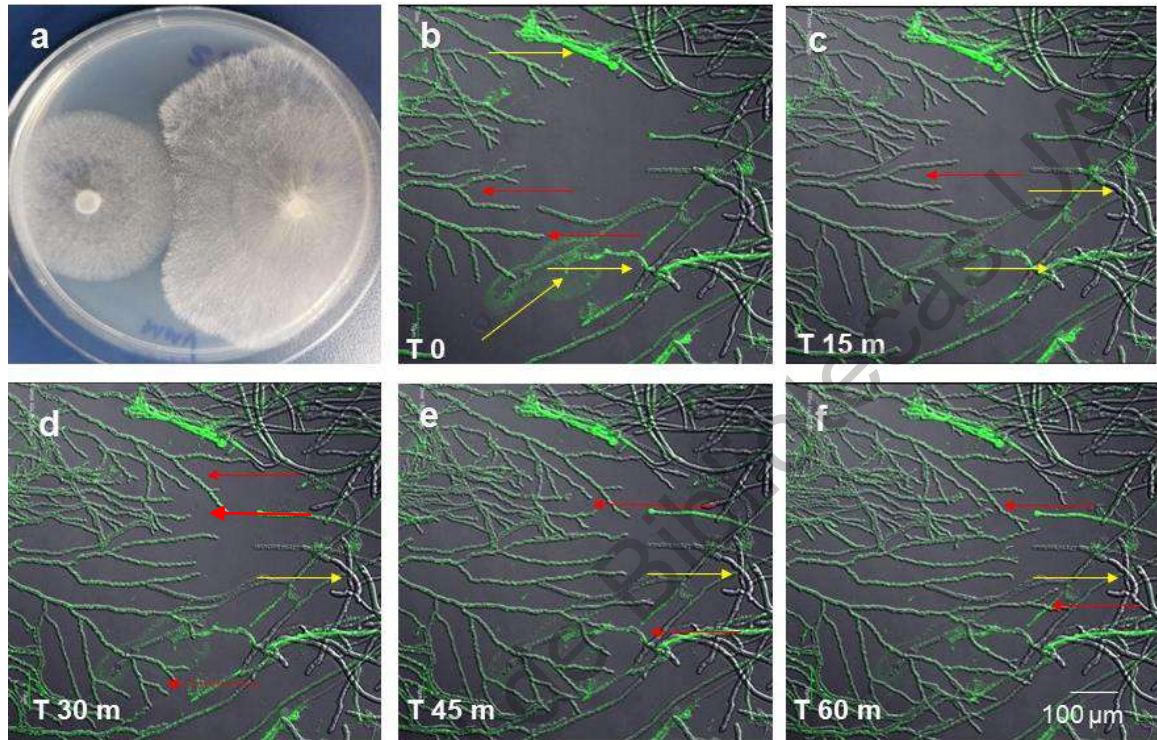


Figura 32. Interacción de *T. asperellum* H1:gfp vs *R. solani*. a) cocultivo de *T. asperellum* H1:gfp vs *R. solani* en medio de cultivo PDA donde se observa el momento de la interacción de ambos hongos. b-f) Zona de interacción de *T. asperellum* – *R. solani*, respectivamente, mostrando hifas con núcleos marcados con Gfp (filamentos con puntos verdes) indicados con flecha roja y las flechas amarillas señalando las hifas de *R. solani*, dañadas y con autofluorescencia, así como vaciamiento citoplasmático. La zona de interacción se analizó durante 0 (b), 15 (c), 30 (d), 45 (e) y 60 min (f). Escala 100 µm.

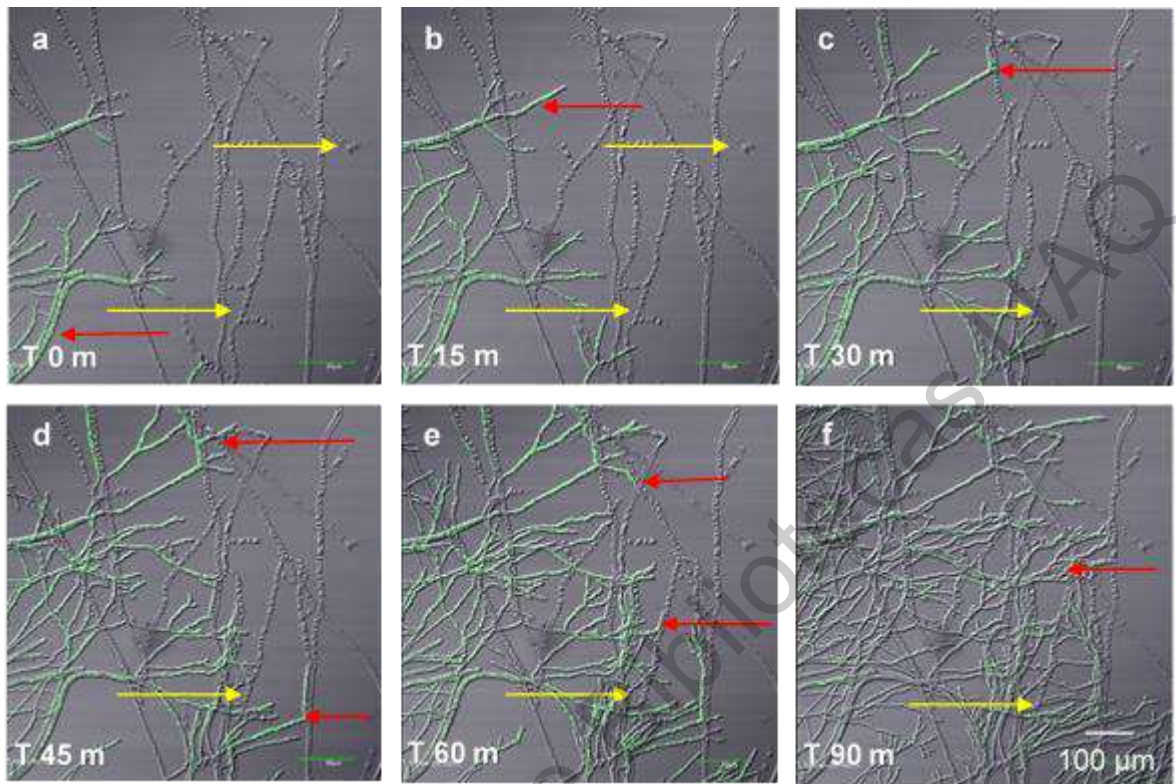


Figura 33. Interacción de *T. atroviride* H1:gfp vs *R. solani*. a-f) tiempo de inicio de la toma del video, izquierda señalado con rojo, la cepa IMI206040 *T. atroviride* H1:gfp, y a la derecha, señalado en amarillo la cepa de *R. solani*. Se observa el crecimiento progresivo de la cepa etiquetada, por otro lado, las hifas dañadas, vacuoladas y con movimiento citoplasmático al momento del contacto de los hongos. La zona de interacción se analizó durante 0 (a), 15 (b), 30 (c), 45 (d), 60 (e) y 90 min (f). Escala 100 µm.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Efecto antagónico de 65 cepas de *Trichoderma* sobre siete hongos fitopatógenos

8.1.1 Antagonismo *in vitro* por micoparasitismo

La inhibición del crecimiento de dos organismos interactuando en el mismo medio de cultivo, es atribuida a la liberación de metabolitos de uno o de ambos organismos, afectándose entre sí, dándose la competencia por espacio y nutrientes, la obstrucción mecánica y el hiperparasitismo (Tapwal *et al.* 2015). El micoparasitismo es un proceso de ataque directo de un hongo sobre otro, fenómeno de alta complejidad que involucra varios pasos, desde el reconocimiento y el crecimiento quimiotropico positivo, la producción y liberación de enzimas hidrolíticas, hasta la penetración, alimentación y muerte de otros hongos, por lo tanto, este fenómeno biológico resulta ser un potencial método de control de hongos fitopatógenos (Harman *et al.* 2004). En el presente estudio, observamos que las cepas de *Trichoderma*, nativas del estado de Querétaro poseen capacidad para controlar hongos fitopatógenos de tomate de importancia económica, ya sea sobrecreciendo (micoparasitando), o inhibiendo su crecimiento por la acción de compuestos volátiles y de metabolitos difusibles de medio de cultivo sólido.

El efecto antagónico por micoparasitismo en cultivos duales *in vitro* mostró ser altamente eficiente para suprimir el crecimiento de los siete hongos fitopatógenos probados, de acuerdo a la escala de Bell utilizada para medir este efecto, y considerando como las mas eficientes la clase I y clase II, excelentes y buenas micoparasíticas respectivamente, podemos inferir que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* poseen la capacidad de afectar a los siete patógenos de tomate ya que el mayor porcentaje de cepas se ubicó dentro de este nivel.

Aunque todos los hongos fitopatógenos presentaron susceptibilidad a ser micoparasitados se presentaron algunas diferencias en la cantidad de cepas ubicadas en cada clase, en el caso del hongo *P. capsici* fue altamente sensible al

micoparasitismo, solo 1 cepa de las 65 fue clase II y el resto (64) fueron clase I, indicando una alta supresión de este fitopatógeno por las cepas de *Trichoderma*, dichos resultados coinciden con los de Bell *et al.* (1982) quienes probaron 77 aislados de *Trichoderma* contra varios hongos fitopatógenos, entre ellos *Phytophthora parasitica* y señalan que mas del 90 % de las cepas de *Trichoderma* se ubicaron en la clase I, en este trabajo los resultados con *P. capsici* arrojaron evidentes similitudes del micoparasitismo. Por otro lado, los mismos autores, reportan el agrupamiento de las cepas de *Trichoderma* evaluadas contra el hongo *R. solani* de los grupos anastomósicos AG-1, 2, 3 y 4, de los cuales *R. solani* AG-3 tiene un comportamiento muy similar con *R. solani* aquí evaluado, ya que reportan que las cepas de *Trichoderma* se ubicaron en los niveles I, II y II y en proporciones coincidentes al comportamiento observado en este trabajo. Además, probaron una cepa de *S. rolfsii* y los resultados son parecidos a los encontrados en este trabajo ya que se agruparon las cepas en las cinco clases de la escala de Bell y en la misma proporción, estos datos ratifican un patrón de comportamiento extremadamente similar en la actividad micoparasitica de cepas de *Trichoderma* sobre el hongo *S. rolfsii*. Cabe señalar que el crecimiento micelial de este hongo de tipo rizomorfo y su rápida velocidad de crecimiento le confiere ventaja sobre los otros fitopatógenos evaluados que poseen un crecimiento más lento y a ras del medio de cultivo, *S. rolfsii* logró sobrecrecer algunas cepas de *Trichoderma*, es decir que tuvieron actividad micoparsítica nula, siendo el único de los siete que presentó este fenómeno, además de observarse algunas cepas de *Trichoderma* con el micelio deshidratado en la zona de contacto, de la misma manera algunas cepas de *Trichoderma* habían sido invadidas o sobrecrecidas por *S. rolfsii* a los siete días pero tiempo después, siete días posteriores, se observó que el micelio de *S. rolfsii* se desintegraba después de formar estructuras de resistencia (esclerocios) y depositarlos encima del micelio de *Trichoderma*, según lo señalado por Bell *et al.* (1982) este proceso es indicador de la muerte micelial.

Las cepas de *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* presentaron una susceptibilidad similar, ya que las cepas de *Trichoderma* fueron capaces de micoparasitarlos en clase I y II y una baja proporción se ubicó en la clase III, para el caso de *B. cinerea* y *A. alternata* fueron sobrecrecidas en los niveles I y II mostrando una alta sensibilidad a ser micoparasitados por *Trichoderma* spp.

Aunque se observa un patrón general de micoparasitismo exitoso por parte de las cepas de *Trichoderma*, hubo algunas variaciones con cada hongo fitopatógeno al que se confrontaban, diversos estudios señalan la especificidad de los hongos para que se lleve a cabo este proceso de biocontrol con éxito, siendo los principales determinantes el hospedero y las condiciones ambientales. Conjuntamente, la expresión de genes y las actividades hidrolíticas utilizadas para atacar un hongo podrían ser diferentes a las empleadas para otro de género o especie diferente. Por ejemplo, en *T. atroviride*, la eliminación del gen *ech42* no mostró ningún cambio en su capacidad para atacar a *Pythium ultimum* o *S. rolfsii*, pero sí cambió su capacidad para atacar el fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Carsolio *et al.* 1994; Woo *et al.* 1999). Consistente con la literatura, nuestros resultados indican que *Trichoderma* utiliza diferentes estrategias de ataque con diferentes hongos fitopatógenos como se observó con la presencia de cepas de amplio espectro micoparasítico como fue el caso de las cepas AJUM2 de *Trichoderma* spp. y MB1 de *T. atroviride*, mientras que otras fueron específicas para unos fitopatógenos. Es importante resaltar que *Trichoderma* presenta mayor capacidad de micoparasitar a *P. capsici*, seguido de *B. cinerea* y *A. alternata*.

8.1.2 Antagonismo *in vitro* por compuestos volátiles

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen compuestos volátiles, como el acetaldehído, etileno, acetona y dióxido de carbono (Siddiquee *et al.* 2012). Se han detectado más de 480 compuestos volátiles producidos por cepas de *Trichoderma*, siendo el compuesto 6-pentil- α -pirona, uno de los primeros compuestos aislados e identificados de este género fúngico (Vinale *et al.* 2008; Siddiquee, 2014). Algunos de estos compuestos, fueron dañinos para hongos fitopatógenos, indicando que los

compuestos volátiles juegan un papel importante en el biocontrol (Morath *et al.* 2012; Contreras-Cornejo *et al.* 2014; Li *et al.* 2018).

En el presente trabajo se corroboró dicho efecto contra cinco de siete hongos fitopatógenos probados. Los hongos *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. capsici* y *R. solani* fueron los que presentaron mayor inhibición a distancia por algunas cepas de *Trichoderma* y aunque en menor medida, también *S. rolfsii* presentó susceptibilidad en la inhibición de crecimiento por algunas cepas de *Trichoderma*.

A su vez los hongos *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, fueron los menos susceptibles al estar expuestos a los compuestos volátiles, ya que continúan creciendo de forma lenta pero constante y no parecen ser afectados en gran medida por las diferentes especies de *Trichoderma* analizadas en este trabajo. Existen reportes de como algunos hongos fitopatógenos también poseen mecanismos bioquímicos de resistencia y defensa. Por ejemplo, con el uso de técnicas analíticas de perfiles de compuestos orgánicos volátiles de *T. atroviride*, se lograron identificar 25 diferentes moléculas dentro de las cuales, correspondían a alcoholes, ketonas, alcanos, furanos, pironas, monoterpenos y sesquiterpenos. Los análisis mostraron diferencias en los diferentes tiempos de cultivo, además de que en presencia de ácido fusárico, metabolito secretado por especies de *Fusarium*, el perfil de compuestos volátiles cambiaba inhibiéndose la síntesis de al menos cuatro de los metabolitos mencionados y los otros tres seguían produciéndose (Stoppacher, 2010). Considerando la información anterior podemos hipotetizar que las cepas menos sensibles poseen mecanismos de defensa y tolerancia que les hacen soportar o contrarrestar el efecto de los compuestos volátiles que *Trichoderma* produce.

El hongo *S. rolfsii* presentó patrones variados de crecimiento al ser expuesto a los compuestos volátiles emitidos por *Trichoderma* spp., como inhibición o contrariamente, casos de estimulación de crecimiento, similar a los fitopatógenos *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*.

Las propiedades de biocontrol de *Trichoderma* spp. se conocen muy bien, pero se desconocen las funciones de los compuestos volátiles que interactúan e inhiben los hongos patógenos de las plantas. Además de las diferencias genéticas entre las cepas, las variaciones en los perfiles de compuestos volátiles, también podrían deberse a discrepancias en la disponibilidad de nutrientes, la etapa de desarrollo de los hongos y la técnica (Weikl *et al.* 2016; Nieto-Jacobo *et al.* 2017; González-Pérez *et al.* 2018). El número de cepas de *Trichoderma* que afectaron el crecimiento de fitopatógenos por compuestos volátiles fueron menores que el número de cepas que antagonizan por micoparasitismo y metabolitos difusibles, por otro lado, se observaron cepas de la misma especie con efectos diferentes, indicando como en el caso del micoparasitismo, que la biología de cada cepa es distinta, aunque pertenezcan a la misma especie, dicha observación coincide con lo reportado por Raut *et al.* 2014 donde señalan que la actividad antagónica de *Trichoderma* está basada en diferentes mecanismos, directos e indirectos, y el proceso de biocontrol depende de la cepa utilizada, el hospedero, la características de la planta (hospedero) y condiciones ambientales.

De manera general y con base a los dos análisis realizados, ANOVA-Tukey y comparación de listas de cepas inhibitorias del crecimiento de fitopatógenos en determinado corte porcentual, podemos seleccionar las cepas que tienen un efecto específico sobre un patógeno determinado por la aproximación estadística, y por otro lado, con la aproximación de comparación de listas, podemos seleccionar las cepas que tienen un efecto inhibitorio para el mayor rango de fitopatógenos, de tal manera que las estrategias para el control biológico estén diseñadas combinando la cepas específicas de patógenos, con las de mayor espectro de acción. En esta vertiente, las cepas NI-1 de *T. asperellum* y AD3 de *T. atroviride* mostraron una capacidad antagónica por volátiles de amplio espectro, sin embargo, fue evidente que *Trichoderma* fue más efectivo para inhibir a distancia a *B. cinerea*, seguido de *A. alternata*.

8.1.3 Antagonismo *in vitro* por metabolitos difusibles

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen compuestos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por medio del antagonismo hacia otros microorganismos. Vey *et al.* (2001) describieron la producción de ácido harzianico, alameticinas, tricolin, peptaiboles, 6-pentil-pirona, massoilactona, viridina, glioviridina, glisopreninas, ácido heptelidico entre otros, estos compuestos difusibles con capacidad antibiótica producidos por *Trichoderma* inhiben el crecimiento de otros microorganismos.

En esta investigación, los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. mostraron ser más efectivos para inhibir el crecimiento de los siete hongos fitopatógenos probados en condiciones *in vitro*, considerándose como un modo de acción más eficiente que la vía de los compuestos volátiles descrito anteriormente. El hongo *R. solani* fue altamente sensible e inhibido por 63 de las 65 cepas de *Trichoderma* con diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$) con respecto al control. El hongo *C. gloeosporioides*, que por compuestos volátiles no había sido susceptible de inhibición en su crecimiento, lo fue por la acción de los metabolitos difusibles siendo el segundo más afectado de acuerdo a los análisis estadísticos realizados para evaluar las diferencias entre los tratamientos (cepas de *Trichoderma*). Por otro lado, el hongo *S. rolfsii* fue también afectado por los metabolitos difusibles en el medio de cultivo, en el experimento de micoparasitismo y de compuestos volátiles no fue antagonizado de manera muy severa, sin embargo, por esta vía mostró una sensibilidad muy marcada a los metabolitos de algunas cepas de *Trichoderma*.

Por su parte, *B. cinerea* también presentó sensibilidad a los metabolitos difusibles, siendo afectado en su crecimiento por diferentes cepas de *Trichoderma*. A su vez, el comportamiento de las cepas de *P. capsici* y de *A. alternata* fue muy similar entre ellos, agrupando casi el mismo número de cepas que las afectó en su crecimiento y el menos afectado fue *F. oxysporum*, este fue el más resistente a la acción de los metabolitos liberados por cepas de *Trichoderma*.

Las especies eficientes en esta prueba fueron, *T. atroviride* (la más abundante), *T. koningiopsis*, *T. atrobrunneum*, *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. tomentosum*,

incluyendo tres cepas identificadas a nivel de género que pueden representar nuevas especies para el género *Trichoderma* con potencial de biocontrol.

De los análisis realizados en las pruebas de micoparasitismo, compuestos volátiles y metabolitos difusibles, podemos proponer como las mejores cepas para validar su potencial en el control biológico de enfermedades de jitomate la cepa MB1 de *T. atroviride* debido a que presentó excelente actividad micoparasítica y eficiente por acción de metabolitos difusibles, también la cepa NI-1 *T. asperellum* fue de las mejores antagonistas por compuestos volátiles y por metabolitos difusibles. La comparación de listas en total arrojó 19 cepas de *Trichoderma*, pero únicamente las dos cepas antes citadas presentan las mejores características, el resto se encuentra afectando a los hongos fitopatógenos fuertemente únicamente por una vía de antagonismo. En conclusión, nuestros resultados muestran que un número reducido de cepas reúnen la mayoría de las características deseables para el control biológico.

De manera general, la comparación de listas de las cepas y utilizando el criterio de inhibición en porcentaje y la escala de micoparasitismo de clase I, nos da la información para detectar las cepas que tienen un efecto antagonista con mayor espectro de acción y, por otro lado, la evidencia estadística nos da la información específica de cuáles cepas están afectando fuertemente a cada fitopatógeno. Los resultados nos permiten seleccionar las cepas, de acuerdo a objetivos particulares, y se pueden hacer combinaciones de éstas para cubrir el mayor espectro de hongos fitopatógenos antagonizados y con la mayor eficacia.

Finalmente, podemos destacar que las cepas de *Trichoderma* poseen capacidad de antagonizar a hongos fitopatógenos, y que la versatilidad metabólica de este género, permite asegurar en cierta medida el biocontrol ya que poseen diversos mecanismos de acción que trabajan de manera simultánea y no de forma aislada. El presente trabajo corrobora lo expuesto por numerosos estudios que han probado el estatus de *Trichoderma* como un agente exitoso de control biológico (Bell *et al.* 1982; Burahogain *et al.* 2000; Tapwal *et al.* 2004, 2015; Chen *et al.* 2016). Es importante destacar que nuestros resultados proyectan un mayor potencial de

aplicaciones de estas cepas en el control biológico de enfermedades en los sistemas de producción agrícola al considerar que los fitopatógenos analizados aquí tienen un amplio espectro de hospederos y son un problema fuerte en cientos de cultivos de importancia económica (Ralph *et al.* 2012).

8.2 Actividad solubilizadora de nutrientes

8.2.1 Solubilización de fosfato tricálcico en medio líquido

El fósforo es uno de los nutrientes limitantes para el crecimiento de los cultivos, solo el 0.1 % del total del fósforo presente en los suelos está disponible para las plantas (Vessey y Heisinger 2001). Los organismos solubilizadores de fosfatos juegan un papel importante en la fertilidad de los suelos, cuando la disponibilidad de fósforo es baja o la demanda alta (Wakelin *et al.* 2012). El efecto benéfico de varias especies de hongos fosfolubilizadores sobre cultivos ha sido demostrado, como es el caso de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* (Mittatl *et al.* 2008; Zayed y Abdemotaal 2005; Reyes *et al.* 2002). Las cepas de *Trichoderma* probadas en este trabajo, mostraron la capacidad de solubilizar e incorporar a su metabolismo el fosfato ya que tuvieron capacidad de crecer y esporular en el medio de cultivo Pikovskaya-agar pero no se presentaron los halos traslucidos que permiten realizar una evaluación semicuantitativa. Considerando lo señalado por Bashan *et al.* (2013), este método no es universal para la determinación de solubilización de fosfatos, ya que existen reportes donde organismos que no forman el halo traslucido de solubilización en el medio sólido adicionado con Ca_3PO_4 , si es detectado en medio de cultivo líquido por métodos colorimétricos.

Por lo anterior, se determinaron los fosfatos solubles a partir de fosfato tricálcico mediante el análisis colorimétrico. La capacidad de solubilización de las cepas de *Trichoderma* fue de 0.100 mg L⁻¹ hasta 1.2 mg L⁻¹, sin embargo, estas concentraciones son relativamente bajas comparado con el trabajo de Rudresh *et al.* (2005) donde evaluaron 9 cepas de *Trichoderma*, entre ellas especies de *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens* y *T. hamatum*, la capacidad solubilizadora de fosfatos fue de 6.26 mg L⁻¹ hasta 9.0 mg L⁻¹, en *T. harzianum* y *T. virens* respectivamente.

Por otro lado, França *et al.* (2017) reportaron resultados similares con 17 cepas de *Trichoderma*, que van desde los 7.0 mg L⁻¹ hasta 11.0 mg L⁻¹. Sin embargo, entre los trabajos existen diferencias en las condiciones de cultivo, inoculos usados y el tiempo de incubación de las cepas de *Trichoderma*, indicando que las diferentes aproximaciones no permiten comparar las capacidades solubilizadoras documentadas con los resultados generados en este trabajo. Mejorar las condiciones de cultivo de las cepas de *Trichoderma* para corroborar las concentraciones de P soluble producido en medio de cultivo líquido, es una alternativa para hacer una mejor discriminación de la eficiencia solubilizadora de las cepas nativas del estado de Querétaro.

El mecanismo por el cual los microorganismos del suelo solubilizan P, incluyen, la liberación de complejos que disuelven minerales, como aniones de ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo, CO₂, producción y liberación de enzimas extracelulares (fosfatasas) y la liberación de fosfato durante la mineralización (McGil y Cole, 1981). Además, se ha descrito que los hongos son excelentes colonizadores de la rizosfera, actuando como endófitos que pueden establecer redes cubriendo grandes superficies entre el suelo y el sistema radicular de las plantas, representando una ventaja en la solubilización de fosfato. El mecanismo por el cual las cepas de *Trichoderma* estudiadas en este trabajo solubilizan el fosfato puede ser mediante al menos dos estrategias diferentes, secretando ácidos orgánicos al medio y fosfatasas previamente descrito (Gand, 2016).

8.2.2 Producción de sideróforos en medio CAS sólido y líquido

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (400-1000 kDa), sintetizados y liberados por bacterias, hongos y plantas, se producen en situaciones de baja disponibilidad de hierro en los suelos, tienen alta afinidad por quelar Fe³⁺ (Neilands, 1981, 1995; Raymond y Dertz, 2004; Skaar, 2010). Los sideróforos microbianos se clasifican como catecolatos, hidroxamatos y α -carboxilatos, dependiendo de la naturaleza química de sus sitios de coordinación con hierro (Winkelmann, 1990,

2002). Los sideróforos son benéficos para las plantas por que solubilizan el hierro no disponible, y a la vez, inhiben el crecimiento de otros microorganismos patógenos, limitándoles esta fuente nutrimental (Leong, 1986).

En el presente estudio se evaluó la capacidad de producir sideróforos en medio de cultivo específico para esta prueba, CAS-agar, de 50 cepas de *Trichoderma* de las cuales 46 cepas son sideróforo positivo y únicamente en cuatro cepas no se identificó la reacción positiva. Esta reacción se observa cuando alrededor de las colonias de los microorganismos en medio CAS-agar cambia de azul a naranja, producto de la quelación del hierro, retirado del complejo de la tintura azul (cromoazurol sulfonato S) del medio de cultivo. Respecto a los cambios de color por parte de las cepas de *Trichoderma*, en tres cepas se presentó una coloración color púrpura que después se torno a naranja-amarillo, y el resto fue color naranja-amarillo, Pérez-Miranda *et al.* (2007) mencionan que el tipo de cambio en la coloración corresponden a un grupo específico de sideróforos, para el caso de las reacciones en color púrpura corresponde al grupo de los catecoles y los virajes de naranja a amarillo, son del grupo de los carboxilatos. Un patrón similar lo reportaron Srivastava *et al.* (2018) que al evaluar 14 cepas de *Trichoderma*, encontraron algunas con cambios en la coloración del medio color púrpura-magenta y también casos de cepas negativas que no reaccionaron o produjeron sideróforos.

La reacción sideróforo positiva de cepas de *Trichoderma* también ha sido reportada por Bogumil *et al.* (2013), quienes analizaron las cepas Tr43 y Tr52, ambas de la misma especie. *T. atroviride*. Por otro lado, Qi y Zhao (2012), comprobaron la capacidad de la cepa Q1 *T. asperellum* de producir sideróforos en medio CAS-agar. Así mismo, Vinale *et al.* (2013) probaron una cepa de *T. harzianum* con capacidad de producir sideróros, estos trabajos previos confirman los resultados obtenidos en este ensayo. Nuestros resultados sobre el viraje de color sugieren que *Trichoderma* puede producir al menos dos tipos diferentes de sideróforos, catecoles y carboxilatos.

Por otro lado, en el ensayo de producción de sideróforos en medio líquido se logró identificar únicamente en 10 cepas de las 65 probadas, el resto 55 no fueron detectados. Los valores fueron desde 0.99 mg L⁻¹ hasta 19.15 mg L⁻¹. El resultado de que solo 10 cepas hayan presentado la producción no quiere decir que las demás cepas no producen sideróforos, únicamente es probable que las cantidades no sean tan elevadas como para originar los cambios de coloración en la tintura azul CAS, Machuca y Milagres *et al.* (2002), presentaron un panorama similar cuando probaron especies de *Aspergillus* sp., considerando como no detectables aquellas que habían producido cantidades menores a 10 % de unidades de sideróforos. Otra explicación, es que las condiciones de cultivo líquido o sólido tengan un impacto en la producción de sideróforos. Esta técnica es sumamente sensible y requiere de extremo cuidado para poder llevar a cabo las reacciones sin falsos positivos o negativos, por ello, se presentan como un avance sustancial preliminar, pero se sugiere seguir trabajando en el desarrollo de la técnica y la evaluación de las distintas cepas de *Trichoderma*. Sin embargo, los resultados muestran evidentemente la capacidad de algunas cepas de *Trichoderma* de producir estos metabolitos benéficos para la nutrición de las plantas, y el biocontrol de enfermedades.

8.3 Producción de ácido indol acético

El ácido indol acético es una fitohormona y la principal auxina de plantas, que regula el desarrollo de raíces, muchos microbios incluyendo bacterias, hongos del suelo y endófitos, secretan sustancias promotoras de crecimiento de plantas, como el ácido indol acético y las giberelinas (Khan *et al.* 2011; Chutima y Lumyong, 2012). La mayoría de las especies del género *Trichoderma* producen auxinas como el ácido indol acético, con o sin el precursor de L-triptofano (de Oliveira *et al.* 2012). En nuestro trabajo de investigación se logró comprobar la capacidad de producir ácido indol acético por las cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro, las concentraciones detectadas van desde 35.95 mg L⁻¹ la más alta hasta 3.74 mg L⁻¹ la concentración más baja. La mayoría de las cepas presentaron una producción de

los 3 a 7 mg L⁻¹, y los valores mas altos detectados pertenecen a cepas con una alta capacidad de producir AIA. Los resultados de Qi y Zhao (2012), quienes evaluaron la capacidad de producir este compuesto en una cepa de *T. asperellum* Q1, detectaron una concentración de 4.77 mg L⁻¹ de ácido indol acético, nuestra prueba coincide fuertemente con este resultado, en términos de producción promedio. Por otro lado, encontramos concentraciones superiores a los de Syamsa *et al.* (2015) que evaluaron la producción de 16 aislados de hongos endófitos (especies no identificadas) y encontraron concentraciones en el rango de 2.65 a 0.63 mg L⁻¹. A su vez, Contreras-Cornejo *et al.* (2009), identificaron y cuantificaron compuestos tipo auxinas como el ácido indol acético producidos por una cepa de *T. virens* adicionando L-triptofano y sin adición, la cantidad detectada sin el precursor fue de .013 mg L⁻¹ y con L-triptofano una concentración de .23 mg L⁻¹, estos resultados están por debajo de las concentraciones detectadas en las cepas de *Trichoderma* aquí probadas.

Considerando los resultados antes expuestos y la comparación con otros autores podemos inferir que las cepas de *Trichoderma* analizadas son productoras de ácido indol acético, identificando cepas con una alta producción las cuales pueden ser objeto de estudio para el futuro, ya que pueden representar cepas con una alta capacidad promotora de crecimiento vegetal.

8.4 Efecto de la inoculación de *Trichoderma* spp. en plántulas de tomate en condiciones de invernadero.

La inoculación de esporas de *Trichoderma* sobre semillas de tomate ha sido evaluada en diferentes trabajos de investigación, y han comprobado su efecto promotor de crecimiento en tomate (Mastouri *et al.* 2010; Azarmi *et al.* 2011; Samolski *et al.* 2012; Colla *et al.* 2015; Li *et al.* 2015).

En el presente trabajo, se comprobó el efecto, utilizando cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro sobre la promoción de crecimiento en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*), var. Río Grande. Fueron cuatro cepas las que

tuvieron un efecto estadísticamente diferente ($p \leq 0.001$), con respecto al tratamiento control (no inoculado), de la variable altura de la planta en centímetros: CHQ3, *T. atrobrunneum* que además fue de las cepas que se agruparon como antagonicas contra los siete fitopatógenos evaluados, por la vía de metabolitos difusibles en medio, también fue sideróforo positiva (+++) con una velocidad de reacción rápida en medio sólido, la cantidad de fosfato soluble estuvo dentro de las primeras 15 cepas con mayor capacidad solubilizadora, y la producción del ácido indol acético fue promedio con un valor de 4.4 mg L^{-1} . Además, también fue una cepa sobresaliente con diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.001$) para la variable peso de la raíz en gramos, dicha cepa muestra un comportamiento interesante debido a las características bioquímicas que presentó durante toda la experimentación realizada. Los efectos promotores de crecimiento pueden deberse a la suma de todas estas características que actúan de forma sinérgica, además de que posee una fuerte actividad antagonica contra hongos fitopatógenos de tomate. La cepa RE-01, *T. koningiopsis*, también promovió la altura de la planta de igual manera con efectos estadísticamente diferentes con respecto al control, además fue de las cepas mas sobresalientes para antagonizar fitopatógenos por la vía de los compuestos volátiles, además de ser sideróforo positiva con una velocidad de reacción rápida (+++) en medio sólido CAS-agar, además de producir 5.3 mg L^{-1} de la fitohormona promotora de crecimiento vegetal, ácido indol acético. Finalmente, en la variable altura de la planta en centímetros, tenemos a las cepas TC7 y GAM1, ambas *T. asperellum*. Estas cepas además de presentar el efecto sobre la altura de las plantas, mostraron una producción eficiente de ácido indol acético con valores muy similares de 5.1 y 5.2 mg L^{-1} de medio de cultivo.

Para la variable peso de la raíz en gramos, se presentaron tres cepas con diferencias estadísticas significativas ($p = 0.001$). La cepa CHQ3 de *T. atrobrunneum* como se explicó con anterioridad estuvo presente en la variable altura y peso de la raíz, la cepa TEH7 de *T. harzianum*, que además mostró una producción de AIA ligeramente superior a la media con 6.7 mg L^{-1} , por otro lado, estuvo dentro de las

primeras nueve cepas con mayor producción de fosfatos Por último, de la variable peso de la raíz en gramos, la cepa AJUM1, también de la especie *T. harzianum* que además de tener este efecto esta presente dentro de las cepas con capacidad de micoparasitar a los siete fitopatógenos, dentro de la clase I de la escala de Bell, clasificada como excelente micoparasítica. Respecto a la cantidad de fosfatos solubles se ubicó en el quinto lugar de las cepas mas solubilizadoras con $.59 \text{ mg L}^{-1}$ de medio de cultivo, es cepa sideróforo positiva con una velocidad de reacción intermedia (++) e indol positiva con un rendimiento de 4.4 mg L^{-1} de medio de cultivo, misma cantidad a la producida por la cepa CHQ3.

De la variable peso de la parte aérea, la cepa que presentó diferencias estadísticas significativas, fue la cepa TQ4, *T. asperellum* la cual es indol positivo con un rendimiento por encima de la media de 6.5 mg L^{-1} de medio de cultivo líquido, muy similar a la concentración de la cepa TEH7 con efectos promotores de raíz.

De las siete cepas con actividad promotora de crecimiento en planta, se pueden considerar como las de mayor interés biotecnológico a las cepas CHQ3, RE-01 y AJUM1, ya que además de su efecto en planta, son altamente antagónicas de los siete fitopatógenos de tomate.

Los microorganismos asociados a las raíces de las plantas pueden influir en su desarrollo y crecimiento, esta capacidad ha sido reportada para *Trichoderma* sobre muchas plantas, por ejemploe Lidsley y Baker, (1967), informaron un aumento significativo en la altura (28%) y en el peso (8%), de las plantas de tomate enanas, después de ser inoculadas con una cepa de *Trichoderma atroviride*. A su vez, Chang *et al.* (1986), observaron una germinación mas rápida en pimiento y aumento en la floración de crisantemo. Desde entonces muchos otros reportes han informado el efecto biofertilizante de *Trichoderma* spp. en un amplio rango de plantas, hortalizas, granos, hornamentales, forestales y muchas en cultivos bajo invernadero. (Baker *et al.* 1988; Chang *et al.*; 1986; Kleifeld y Chet, 1992; Lynch *et al.* 1991, Ousley *et al.*; 1993; 1994a). En el presente trabajo además de comprobar

el efecto promotor de crecimiento en plántulas de tomate, observamos que de un grupo amplio de cepas (65), únicamente siete tuvieron un efecto con diferencias estadísticas significativas, lo cual indica que no todas las cepas tienen la misma capacidad de establecer un efecto promotor en plantas o más probablemente presentan interacciones *Trichoderma*-planta específicas y no son generalistas para asociarse a cualquier planta y promover su crecimiento. Las siguientes especies han sido reportadas por promover el crecimiento vegetal: *T. longipile* y *T. tomentosum* (Rabeendran *et al.* 2000) *T. harzianum* (Chang *et al.* 1986; Inbar *et al.* 1994) *T. viride* (Ousley *et al.* 1993; 1994a), *T. asperellum* (Tchameni *et al.* 2011) y *Trichoderma aureoviride* (Calvet *et al.* 1993). En este trabajo las especies fueron: *T. atrobrunneum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum* y *T. harzianum*. Respecto a que no todas las especies tienen efecto promotor de crecimiento vegetal coincide con los resultados de Ousley *et al.* (1993; 1994a), que probaron diferentes cepas de *T. harzianum* y *T. viride* dando efectos diferentes en varias plantas hospedadas.

Interesantemente, Rebbendran *et al.* (2000) probaron cuatro cepas de *T. longipile* en un ensayo de invernadero en lechuga, de las cuales dos cepas aumentaron significativamente el área de la hoja, el peso seco de los brotes y las raíces, otra cepa tuvo efecto sobre el área foliar únicamente, una cepa no promovió el crecimiento. Estos datos documentados coinciden con el patrón observado en este trabajo, ya que como se mencionó anteriormente, algunas cepas se localizaron con efectos en la altura de la planta, otras en el peso de la raíz, una cepa con doble efecto en altura y raíz y finalmente una cepa en el peso de la parte aérea (brotes), así como el resto de las cepas sin efecto promotor.

Derivado de los trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular, específicamente el de García-Sánchez (2019), y del presente trabajo, dirigidos por el Dr. E. Ulises Esquivel Naranjo, se tiene una base de datos con el lugar de procedencia de cada cepa, así como la identificación molecular con sus respectivos árboles filogenéticos, sumando los datos generados en el presente trabajo se tiene información de gran utilidad para correlacionar las características

bioquímicas de cada cepa, planta asociada y su lugar de procedencia, para analizar que factores están asociados con los patrones de comportamiento y su evolución, desarrollando mecanismos de adaptación que puedan impactar en su capacidad de biocontrol y/o biofertilizante. Por otro lado, aunque se mencionó anteriormente que los efectos benéficos de las cepas de *Trichoderma* tienen que ver con la cepa y no con la especie particular, se podrían abordar trabajos para analizar la correlación entre la distancia genética de cada cepa, con su comportamiento como agentes de biocontrol y bioestimulación vegetal.

8.5. Interacción *in vitro* de *Trichoderma-gfp* vs *R. solani*

Para realizar los estudios de interacción *in vitro* con el uso de microscopía de fluorescencia confocal, primero se marcaron las cepas para el estudio con la proteína verde fluorescente fusionada a la histona H1, generando transformantes con núcleos marcados para monitorear la interacción *Trichoderma*-fitopatógeno. A continuación, se discuten los resultados de esta etapa experimental.

8.5.1 Pruebas de concentración mínima inhibitoria

Los resultados de las cepas probadas para conocer su sensibilidad a los antibióticos, higromicina-B, glufosinato de amonio y nourseotricina, únicamente seis cepas silvestres fueron sensibles a los tres antifúngicos en dosis bajas que se consideraron para los experimentos de transformación. El criterio de selección se fue que la concentración de higromicina-B no revasara los 100 mg ml⁻¹, sin embargo, la cepa RE-11 *T. koningiopsis* se inhibió y fue seleccionada por su capacidad micoparasítica mostrada con anterioridad, considerándose un buen prospecto para los estudios de interacción. Las otras cinco cepas se inhibieron a concentraciones de 50 mg ml⁻¹, para el antibiótico glufosinato de amonio, no existía tanta restricción en cuanto a la cantidad a utilizar ya que el costo del fungicida es económico, y la concentración de inhibición y su selección no revaso los 600 mg ml⁻¹. Para el antibiótico nourseotricina se seleccionaron las cepas sensibles a una concentración máxima de 100 mg ml⁻¹. Las cepas fueron seleccionadas tratando de escoger especies diferentes para hacer el marcaje molecular, ya que se desconocía tanto la

susceptibilidad de las cepas silvestres al tratamiento de las enzimas líticas para generar protoplastos como la factibilidad de introducir ADN exógeno. Sin embargo, al realizar la prueba se notó que cepas de la misma especie podían tener un patrón de inhibición diferente, indicando que la capacidad de resistir a los antibióticos está condicionada y depende del tipo de cepa y no de la especie.

8.5.2 Producción de protoplastos y transformación de cepas silvestres

Utilizando herramientas de ingeniería genética, se pueden marcar agentes de control biológico, con genes reporteros o indicadores, esto sirve para poder realizar un monitoreo más preciso de la interacción de los organismos en ambientes naturales o en condiciones de laboratorio (Green y Jensen, 1995). La proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* se ha desarrollado como reportero para la expresión génica (Chalfie *et al.* 1994). Actualmente existe una amplia gama de plásmidos con el gen clonado y ha sido expresada en varios organismos (Cheng *et al.* 1996; Cormack *et al.* 1997). La proteína verde fluorescente es una herramienta útil para estudiar las interacciones planta-hongo *in vivo* (Spelling *et al.* 1996). El primer paso para poder llevar a cabo la transformación genética de hongos con genes reporteros es la producción de protoplastos a partir de micelio de la cepa de interés. Son varios los trabajos realizados que involucran la producción de protoplastos de especies de *Trichoderma* (Kitamoto *et al.* 1988; Sandhu *et al.* 1989; Hassan, 2014; Sharma *et al.* 2016). En la presente investigación, de las seis cepas seleccionadas para el marcaje molecular con *gfp*, únicamente la cepa NI-1 *T. asperellum*, fue altamente sensible al tratamiento enzimático, produciendo una gran cantidad de protoplastos, mientras que las otras cinco cepas produjeron cantidades muy bajas o nulas, descartándolas para la transformación genética. La razón por la cual las otras especies de *Trichoderma* no produjeron protoplastos es desconocida, pero de acuerdo a lo reportado por Sharma *et al.* (2016) las concentraciones y el tipo de enzima lítica puede influir en el rendimiento de producción de protoplastos por especies de *Trichoderma*. Otro factor señalado por Peberdy (1995), que puede afectar la producción y rendimiento de protoplastos son, la edad del micelio, el tipo

de microorganismo, y los estabilizadores osmóticos. Sin embargo, las condiciones de cultivo y tratamiento de enzimas hidrolíticas fueron las mismas, lo que sugiere diferencias significativas a nivel de pared celular entre las cepas de *Trichoderma* analizadas.

La cepa NI-1 de *T. asperellum* mostró una alta eficiencia de transformación con los plásmidos pCB1004, pPk2-NTC y pUE10 H1:*gfp*, estas últimas fueron utilizadas para los ensayos de interacción con *R. solani*.

8.5.3 Análisis microscópico de la interacción *Trichoderma* vs *R. solani*

El micoparasitismo en *Trichoderma* es un proceso que involucra una serie de eventos que ocurren por etapas. Primero *Trichoderma* detecta a distancia al fitopatógeno, promoviendo el crecimiento quimiotrópico hacia el hospedero, un comportamiento estimulado por moléculas difusibles, y la secreción de enzimas hidrolíticas y metabolitos antifúngicos. Al contacto, las hifas de *Trichoderma* se enrollan en las hifas del fitopatógeno, formando estructuras especializadas de penetración tipo apresorio (Chet *et al.* 1981; 1987; Denis y Webster, 1971; Claydon *et al.*, 1987; Lu *et al.* 2004). Así mismo, las enzimas como las quitinasas, glucanasas y proteasas juegan un papel importante en este proceso, ya que el micoparasitismo resulta en la penetración de la pared celular del hongo y la utilización de su contenido celular, estas enzimas son inducidas antes del contacto directo con el huésped (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

En los estudios de microscopia, se logró comprobar la actividad antagónica, de *Trichoderma asperellum* H1:*gfp* y *T. atroviride* H1:*gfp* sobre el fitopatógeno *R. solani*. El comportamiento de ambas cepas etiquetadas fue similar al momento de analizar la interacción independiente con *R. solani*, en ambos casos se logró observar el marcaje molecular con la proteína verde fluorescente durante el crecimiento micelial, la velocidad de crecimiento se mantuvo sin alteraciones en la estructura micelial, lo cual indica que la incorporación del plasmido pUE10-H1:*gfp* no altera la fisiología de las cepas, esta información coincide con lo reportado por Lu

et al. (2004), quienes etiquetaron una cepa de *T. atroviride* con *gfp* en estudios de antagonismo contra *R. solani*, comprobaron que la cepa etiquetada, tenía el mismo comportamiento micoparasítico que la cepa silvestre. El patrón de crecimiento quimiotáctico hacia el hospedero se mantuvo en ambas cepas de *Trichoderma*, este fenómeno es un patrón común de *Trichoderma* spp, mismo que ha sido reportado por Lu *et al.* (2004), al realizar estudios de interacción con *T. atroviride* contra *R. solani* y *Pythium ultimum*. Otro fenómeno interesante observado fue el efecto fungistático de las cepas de *Trichoderma*, generado en *R. solani* este evento tuvo lugar incluso antes del contacto y en el caso de la interacción de *T. asperellum* H1:*gfp* se logró observar autofluorescencia en las hifas de *R. solani*. Wu y Warren, (1984), demostraron que la cepa de *R. solani* emite fluorescencia natural, durante el contacto con *Trichoderma*, y que en el transcurso del tiempo gradualmente se vaciaba y perdía la fluorescencia, este fenómeno se da en mayor medida y de forma gradual de micelio joven a viejo lo cual coincide con la acumulación de metabolitos secundarios fenólicos (Chang, 1964). A su vez, Vizvary y Warren, (1982), reportaron la autofluorescencia brillante de micelio de *R. solani*, antagonizada por *Trichoderma*, también coincide con la producción de fenólicos, que fue mas prominente en micelio dañado o autolizado. Los estudios de Wu y Warren (1984), demuestran que la emisión de fluorescencia en hongos es indicativa de muerte celular, brindando soporte a nuestros datos, ya que todos sus ensayos de confrontaciones, el hongo antagonizado detenía su crecimiento, además de emitir fluorescencia, mientras que el hongo antagonista permanecía sin alteraciones en su crecimiento y morfología. La interacción de *T. atroviride* H1:*gfp*, también presentó el patrón fungistático para *R. solani*, el se mantuvo sin alteraciones, aunque en esta interacción no se observó la emisión de fluorescencia por parte de *R. solani*, pero el micelio se observó claramente dañado y vacuolado, sugiriendo un efecto dañino de los metabolitos secretados por la cepa de *Trichoderma*, además se observó vaciamiento citoplasmático así como el movimiento vacuolar al momento del contacto con *T. atroviride* H1:*gfp*.

Durante el proceso del micoparasitismo, se desarrollan procesos relacionados con la liberación de compuestos antes y durante el contacto con el hospedero, estos pueden ser enzimas o metabolitos con efectos fungistáticos y antibióticos. Diversos estudios sugieren que tanto la producción de enzimas como la formación de estructuras de infección son respuestas inducidas por moléculas liberadas por el hongo huésped (por ejemplo, productos de degradación de su pared celular) o ubicadas en su superficie como las lectinas (Inbar y Chet, 1992). Zeilinger *et al.* (1999) usando cepas etiquetadas con Gfp demostraron que las quitinasas fueron inducidas por la presencia de *R. solani* y otros huéspedes fúngicos en experimentos de co-cultivo y que estas cepas fueron particularmente útiles para estudios *in vitro* de las primeras fases de la interacción con el huésped fúngico. Otros trabajos señalan el efecto sinérgico de las enzimas hidrolíticas con metabolitos secundarios como los peptaiboles (Engelberth *et al.* 2001; Schirmböck *et al.* 2001). Estos péptidos no ribosomales de cadena lineal son activos en la membrana, caracterizados por un residuo de alcohol C terminal, un extremo amino terminal acilado y un alto nivel de aminoácidos inusuales, como el ácido aminoisobutírico, 2-isovalina e hidroxiprolina (Chung y Wallace, 2001; Röhrich *et al.* 2013).

Holzlechner *et al.* (2016), analizaron la interacción *T. atroviride* contra *R. solani*, mediante imagen de espectrometría de masas, confirmando el efecto fungistático de *R. solani* desde los dos a cuatro mm de distancia, observando que la cepa del fitopatógeno no interactúa, interesantemente lograron localizar la liberación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* en las primeras etapas de interacción y de crecimiento hacia el hongo fitopatógeno.

El empleo de hongos marcados con Gfp, junto con los análisis de microscopía avanzada, son una herramienta valiosa para analizar a profundidad procesos complejos como la interacción de *Trichoderma* con fitopatógenos y la interacción con plantas. Nuestros resultados son consistentes y demuestran que una cepa con alta capacidad antagónica por liberación de metabolitos secundarios muestra daños al hospedero a distancia.

IX. CONCLUSIONES

Las cepas con mayor efecto y espectro micoparasítico contra siete fitopatógenos probados son: AJUM2 *Trichoderma* sp, TEM1 *Trichoderma* sp. y MB1 *T. atroviride*.

Las cepas con mayor espectro de antagonismo por compuestos volátiles son: NI-1 *T. asperellum* y AD3 *T. atroviride*.

Las cepas de MB1 *T. atroviride*, TRT3 *T. asperellum* y TSR1-5 *T. tomentosum* son las de mayor espectro antagónico por metabolitos difusibles.

No todas las cepas de *Trichoderma* poseen el mismo comportamiento antagónico, aún siendo de la misma especie.

Todas las cepas de *Trichoderma* examinadas poseen capacidad de solubilizar fosfatos trcálicos.

Las cepas de *Trichoderma* estudiadas, producen compuestos sideróforos, sin embargo, lo hacen en cantidades variables, las de mayor producción detectadas fueron, GY2 *T. koningiopsis*, TQ3 *T. asperellum*, *028 y AD3 ambas *T. atroviride*.

Las 65 cepas estudiadas son indol positivo, las cantidades que producen son variables mostrando diferencias estadísticas significativas entre sí, la cepa con mayor producción fue RE-15 *T. tomentosum*.

Las cepas que poseen efecto promotor de crecimiento en plántulas de jitomate son: RE-01 *T. koningiopsis*, CHQ3 *T. atrobrunneum* y GAM1 *T. asperellum* para la variable altura de la plántula, TQ4 *T. asperellum* para la variable peso de la parte aérea, CHQ3 *T. atrobrunneum*, AJUM1 y TEH7 ambas *T. harzianum* para la variable peso de la raíz.

La cepa NI-1 *T. asperellum* posee las mejores características para realizar estudios de transformación genética, interacción con fitopatógenos y microscopia confocal.

X. PERSPECTIVAS

Realizar estudios de metabolómica para identificar las diferentes moléculas volátiles y no volátiles, involucradas en la inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos.

Realizar pruebas bioquímicas como son: solubilización de nutrientes como fosfato tricálcico, producción de sideróforos y ácido indol acético utilizando herramientas y equipos más tecnificados como cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para tener una mejor caracterización bioquímica de las cepas.

Realizar estudios de bioprotección donde se planifique la co-inoculación de fitopatógenos y las especies de *Trichoderma* más eficientes identificadas en el presente trabajo, en frutos y plántulas de cultivos de interés agronómico.

Realizar estudios de interacción NI-1 *T. asperellum-gfp* vs fitopatógenos en condiciones *in vitro*, para conocer detalladamente el proceso de antagonismo. Así mismo, efectuar estudios de interacción hongo-planta para conocer el comportamiento endófito de las cepas de *Trichoderma*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Adams, P., De-Leij, F. A. A. M., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54(2), 306-313.

Alexopoulos, C., Mims C., Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. New York, USA. Willey. Pp. 237.

Altomare, C., & Tringovska, I. (2011). Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management. In *Genetics, biofuels and local farming systems* (pp. 161-214). Springer, Dordrecht.

Astudillo M.C., Blanco B. (1999). Establecimiento de los parámetros de producción semi-industrial del hongo *T. harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de pregrado. Microbiología industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. 7:11, 14, 20.

Azarmi, R., Hajieghrari, B., & Giglou, A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5850-5855.

Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H. S., Strem, M. D., Park, S. C., Ryu, C. Melnick, R.L., & Bailey, B. A. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 33

Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., & Preston, C. A. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *science*, 311(5762), 812-815.6-351.

Baker, R. (1988). *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants. *Critical reviews in Biotechnology*, 7(2), 97-106.

Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 465-479.

Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

Brewer, D., Mason, F. G., & Taylor, A. (1987). The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. *Canadian journal of microbiology*, 33(7), 619-625.

Bogumił, A., Paszt, L. S., Lisek, A., Trzciński, P., & Harbuzov, A. (2013). Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Horticulturae*, 25(2), 123-132.

Björkman, T., Blanchard, L. M., & Harman, G. E. (1998). Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(1), 35-40.

Buragohain, A. M., Das, B. C., & Islam, M. (2000). *In vitro* studies of *Trichoderma* species against *Sclerotium ralfsii* Sacc. *Journal of the Agricultural Science Society of North-East India*, 13(1), 99-100.

Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., & Chen, W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant physiology and biochemistry*, 73, 106-113.

Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 929-935.

Carsolio, C., Gutiérrez, A., Jiménez, B., Van Montagu, M., & Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 10903-10907.

Calvet, C., Pera, J., & Barea, J. M. (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, 148(1), 1-6.

França, D. V. C., Kupper, K. C., Magri, M. M. R., Gomes, T. M., & Rossi, F. (2017). *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato¹. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 47(4), 360-368.

Chacón, M. R., Rodríguez Galán, O., Benítez Fernández, C. T., Sousa, S., Rey, M., Llobell González, A., & Delgado Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by "*Trichoderma harzianum*". *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 10(1), 19-27.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.

Chang, Y. C., Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O., & Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease*, 70(2), 145-148.

Chang, C. C. (1964). A sensitive method for spectrophotofluorometric assay of catecholamines. *International journal of neuropharmacology*, 3(6), 643-649.

Chet, I., Harman, G. E., & Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7(1), 29-38.

Chet, I. (1987). *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. *Innovative approaches to plant disease control*, 137-160.

Chet, I., and Benhamou, S.H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.) Taylor & Francis Ltd. 2:153-152.

Chet, I., Inbar, J., & Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. *The mycota IV: environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, 165-184.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.

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.

Cheng, L., Fu, J., Tsukamoto, A., & Hawley, R. G. (1996). Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 14(5), 606-609.

Chutima, R., & Lumyong, S. (2012). Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. *Symbiosis*, 56(1), 35-44.

Chugh, J. K., & Wallace, B. A. Peptaibols: models for ion channels. (2001). 565-570.

Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., & Avent, A. G. (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Transactions of the British Mycological Society, 88(4), 503-513.

Colla, G., Roupshel, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., & Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(8), 1706-1715.

Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., & Brown, A. J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. Microbiology, 143(2), 303-311.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. Plant physiology, 149(3), 1579-1592.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., & López-Bucio, J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. Plant signaling & behavior, 6(10), 1554-1563.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Herrera-Estrella, A., & López-Bucio, J. (2014). The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. Plant and soil, 379(1-2), 261-274.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS microbiology ecology, 92(4), fiw036.

Crump, N. S., Cother, E. J., & Ash, G. J. (1999). Clarifying the nomenclature in microbial weed control. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 89-97.

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-IN4.

Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M. A., & Benítez, T. (2003). Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *gtt1*. *Eukaryotic cell*, 2(4), 708-717.

de Oliveira, A. G., Junior, A. F. C., dos Santos, G. R., Miller, L. O., & Chagas, L. F. B. (2012). Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. *Revista Verde (Mossoró-RN)*, 7(3), 149-155.

Duval, D., Riddell, F. G., Rebuffat, S., Platzner, N., & Bodo, B. (1998). Ionophoric activity of the antibiotic peptaibol trichorzin PA VI: a ^{23}Na -and ^{35}Cl -NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1372(2), 370-378.

Crutcher, F. K., Parich, A., Schuhmacher, R., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., & Kenerley, C. M. (2013). A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. *Fungal genetics and biology*, 56, 67-77.

Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Berg, A., Nirenberg, H. I., Gams, W., & Brückner, H. (2006). Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chemistry & Biodiversity*, 3(6), 593-610.

Djokovic, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant physiology*, 145(3), 875-889.

Domínguez, S., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Nicolás, C., Bettiol, W., Hermosa, R., & Monte, E. (2016). Nitrogen metabolism and growth enhancement in

tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase amdS gene. *Frontiers in microbiology*, 7, 1182.

Domsch k., Anderson W., Yersoon T. H. (1980). *Compendium of soil fungi. Revision of the genus Trichoderma*. London, England. Academic Press. Pp 136-139, 794-810.

Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387-400.

Elad, Y., Chet, I., & Katan, J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70(2), 119-121.

El Hajji, M. E., Rebuffat, S., Lecommandeur, D., & Bodo, B. (1987). Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*. *International journal of peptide and protein research*, 29(2), 207-215.

El-Katatny, M., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M., & Gübitz, G. (2001). Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), 137-143.

Engelberth, J., Koch, T., Schöler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., & Boland, W. (2001). Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology*, 125(1), 369-377.

FAOSTAT (2018). <http://www.fao.org/faostat/> Accedido: 07.11.2018.

Fokkema, N. J. (1978). Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89(1), 115-119.

Gaind, S. (2016). Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. *Microbiological research*, 193, 94-102.

García-López, A. M., Avilés, M. & Delgado, A. (2015). Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. *Agric. Food Sci.* 24, 249–260.

García Sánchez, V. (2018). Evaluación del efecto fungicida de cepas de *Trichoderma* nativas del estado de Querétaro (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México.

Guigón López, C., & González González, P. A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1).

Gómez, J. R., Hernández, F. L. M., Cossio, V. L. E., López, A. J. G., Sánchez L. R. (2011). Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo del tomate en el estado de Nayarit. Folleto técnico No. 19. SAGARPA-INIFAP.

Gonzalez-Perez E., Ortega-Amaro M.A., Salazar-Badillo F.B., Bautista, E., Douterlungne, D., Jimenez-Bremont J.F. The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports* 2018;8(1):16427.

Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977.

Green, H., & Jensen, D. F. (1995). A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: II. The use of a GUS transformant for ecological studies in the rhizosphere. *Phytopathology*, 85(11), 1436-1440.

Goulard, C., Hlimi, S., Rebuffat, S., & Bodo, B. (1995). Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. The Journal of Antibiotics, 48(11), 1248-1253.

Harman, G. E., & Lumsden, R. D. (1990). Biological disease control. The rhizosphere., 259-280.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology, 2(1), 43

Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (2014). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. CRC Press.

Hassan, M. M. (2014). Influence of protoplast fusion between two *Trichoderma* spp. on extracellular enzymes production and antagonistic activity. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 28(6), 1014-1023.

Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. Natural product reports, 27(5), 637-657.

Hjeljord, I., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Harman, G.E., Kubicek., (Eds). Bristol, USA. Tylor & Francis 153-169.

Holzlechner, M., Reitschmidt, S., Gruber, S., Zeilinger, S., & Marchetti-Deschmann, M. (2016). Visualizing fungal metabolites during mycoparasitic interaction by MALDI mass spectrometry imaging. Proteomics, 16(11-12), 1742-1746.

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.

Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q., & Yang, X. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(3), 741-755.

Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(8), 3395-3405.

Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D., & Chet, I. (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European journal of plant pathology*, 100(5), 337-346.

Inbar, J., & Chet, I. (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *Journal of Bacteriology*, 174(3), 1055-1059.

Irmscher, G., Bovermann, G., Boheim, G., & Jung, G. (1978). Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part A. Isolation, characterization and conformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 507(3), 470-484.

Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, 80, 1-87.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.

Khan, A. L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S. M., Kim, Y. H., & Hwang, Y. H. (2011). Salinity stress resistance offered by endophytic fungal

interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and Glycine max. J. Microbiol. Biotechnol, 21(9), 893-902.

Khan, M. S. (2012). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. Resour Environ, 2(1), 80-85.

Kitamoto, Y., Mori, N., Yamamoto, M., Ohiwa, T., & Ichikawa, Y. (1988). A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. Applied microbiology and biotechnology, 28(4-5), 445-450.

Kleifeld, O., & Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response. Plant and soil, 144(2), 267-272.

Kleinkauf, H., & Rindfleisch, H. (1975). Non-ribosomal biosynthesis of the cyclic octadecapeptide alamethicin. Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 22(4), 411-418.

Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K., & Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. Journal of Plant Pathology, 11-23.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W.; Börner, T., & Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(15), 7755-7760.

Leong, J. (1986). Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 24(1), 187-209.

Lieckfeldt, E., Kullnig, C., Samuels, G. J., & Kubicek, C. P. (2000). Sexually competent, sucrose-and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from South American soils. *Mycologia*, 374-380.

Lieckfeldt, E., Kullnig, C. M., Kubicek, C. P., Samuels, G. J., & Börner, T. (2001). *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycological Research*, 105(3), 313-322.

Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS One*, 10(6), e0130081.

Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X., & Kang, S. (2018). Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2614.

Lindsey, D. L., & Baker, R. (1967). Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 57(11), 1262.

Lichius, A., & Zeilinger, S. (2019). Application of Membrane and Cell Wall Selective Fluorescent Dyes for Live-Cell Imaging of Filamentous Fungi. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (153), e60613.

López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Pérez-Torres, A., Rampey, R. A., Bartel, B., & Herrera-Estrella, L. (2005). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant physiology*, 137(2), 681-691.

Lynch, J. M., Wilson, K. L., Ousley, M. A., & Whipps, J. M. (1991). Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. Letters in Applied Microbiology, 12(2), 59-61.

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., & Jansson, J. K. (2004). In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. Appl. Environ. Microbiol., 70(5), 3073-3081.

Machuca, A., & Milagres, A. M. F. (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. Letters in applied microbiology, 36(3), 177-181.

Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S. & Kubicek, C. P. (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. Applied and Environmental Microbiology, 65(5), 1858-1863.

Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Phytopathology, 100(11), 1213-1221.

Mendoza, J. L. H., Pérez, M. I. S., Olivares, J. G. G., Pérez, N. M., Prieto, J. M. G., & Velásquez, J. D. C. Q. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. Revista Colombiana de Biotecnología, 13(2), 176-185.

Menzies, J. G. (1993). A strain of *Trichoderma viride* pathogenic to germinating seedlings of cucumber, pepper and tomato. Plant pathology, 42(5), 784-791.

McGill, W. B., & Cole, C. V. (1981). Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma, 26(4), 267-286.

Milagres, A. M., Machuca, A., & Napoleao, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1-6.

Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., & Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 718-727.

Mycobank. (2018). <http://www.mycobank.org/> Accedido: 19.10.2018.

Moore E. (1996). *Fundamentals of the fungi*. New jersey, USA. Prentice Hall. 574 p.

Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual review of phytopathology*, 51, 105-129.

Nagy, V., Seidl, V., Szakacs, G., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2007). Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(21), 7048-7058.

Nakkeeran, S., Renukadevi, P., & Marimuthu, T. (2005). Antagonistic potentiality of *Trichoderma viride* and assessment of its efficacy for the management of cotton root rot. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38(3), 209-225.

Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological control*, 67(2), 149-156.

Neilands, J. B. (1981). Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual review of nutrition*, 1(1), 27-46.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726.

Newman, S. E., Brown, W. M., & Ozbay, N. (2002, August). The effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedlings. In XXVI International Horticultural Congress: Managing Soil-Borne Pathogens: A Sound Rhizosphere to Improve Productivity in 635 (pp. 131-135).

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, T. J., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 8, 102.

Nopparat, C., Jatupornpipat, M., & Rittiboon, A. (2009). Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43, 172-181.

Ousley, M. A., Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1993). Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. *Microbial Ecology*, 26(3), 277-285.

Ousley, M. A., Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1994). Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biology and Fertility of Soils*, 17(2), 85-90.

Payne, S. M. (1994). Detection, isolation and characterization of siderophores. *Methods in enzymology*, 235, 329-344.

Peberdy, J. F. (1995). Fungal protoplasts. In *Genetics and Biotechnology* (pp. 49-60). Springer, Berlin, Heidelberg.

Persoon, C. H. (1794). Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. *Neues Magazin für die Botanik*, 1, 63-128.

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 127-131.

Pérez-Reséndiz, J. E. (2015). Identificación de hongos relacionados con la roña del aguacate y su control biológico. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México.

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52.

Pilet, P. E., & Chollet, R. (1970). Sur le dosage colorimétrique de l'acide indolylacétique. *CR Acad Sci Ser D*, 271, 1675-1678.

Pons Jr, W. A., & Guthrie, J. D. (1946). Determination of inorganic phosphorus in plant materials. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(3), 184-186.

Quiroga, M. R., Rosales, E. M., Rincon, E. P., Hernández, G. E., & Garrido, R. E. (2007). Enfermedades causadas por hongos y nematodos en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el municipio de Villaflores. Chiapas, Mexico. *Rev. Mex. Fitopat*, 25(2), 114-119.

Qi, W., & Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 355-364.

Ralph, D., Jan, A. L., Kan, V., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosak, K. A., Pietro, A., & Ellis, J. (2012). The top ten fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 1-17.

Raymond, K. N., & Dertz, E. A. (2004). Biochemical and physical properties of siderophores. *Iron transport in bacteria*. ASM Press, Washington, DC, 3-17.

Rai, S., Kashyap, P. L., Kumar, S., Srivastava, A. K., & Ramteke, P. W. (2016). Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. *SpringerPlus*, 5(1), 1939.

Raut, I., Badea-Doni, M., Calin, M., Florin, O., Vasilescu, G., Sesan, T. E., & Jecu, L. (2014). Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. *Revista de Chimie*, 65(11), 1285-1288.

Ramesh, A., Sharma, S. K., Joshi, O. P., & Khan, I. R. (2011). Phytase, phosphatase activity and P-nutrition of soybean as influenced by inoculation of *Bacillus*. *Indian journal of microbiology*, 51(1), 94-99.

Rebuffat, S., El Hajji, Mohamed., Hennig P., Davoust, D., & Bodo, B. (1989). Isolation, sequence, and conformation of seven trichorzianines from *Trichoderma harzianum*. International journal of peptide and protein research, 34(3), 200-210.

Reyes, I., Bernier, L., & Antoun, H. (2002). Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. Microbial Ecology, 44(1), 39-48.

Rabeendran, N., Moot, D. J., Jones, E. E., & Stewart, A. (2000). Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. New Zealand Plant Protection, 53, 143-146.

Riquelme, W. (2006). Evaluación *In Vitro* de tres cepas del genero *Trichoderma* spp para el control de los hongos *Phomopsis viticola* y *Cylindrocarpon* spp causantes de la pudrición de estacas de vid. Memoria de Título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Talca, Escuela de Agronomía, Talca.

Rodríguez, M., & Florez, V. (2004). Elementos esenciales y beneficiosos. Ferti-riego: Tecnologías y programación en agroplasticultura. 25-36.

Rodríguez Alvarado, G., García López, J., & Fernández Pavía, S. P. (2011). Enfermedades del Jitomate (*Solanum lycopersicum*) Cultivado en Invernadero en la Zona Centro de Michoacán. Revista mexicana de fitopatología, 29(1), 51-60.

Rodríguez, V. (2013). Manual de Plagas y enfermedades en jitomate. CESAVEG (Comité Estatal De Sanidad Vegetal De Guanajuato, AC), MEX.

Röhrich, C. R., Iversen, A., Jaklitsch, W. M., Voglmayr, H., Vilcinskis, A., Nielsen, K. F., & Degenkolb, T. (2013). Screening the biosphere: the fungicolous fungus *Trichoderma phellincola*, a prolific source of hypophellins, new 17-, 18-, 19-, and 20-residue peptaibiotics. Chemistry & biodiversity, 10(5), 787-812.

Rubio, M. B., Hermosa, R., Reino, J. L., Collado, I. G., & Monte, E. (2009). Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genetics and Biology*, 46(1), 17-27.

Rudresh, D. L., Shivaprakash, M. K., & Prasad, R. D. (2005). Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of microbiology*, 51(3), 217-222.

Sandhu, D. K., Wadhwa, V., & Bagga, P. S. (1989). Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and microbial technology*, 11(1), 21-25.

Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., & Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12), 4364-4370.

Sharma, M., Sharma, P., Singh, R., Raja, M., & Sharma, P. (2016). Fast isolation and regeneration method for protoplast production in *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5, 891-897.

Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1994). *Fisiología vegetal*. (Grupo Editorial Iberoamérica. 581.1

Saravanakumar, D., Vijayakumar, C., Kumar, N., & Samiyappan, R. (2007). PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection*, 26(4), 556-565.

Saravanakumar, K., Shanmuga Arasu, V. & Kathiresan, K. (2013). Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquat. Bot.* 104, 101–105.

Samuels, G. J., Pardo-schultheiss, R., Hebbar, K. P., Lumsden, R. D., Bastos, C. N., Costa, J. C., & Bezerra, J. L. (2000). *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104(6), 760-764.

Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.

Samolski, I., Rincón, A. M., Pinzón, L. M., Viterbo, A., & Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, 158(1), 129-138.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.

Schulz-Bohm, K., Geisen, S., Wubs, E. J., Song, C., de Boer, W., & Garbeva, P. (2017). The prey's scent–volatile organic compound mediated interactions between soil bacteria and their protist predators. *The ISME journal*, 11(3), 817-820.

SIAP (2018). Boletín mensual de la producción tomate rojo (jitomate). Servicio de Información Agroalimentaria (SIAP), SAGARPA.

SIAP-SAGARPA (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. SAGARPA.

Siddiquee, S., Cheong, B. E., Taslima, K., Kausar, H., & Hasan, M. M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of chromatographic science*, 50(4), 358-367.

Siddiquee, S. (2014). Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 139-175). Elsevier.

Šimpraga, M., Takabayashi, J., & Holopainen, J. K. (2016). Language of plants: Where is the word?. *Journal of integrative plant biology*, 58(4), 343-349.

Skaar, E. P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS pathogens*, 6(8).

Solanki, M. K., Singh, N., Singh, R. K., Singh, P., Srivastava, A. K., Kumar, S., & Arora, D. K. (2011). Plant defense activation and management of tomato root rot by a chitin-fortified *Trichoderma/Hypocrea* formulation. *Phytoparasitica*, 39(5), 471.

Spellig, T., Bottin, A., & Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(5), 503-509.

Srivastava, M. P., Gupta, S., & Sharm, Y. K. (2018). Detection of siderophore production from different cultural variables by CAS-agar plate assay. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(1), 66-69.

Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In 6. International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands), 29 Apr-5 May 1984. ISOSC.

Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.

Studholme, D. J., Harris, B., Le Cocq, K., Winsbury, R., Perera, V., Ryder, L., & Grant, M. (2013). Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture—insights from genomics. *Frontiers in plant science*, 4, 258.

Stewart, A. & Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. 415–425.

Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160 (1), 47–56.

Syamsia, T. K., Syam'un, E., & Masniawati, A. (2015). The potency of endophytic fungal isolates collected from local aromatic rice as indole acetic acid (IAA) producer. *Procedia Food Science*, 3, 96-103.

Tapwal, A., Thakur, G., Chandra, S., & Tyagi, A. (2015). *In-vitro* evaluation of *Trichoderma* species against seed borne pathogens. *IJCBS*, 1(10), 14-19.

Tapwal, A., Sharma, Y. P., & Lakhanpal, T. N. (2004). Effect of volatile compounds released by *Gliocladium virens* and *Trichoderma* spp. on growth of *Dematophora necatrix*. *J. Mycol. Plant Pathol*, 34, 37-40.

Taylor, A. (1986). Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*.

Tchameni, S. N., Ngonkeu, M. E. L., Begoude, B. A. D., Nana, L. W., Fokom, R., Owona, A. D., ... & Kuate, J. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop protection*, 30(10), 1321-1327.

Thakuria, D., Talukdar, N. C., Goswami, C., Hazarika, S., Boro, R. C., & Khan, M. R. (2004). Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*, 978-985.

Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current opinion in immunology*, 13(1), 63-68.

Torres-De la Cruz, M., Ortiz-Garcia, C. F., Bautista-Munoz, C., Abraham Ramirez-Pool, J., Avalos-Contreras, N., Cappello-Garcia, S., & De la Cruz-Perez, A. (2015). *Trichoderma* diversity in the cocoa agroecosystem in the state of Tabasco, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947-961.

Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research* (pp. 243-254). Springer, Dordrecht.

Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., López-Bucío, J., & Herrera-Estrella, A. (2011). Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(12), 1459-1471.

Vessey, J. K., & Heisinger, K. G. (2001). Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilisation on root and shoot parameters of field-grown pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(3), 361-366.

Vey, A., Hoagland, R. E., & Butt, T. M. (2001). 12 Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. *Fungi as biocontrol agents*, 311.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143-148.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S.L & 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.

Vizvary, M. A., & Warren, H. L. (1982). Survival of *Colletotrichum graminicola* in Soil. *Phytopathology*, 72(5), 522-525.

Waksman, S. A. (1945). *Microbial antagonisms and antibiotic substances*. Commonwealth Fund.; New York.

Winkelmann, G. (1990). Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. *Biotechnology advances*, 8(1), 207-231.

Winkelmann, G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. 691-696.

Wakelin, S., Mander, C., Gerard, E., Jansa, J., Erb, A., Young, S., Condrón, L., & O'Callaghan, M. (2012). Response of soil microbial communities to contrasted histories of phosphorus fertilisation in pastures. *Applied soil ecology*, 61, 40-48.

Weikl, F., Ghirardo, A., Schnitzler, J. P., & Pritsch, K. (2016). Sesquiterpene emissions from *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*: effects of age, nutrient availability, and co-cultivation. *Scientific reports*, 6, 22152.

Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., G. Del Sorbo & Lorito, M. (1999). Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(5), 419-429.

Wu, C. H., & Warren, H. L. (1984). Natural autofluorescence in fungi, and its correlation with viability. *Mycologia*, 76(6), 1049-1058.

www.Mycobank.org Disponible en:

<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycobankNr =10282>

Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235(2), 235-242.

Zayed, G., & Abdel-Motaal, H. (2005). Bio-active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea. *Bioresource Technology*, 96(8), 929-935.

Zehra, A., Meena, M., Dubey, M. K., Aamir, M., & Upadhyay, R. S. (2017). Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on

enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against Fusarium wilt disease. *Botanical studies*, 58(1), 44.

Zhao, L., Liu, Q., Zhang, Y., Cui, Q. & Liang, Y. (2017). Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of *Arabidopsis* under salt stress. *J. Integr. Agric.* 16, 1341–1346.

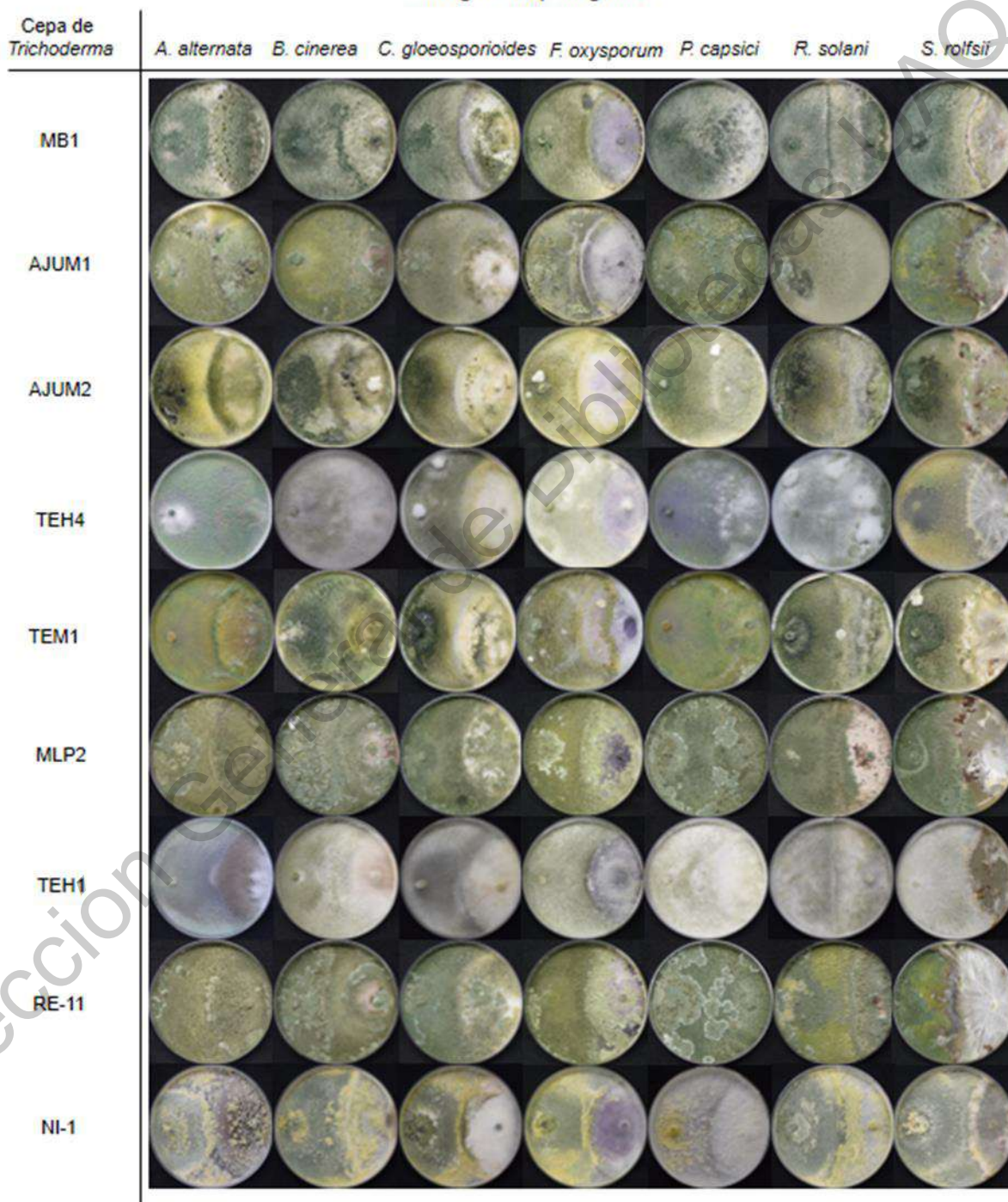
Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., ... & Kubicek, C. P. (1999). Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genetics and Biology*, 26(2), 131-140.

Zou, X., Binkley, D., & Doxtader, K. G. (1992). A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147(2), 243-250.

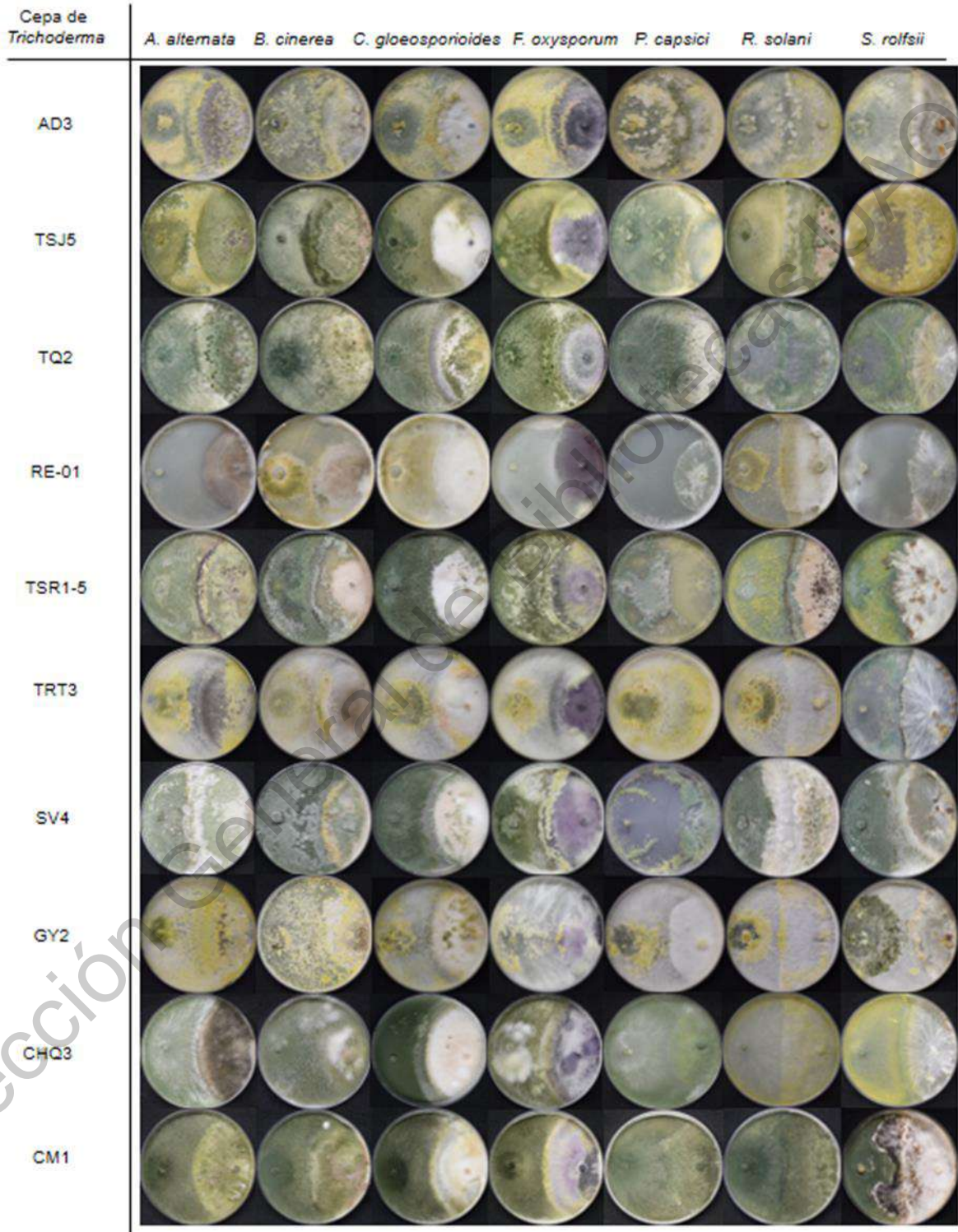
ANEXOS

Anexo 1. Prueba de micoparasitismo por cepas de *Trichoderma* contra siete fitopatógenos de tomate reportadas en el resumen de la tabla 19.

Hongos fitopatógenos

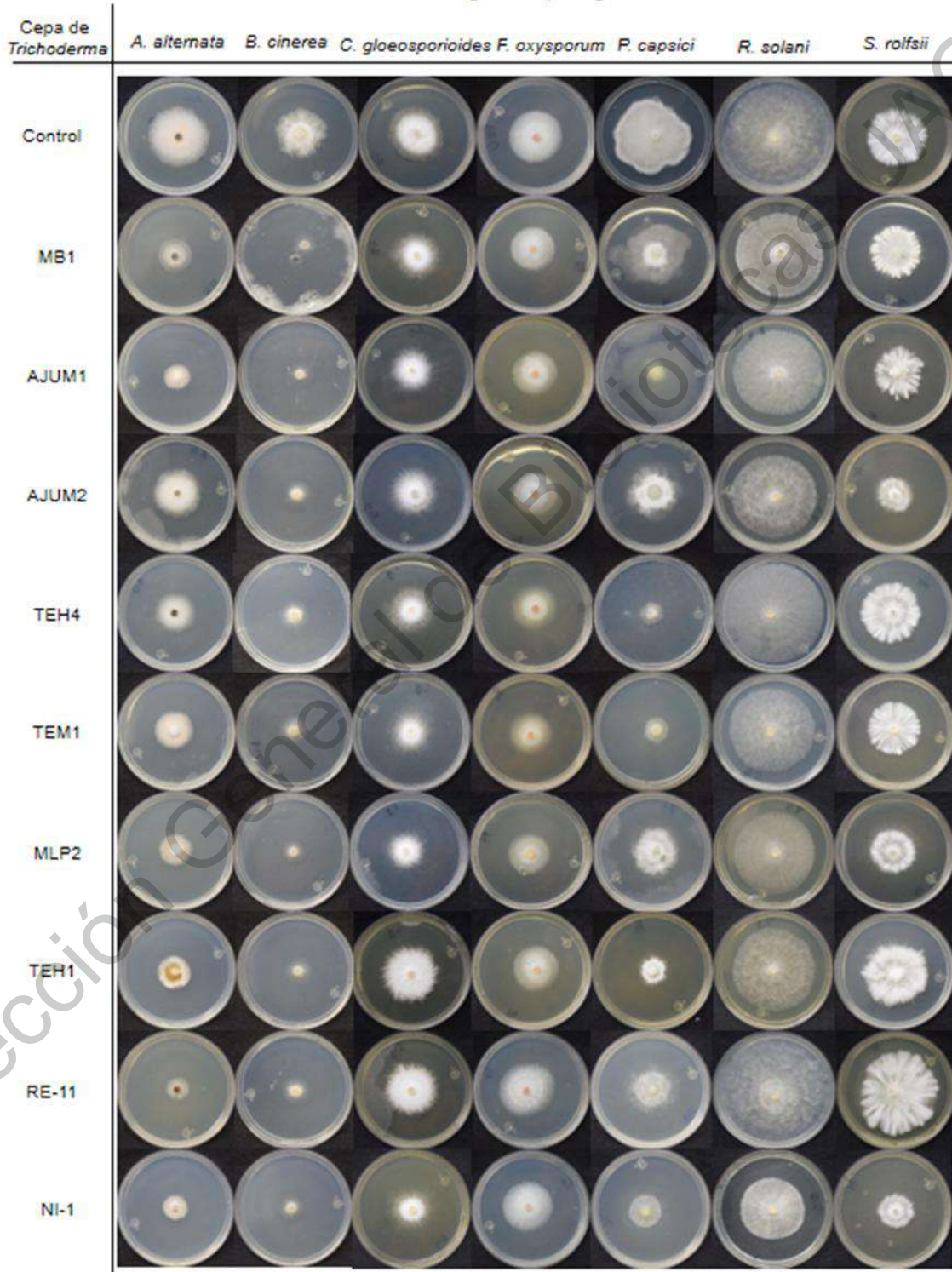


Hongos fitopatógenos

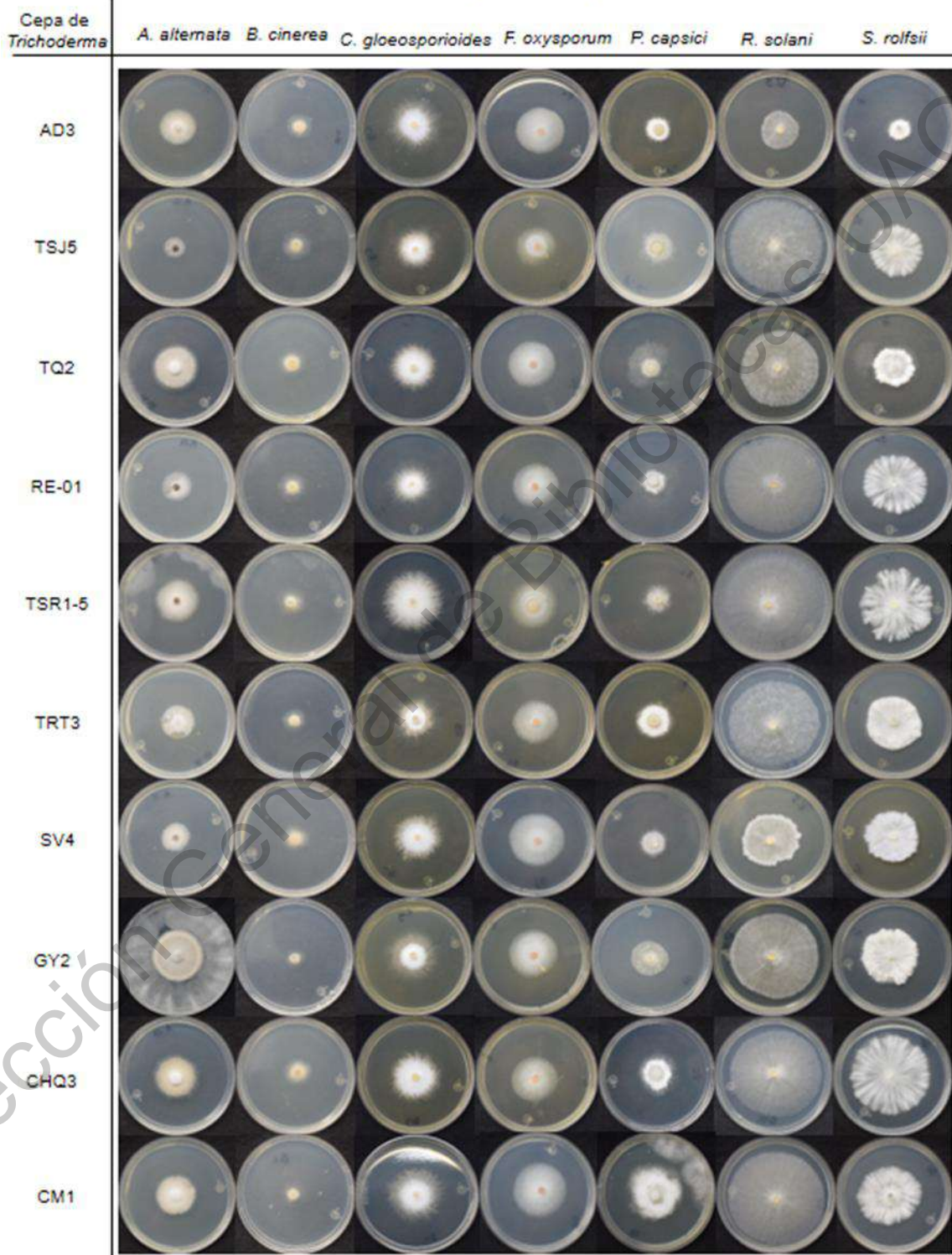


Anexo 2. Prueba de efecto de compuestos volátiles de cepas de *Trichoderma* sobre siete fitopatógenos de tomate reportadas en el resumen de la tabla 19.

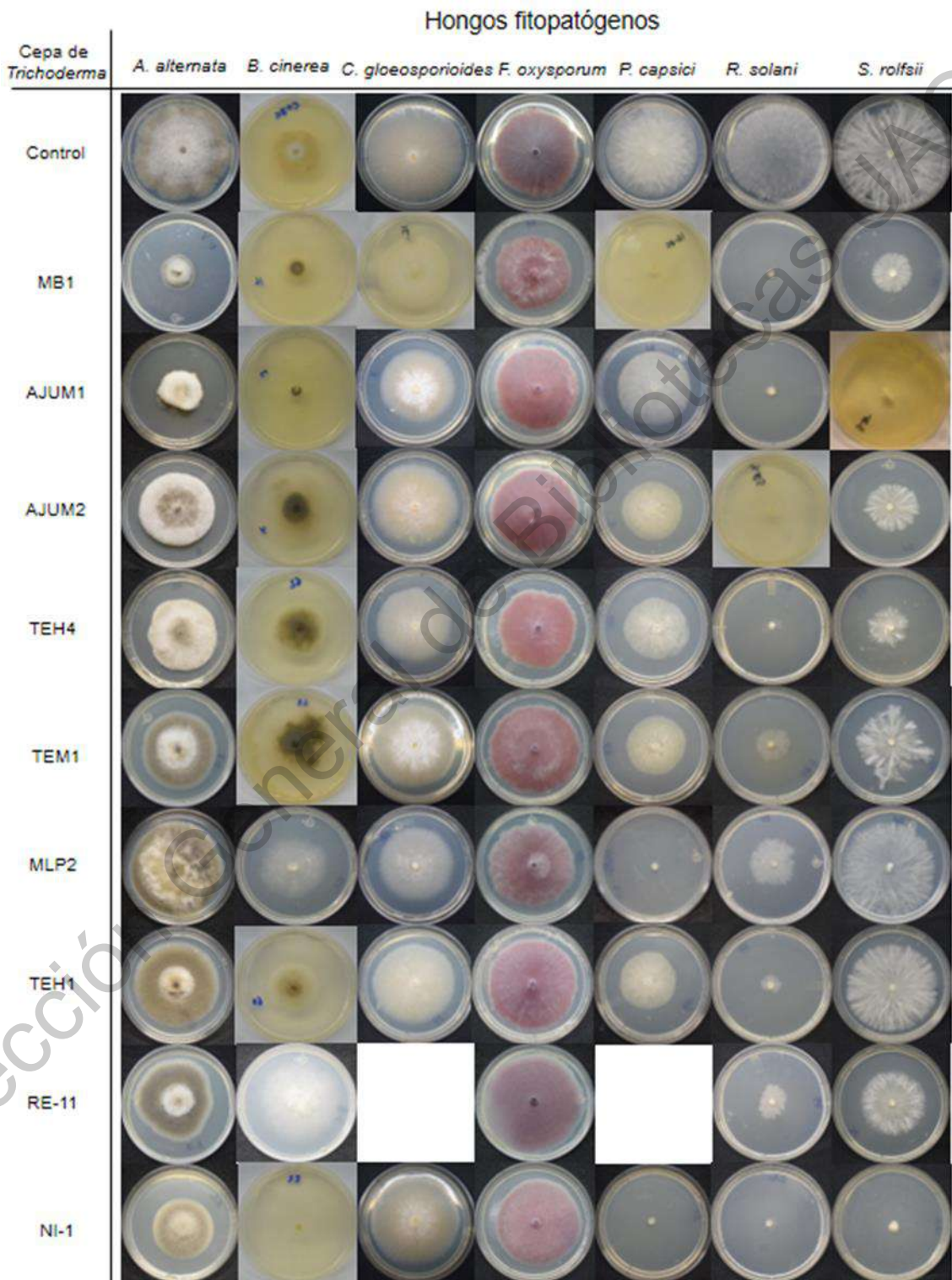
Hongos fitopatógenos



Hongos fitopatógenos



Anexo 3. Efecto de cepas *Trichoderma* sobre siete hongos fitopatógenos de tomate por metabolitos difusibles reportadas en la tabla 19.

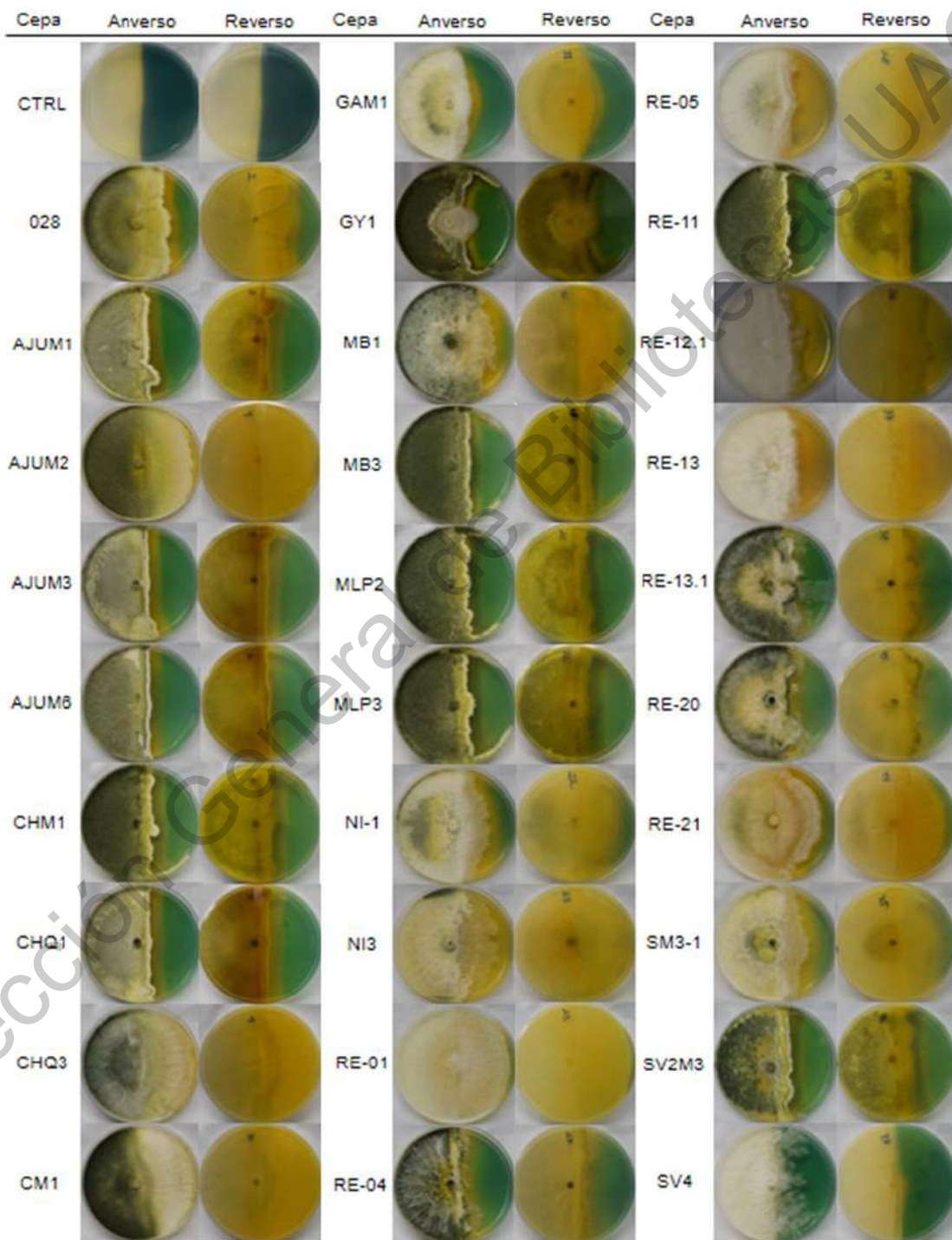


Hongos fitopatógenos

Cepa de <i>Trichoderma</i>	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
AD3							
TSJ5							
TQ2							
RE-01							
TSR1-5							
TRT3							
SV4							
GY2							
CHQ3							
CM1							

Anexo 4. Producción de sideróforos por 50 cepas de *Trichoderma* en medio CAS-agar.

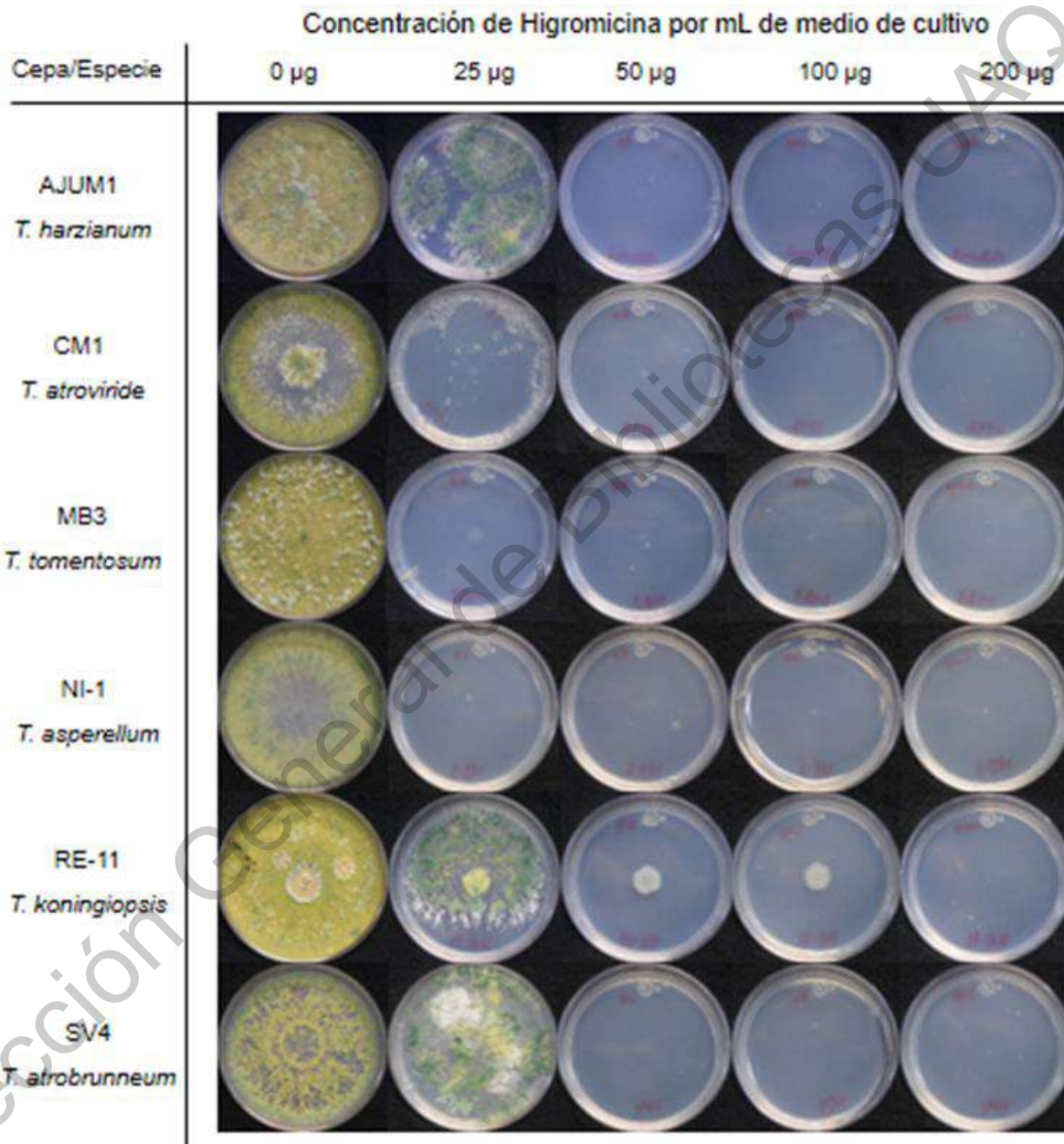
Producción de sideróforos en medio sólido



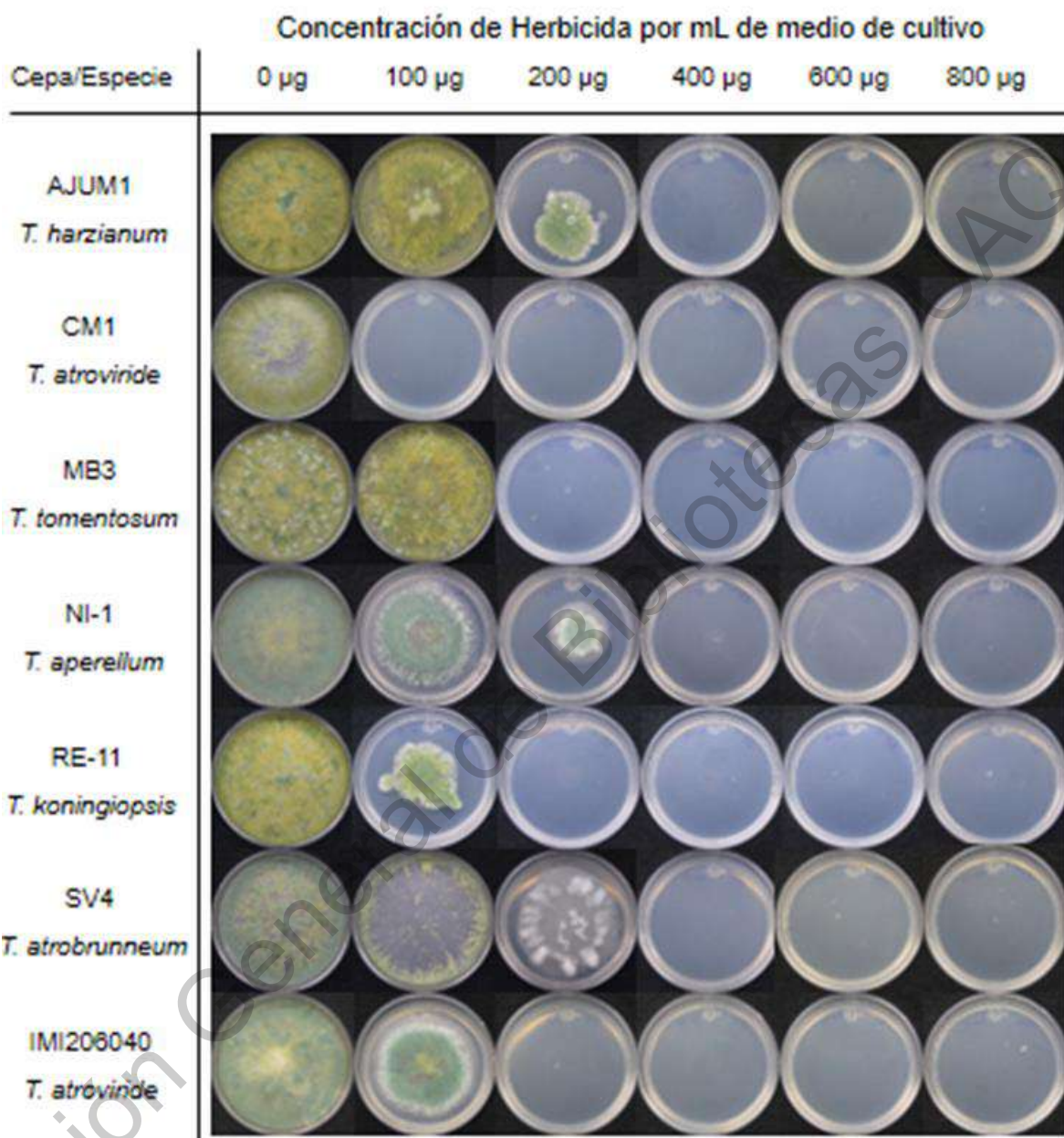
Producción de sideróforos en medio sólido



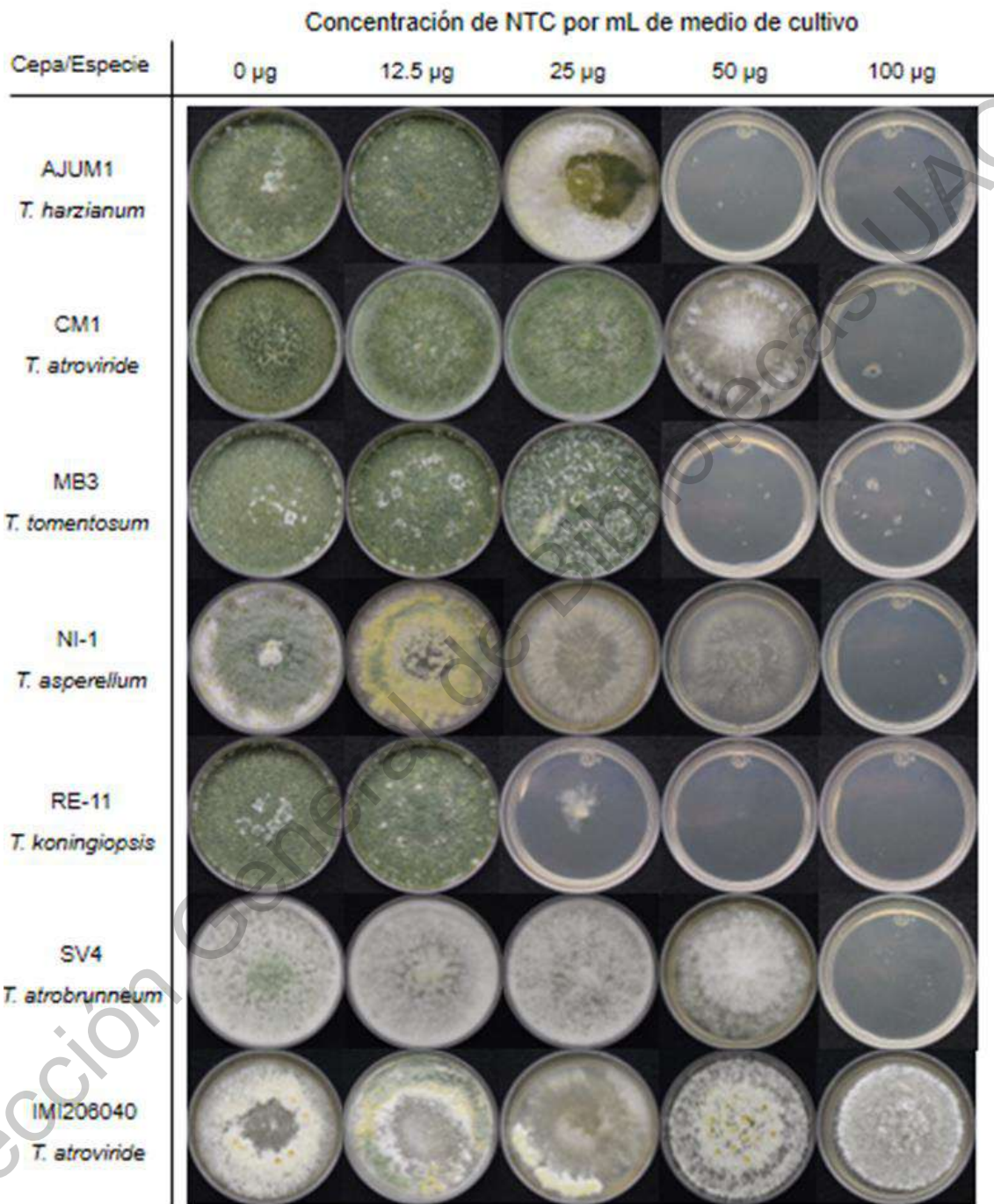
Anexo 5. Concentración mínima inhibitoria, higromicina-b, glufosinato de amonio y nourseotricina para 17 cepas de *Trichoderma*.



Concentración mínima inhibitoria de higromicina-b. Se muestran las 6 cepas seleccionadas para la transformación y su comportamiento inhibitorio adicionado con higromicina-b en las concentraciones indicadas. Para la cepa IMI602040 *T. atroviride* no se realizó dicha prueba debido a que se tenían ya los antecedentes de la inhibición ante este antibiótico.



Concentración mínima inhibitoria de glufosinato de amonio. Se muestran las 6 cepas silvestres seleccionadas y su comportamiento inhibitorio en medio de cultivo P.D.A adicionado con el herbicida (glufosinato de amonio), en diferentes concentraciones.



Concentración mínima inhibitoria de nouseotricina. Se muestran las 6 cepas silvestres seleccionadas y su comportamiento inhibitorio en medio de cultivo P.D.A adicionado con el nouseotricina (NTC) en diferentes concentraciones.