

## **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COMITANCILLO**

---

---

### **TESIS PROFESIONAL**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN EN BIORREACTOR DE  
CEPAS DE *Trichoderma* spp., PARA SER UTILIZADAS  
COMO INSUMO BIOFUNGICIDA.”**

**QUE PRESENTA:**

**JOEL CELESTINO LAURO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO  
CON ESPECIALIDAD EN FITOTECNIA**

**SAN PEDRO COMITANCILLO, OAX. NOVIEMBRE DEL 2015**



# AGRADECIMIENTOS.

*A DIOS: Por permitirme disfrutar de esta gran vida y oportunidad de lograr una meta más en mi vida.*

*AL INSTITUTO TECNOLOGICO DE COMITANCILLO: Por aceptarme y abrirme las puertas para poder culminar mis estudios de licenciatura y poder formarme como profesional.*

*AL INSTITUTO TECNOLOGICO DE TLAJOMULCO JALISCO: Por aceptarme y permitirme desarrollar mi proyecto de tesis profesional.*

*AL Dr. Martín Eduardo Ávila Miranda: Por la paciencia, dedicación, apoyo, confianza, consejos, motivaciones y asesoría para llevar acabo mi proyecto de tesis profesional.*

*Al Ing. Leandro Marcos Ramos: Por los consejos que me brindo y los ánimos para no decaer por cualquier problema que se me presentara y por recomendarme al Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco para poder realizar mi estancia de residencia profesional y mi proyecto de tesis profesional.*

*A mis revisores de la tesis profesional: Por el apoyo brindado y las correcciones que me hicieron en mi proyecto de investigación.*

*Amis amigos: Por apoyarme y convivir momento buenos y malos en el trayecto de mi estudio profesional. Al igual a mis amigos de maestría del Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco por haberme brindado su amistad y apoyo para poder llevar a cabo mi tesis profesional.*

## DEDICATORIA.

*A DIOS: Por protegerme, ayudarme siempre, y permitir disfrutar de esta gran vida y oportunidad de existir. Por mi parte tratare de ser cada día mejor espiritualmente y personalmente.*

*A MIS PADRES: Por haberme guiado, forjado los valores necesarios para ser lo que soy, por haber creído en mí, por todos los consejos y el apoyo que me han proporcionado.*

Sra. Marcelina Lauro Bautista.

Sr. Tomas Celestino Joaquín.

*A MIS HERMANOS: Por ser mis mejores amigos y compartir buenos y malos momentos.*

Prisciliano y Tomas.

<b>ÍNDICE GENERAL.</b>	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURA.....	viii
RESUMEN.....	xi
CAPITULO I INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
2.3 Hipótesis.....	4
CAPITULO III FUNDAMENTO TEORICO.....	5
3.1 Bioinoculantes.....	5
3.2 Control biológico: Definición y generalidades.....	6
3.3 <i>Trichoderma</i> .....	7
3.3.1 Ubicación taxonómica de <i>Trichoderma</i> .....	8
3.3.2 Morfología.....	9
3.3.2.1 Características macroscópicas.....	9
3.3.2.2 Características microscópicas.....	9
3.3.3 Factores que afectan el crecimiento de <i>Trichoderma</i> .....	11
3.3.4 Necesidades nutricionales de <i>Trichoderma</i> .....	13
3.3.5 Mecanismo de biocontrol de <i>Trichoderma</i> .....	14
3.3.5.1 Biocontrol por competencia.....	14
3.3.5.2 Competencia por nutrientes.....	15
3.3.5.3 Antibiosis.....	15
3.3.5.4 Micoparasitismo.....	16
3.3.5.5 Sinergismo.....	17
3.4 Producción de <i>Trichoderma</i> .....	17
3.4.1 Arroz.....	17
3.4.2 Melaza.....	18
3.4.3 Levaduras.....	19
3.5 Proceso fermentativo.....	20
3.5.1 Fermentación líquida.....	21
3.5.2 Fermentación sólida.....	22
3.6 Biorreactores.....	22
3.6.1 Biorreactor AIRLIFT de lazo interno.....	23
3.6.2 Biorreactores con agitación mecánica.....	24
3.6.3 Biorreactores con recirculación interna.....	24
3.6.4 Biorreactores sin recirculación interna.....	25
3.6.5 Biorreactores sin agitación y aireación no forzada.....	26
3.6.6 Biorreactores sin agitación y aireación forzada.....	26
3.7 Tomate ( <i>Solanum lycopersicon mill</i> ).....	27
3.7.1 Importancia económica del tomate.....	27
3.7.2 Clasificación taxonómica.....	28
3.7.3 Morfología.....	28
3.7.3.1 Raíz.....	28

	<b>Pag.</b>
3.7.3.2 Tallo.....	28
3.7.3.3 Hoja.....	29
3.7.3.4 Flor.....	29
3.7.3.5 Baya.....	29
3.7.4 Enfermedades del tomate.....	30
3.7.4.1 Moho gris ( <i>Botrytis cinérea</i> sp.).....	30
3.7.4.2 Podredumbre de raíces y cuello ( <i>Rhizoctonia solani</i> ).....	30
3.7.4.3 Tizón temprano ( <i>Alternaria dauci</i> f. sp. <i>solani</i> ).....	30
3.7.4.4 Tizón tardío ( <i>Phytophthora infestans</i> ).....	31
3.7.4.5 Pudrición de la corona y raíz del tomate y Marchitez vascular del tomate ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis Lycopersici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ).....	31
3.8 Agave tequilana Weber, Var. Azul.....	32
3.8.1 Importancia económica.....	32
3.8.2 Clasificación científica.....	33
3.8.3 Enfermedades del Agave <i>Tequilana Weber</i> , Var. Azul.....	33
3.8.3.1 Mancha gris ( <i>Cercospora agavicola</i> ).....	33
3.8.3.2 Pudrición de cogollo ( <i>Erwinia carotovora</i> ).....	34
3.8.3.3 Marchitez del agave ( <i>Fusarium oxysporum</i> ).....	35
CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.1 Activación y preparación de inóculo de cepas.....	37
4.1.1 Realización de cepario de trabajo de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
4.2 Determinación del protocolo más idóneo para generar biomasa de <i>Trichoderma</i> en tubos tipo Falcón.....	39
4.2.1 Pruebas de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp Bar321 y Bar331 contra los fitopatógenos de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	39
4.2.2 Aislamientos de fitopatógenos.....	41
4.2.2.1 Purificación de hongos obtenidos de las muestras De Tomate.....	42
4.2.2.2 Ubicación taxonómica de los aislados por Morfología.....	43
4.2.2.3 Pruebas de antagonismo de cepas de <i>Trichoderma</i> Spp., contra los fitopatógenos <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i> .....	43
4.2.3 Producción de conidias.....	44
4.2.4 Conteo de conidias.....	45
4.2.5 Elaboración de medio sintético de <i>Trichoderma</i> spp., para producir clamidosporas variando la concentración de	

	<b>Pag.</b>
conidias.....	46
4.2.5.1 Evaluación del número de clamidosporas.....	48
4.2.6 Preparación de MST con variación en la proporción de fuentes de carbono.....	49
4.2.6.1 Concentración de clamidosporas.....	50
4.2.7 Preparación de MST con máxima concentración de dextrosa/champiñón.....	50
4.2.7.1 Concentración de clamidosporas.....	51
4.3 Protocolo para incrementar la producción de conidias en medio líquido.....	51
4.3.1 Producción de conidias de cepas de <i>Trichoderma</i> T1 y C4 en medio líquido en sustrato de melaza/levadura.....	53
4.3.2 Fermentación líquida en biorreactor, de las cepas de <i>Trichoderma</i> T1 y C4.....	54
4.3.3 Producción de clamidosporas de las cepas T1 y C4, en pruebas pequeñas en tubos Falcón.....	55
4.4 Antagonismo de las cepas T1 y C4 de <i>Trichoderma</i> sobre infecciones de las especies <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> , f.sp. <i>lycopersici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis</i> en plantas de tomate.....	56
4.4.1 Aislamientos de las cepas T1 y C4 y de los fitopatógenos <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i> .....	59
4.5 Análisis estadístico.....	60
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
5.1 Activación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
5.2 Realización de ceparios de cepas de <i>Trichoderma</i> y de fitopatógenos de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> ....	62
5.3 Pruebas de antagonismo de cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321 y Bar331 contra los fitopatógenos de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	63
5.3.1 Antagonismo de cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321 y Bar331 Sobre los fitopatógenos de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> .....	64
5.3.2 Aislamiento de patógenos de de las especies <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , y <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Radicis</i> <i>lycopersici</i> de aislados de muestras de tomate.....	65
5.3.3 Análisis estadístico de pruebas de antagonismo de cepas de <i>Trichoderma</i> T1, T4, C4, Bar321, Bar331 y TOM contra el fitopatógeno de la especie de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	66
5.3.4 Antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> T1, T4, C4, Bar321, Bar331 y TOM contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.	

	<b>Pag.</b>
<i>radicis - lycopersici</i> .....	68
5.4 Producción de conidias de las cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321, Bar331, T1 y C4.....	71
5.4.1 Conteo de conidias de las cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321, Bar331, T1 y C4.....	71
5.5 Cantidad de clamidosporas producidas con variación de conidias.....	72
5.6 Cantidad de clamidosporas producidas con variación en la proporción de fuentes de carbono.....	74
5.7 Cantidad de clamidosporas producidas bajo condiciones variables en la concentración de dextrosa – champiñón como fuente de Carbono.....	76
5.8 Incremento en la producción de conidias por las cepas de <i>Trichoderma</i> T1 y C4 en medio líquido.....	80
5.9 Fermentación líquida en birreactor de las cepas de <i>Trichoderma</i> T1 y C4.....	81
5.10 Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma</i> y fitopatógenos en plantas de tomate, después de cumplir los quince días de haberse infectado.....	83
CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	89
6.1 Conclusiones.....	89
6.2 Recomendaciones.....	91
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....	92

## INDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Escala para la evaluación in vitro de la actividad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp.....	41
Cuadro 2	Tratamientos con cepas de <i>Trichoderma</i> spp., confrontados para evaluación de la capacidad de antagonismo <i>invitro</i> de estas cepas contra los fitopatógenos de tomate <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i> .....	44
Cuadro 3	Tratamientos con cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321 y Bar331, para producir clamidosporas, variando la proporción de conidias.....	47
Cuadro 4	Ingredientes para preparar Medio Sintético para <i>Trichoderma</i> en diferentes concentraciones.....	48
Cuadro 5	Distribución de tratamientos variando la proporción de fuentes de carbono, para producir clamidosporas, de cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321 y Bar331.....	50
Cuadro 6	Distribución de tratamientos con cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321 y Bar331, para producir clamidosporas, presentando máxima concentración de dextrosa/champiñón.....	51
Cuadro 7	Tratamientos distribuidos para incrementar la producción de conidias de <i>Trichoderma</i> de la cepa T1, en tres diferentes medios de cultivo líquido.....	53
Cuadro 8	Tratamientos distribuidos de las cepas de <i>Trichoderma</i> T1 y C4 para determinar la influencia de la temperatura constante a 28 °C y la sacarosa como fuente de carbono.....	56
Cuadro 9	Distribución de los tratamientos para el antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre las infecciones de las especies de <i>Fusarium</i> en plantas de tomate.....	59
Cuadro10	Nivel de antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> . Bar321 y Bar331 en confrontaciones <i>in vitro</i> contra las cepas de <i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i> después de cinco días de iniciado el estudio.....	65
Cuadro 11	Análisis estadístico de confrontaciones <i>in vitro</i> después de diez días, entre las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. Br321 y Br331 contra las cepas de <i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i> .....	65
Cuadro 12	Análisis estadístico de Antagonismo in vitro de diversas cepas	

	<b>Pág.</b>
de <i>Trichoderma</i> spp. Evaluadas a los cinco días de haberse iniciada la confrontación contra el fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	67
Cuadro 13 Antagonismo in vitro de diversas cepas de <i>Trichoderma</i> evaluado a los diez días de haberse iniciado la confrontación contra fitopatógeno de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> .....	67
Cuadro 14 Análisis estadístico de cepas de <i>Trichoderma</i> evaluado a los cinco días de haberse iniciado, la confrontación contra fitopatógeno de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> .....	68

## INDICE DE FIGURA

		Pág.
Figura 1	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trichoderma</i> .....	11
Figura 2	Fermentador de agitación mecánica con circulación interna. Tomado de Scriban, 1985.....	25
Figura 3	Fermentador de agitación mecánica sin circulación interna. Tomado de Scriban 1985.....	26
Figura 4	Fragmentos de papel filtro en el que se conservan las cepas de <i>Trichoderma</i> .....	38
Figura 5	Fragmento de micelio de <i>Trichoderma</i> spp., sembrado en medio de cultivo PDA, con papel filtro alrededor.....	38
Figura 6	A) Muestras de tallo y corona de tomate de donde se obtuvieron los fragmentos de tejido. B) Siembra en cajas Petri con medio PDA de los fragmentos de tejidos obtenidos.....	42
Figura 7	Cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de la cuadrícula utilizada para el recuento de células (derecha).....	46
Figura 8	Cepas activadas para conformar un cepario de trabajo. 1- Cepa "Q" de <i>Fusarium solani</i> , 2- Cepa "O" de <i>Fusarium oxysporum</i> , 3- Cepa de <i>Trichoderma</i> Bar331, 4- Cepa de <i>Trichoderma</i> Bar321, 5- Cepa T1 de <i>Trichoderma</i> , 6- Cepa C4 de <i>Trichoderma</i> .....	62
Figura 9	Ceparios de <i>Trichoderma</i> spp., 1. Bar331, 2. Bar321 3. T4, 4. T1, 5. C4, 6. C13, 7. C17, 8. C30, 9. C44, 10. <i>Trich-arándano</i> , y cepas de: 11. <i>Fusarium solani</i> , 12. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	63
Figura 10	Confrontaciones de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., Bar321 y Bar331 contra cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium solani</i> : .1.- Cepas confrontadas. 2.- Bar321 vs <i>F. solani</i> . 3. - Bar321 vs <i>F.oxysporum</i> . 4. - Bar331 vs <i>F. oxysporum</i> . 5. - Bar331 vs <i>F. solani</i> .....	64
Figura 11	Cepas purificadas de fitopatógenos y <i>Trichoderma</i> . 1.- Cepa de <i>Trichoderma</i> TOM. 2.- Cepa de la especie <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> . 3.- cepa de la especie <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Radiciis lycopersici</i> .....	66
Figura 12	1.- Cepa de <i>Trihoderma</i> C4 con mayor nivel de sobrecrecimiento sobre la cepa patogénica de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> . 2.- Cepa de <i>Trichoderma</i> T1, con mayor nivel de sobrecrecimiento sobre la cepa patogénica de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> .....	69

Figura 13	Enrollamiento de las hifas del hongo <i>Trichoderma</i> sobre las hifas de hongos fitopatógenos de agave del genero <i>Fusarium</i> , que es evidencia de eventos de micoparasitismo de una cepa sobre la otra.....	70
Figura 14	Producción de conidias de las cepas 1.- Bar321, 2.- Bar331, 3.- T1 y 4.- C4 de <i>Trichoderma</i> en cajas de Petri con el fin de obtener el inóculo de estas cepas.....	71
Figura 15	Conidias de cepas de <i>Trichoderma</i> enfocada al microscopio con un objetivo de 40 X.....	72
Figura 16	Cantidad de clamidosporas contabilizadas por campo óptico en medios líquidos, inoculados con las cepas Bar321 y Bar331 de <i>Trichoderma</i> spp, después de 24 horas de incubación.....	73
Figura 17	Número de clamidosporas contabilizadas por campo óptico, producidas por las cepas Bar321 y Bar331. ....	74
Figura 18	Clamidosporas por campo óptico contabilizadas después de 24 horas de incubación de las cepas de <i>Trichoderma</i> , Bar321 y Bar331, con variación en el % de dextrosa, respecto a un 100 % de fuente de carbono complementado con champiñón (p/p).....	75
Figura 19	Promedio de clamidosporas contabilizadas por campo óptico en tratamientos con proporciones variables de fuente de carbono dextrosa-champiñón. ....	76
Figura 20	Clamidosporas producidas bajo condiciones variables en la concentración de dextrosa – champiñón.....	77
Figura 21	Número de clamidosporas por campo óptico producidas en 48 horas, por las cepas de <i>Trichoderma</i> Bar321 y Bar331 bajo condiciones variables en la concentración de dextrosa – champiñón.....	78
Figura 22	Apariencia de las clamidosporas formadas sobre el tejido de champiñón y el micelio de las cepas de <i>Trichoderma</i> .....	78
Figura 23	Número de clamidosporas por campo óptico producidas en 24 horas, por las cepas de <i>Trichoderma</i> T1 y C4 crecidos en diferentes fuentes de carbono.....	83
Figura 24	Análisis estadístico de colonización de <i>Trichoderma</i> spp, sobre la raíz de las plantas de tomate.....	85

	<b>Pág.</b>
Figura 25 Análisis estadístico de colonización de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el tallo bajo de las plantas de tomate.....	86
Figura 26 Análisis estadístico de colonización de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el tallo alto de las plantas de tomate.....	86
Figura 27 1.- Raíz de planta de tomate inoculado con <i>Trichoderma</i> spp., 2.- Raíz no inoculada.....	87

## RESUMEN.

La investigación de Optimizar la producción en biorreactor de cepas de *Trichoderma* spp., para ser utilizadas como insumo biofungicida se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

El objetivo de este trabajo fue evaluar condiciones de cultivo en líquido de *Trichoderma* spp., primeramente a una escala baja de 25 ml en tubos tipo Falcón y posteriormente en biorreactor para eficientar su producción masiva.

Se evaluó el efecto antagónico de diferentes cepas de *Trichoderma* spp., identificado con las claves Bar321, Bar331, C4, T1, T4 y TOM, contra cepas patogénicas de agave *tequilana weber* var. Azul (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*), y cepas patogénicas de tomate (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*). Se obtuvo la mejor cepa de *Trichoderma* con el mejor efecto antagónico contra esos fitopatógenos. Con el fin de obtener una alta producción de clamidosporas en medio líquido, se evaluó en la cantidad de conidias y fuentes de carbono, corroborado las cantidades optimas de producción de clamidosporas en tubos Falcón, se evaluó como complemento, las condiciones optimas para obtener una mayor producción de conidias de *Trichoderma* en medio líquido utilizando diferentes sustratos (arroz, melaza, levadura y sacarosa. Concluyendo que la mayor producción de conidias de este hongo se reporta mezclando melaza y levadura. Identificado el mejor sustrato para una mayor producción de conidias, se inoculo al biorreactor con capacidad de 15 litros, incluyendo fuentes de carbono para producción de clamidosporas.

Del mismo modo se realizó la inoculación en vivo de este inoculante en plántulas de tomate, en confrontación con los fitopatógenos de tomate (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*) ubicada en el invernadero de fitopatología del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, los resultados obtenidos indicaron que *Trichoderma* colonizaban las raíces de las plántulas de tomate, inhibiendo la patogenicidad del patógeno.

**Palabras claves:** *Trichoderma*, fitopatógenos, conidias, clamidosporas, biorreactor, biofungicida.

## CAPITULO I INTRODUCCIÓN.

El interés sobre el Control Biológico como una solución alternativa, de bajo impacto ambiental, para las enfermedades de las plantas, surge como consecuencia de la concientización por parte de los gobiernos de los países desarrollados (Comunidad Europea y el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (NAFTA), acerca de los problemas derivados del empleo de diferentes agroquímicos en las tareas agrícolas y la conservación de los alimentos. El alto nivel de contaminación alcanzado por los pesticidas químicos en muchos países, la aparición de cepas patogénicas resistentes, los precios prohibitivos que dichos pesticidas alcanzan en muchas economías agrarias subdesarrolladas y la ausencia de variedades de cultivos resistentes a los patógenos, estimulan la búsqueda de técnicas que tienden a satisfacer una agricultura sostenida sin alterar el equilibrio del agrosistema (Menéndez, 1996).

Diversa especies de hongos del genero *Trichoderma* spp., son unos de los inoculantes más empleados en los últimos años, ya que posee buenas cualidades como antagonista de fitopatógenos de suelo, actuando como hiperparásitos competitivos, así mismo debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo. Del mismo modo, este hongo *deuteromycete* ha demostrado poseer otras propiedades

además del antagonismo, ya que se ha indicado que es capaz de inducir un mayor crecimiento en plantas tratadas; así como respuestas de defensas sistémicas, lo que hace de este, un inoculante recomendable gracias a su amplio rango de acción (Chávez, 2006).

La producción de *Trichoderma* spp. se ha realizado mediante fermentación sólida, sumergida o bifásica y ha sido estudiada con diferentes sustratos como arroz, avena, soya trigo, cebada, entre otros. Estos procesos representan una alternativa viable para producción tanto industrial como artesanal de este inoculante biológico, ya que el resultado es de alta calidad y consecuentemente el efecto del mismo en campo es apreciable. Así, al aplicar este hongo a las semillas, al sustrato en vivero, a las plantas en vivero, recién trasplantadas o plantas establecidas, éste hongo coloniza las raíces formando una capa protectora sobre ellas por medio de diversos mecanismos (Chávez, 2006).

Diferentes especies del género *Fusarium* son responsables de causar enfermedades en cultivos importantes, como por ejemplo *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en cultivos de agave y formas especiales de la especie *Fusarium oxysporum*, como *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, y *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* responsable del tipo marchitez vascular del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.). Entre los métodos más empleados para su control, está la aplicación de agroquímicos con la obtención de resultados desfavorables para el ambiente y la población, por lo cual surgen alternativas como el control biológico dentro de un manejo integrado de enfermedades, a través del uso de bacterias del género *Pseudomonas* y hongos como *Trichoderma* (Páez y Sanabria, 2007).

## **CAPITULO II OBJETIVOS.**

### **2.1 Objetivo general.**

Evaluar condiciones de cultivo en liquido de *Trichoderma* spp, en tubos tipo Falcón y biorreactor para eficientar su producción masiva.

### **2.2 Objetivos específicos.**

- Evaluar pruebas de confrontaciones de cepas de *Trichoderma* spp, contra patógenos de *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*, y *F. oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici* para corroborar estadísticamente su capacidad antagonista in vitro.
- Evaluar condiciones de crecimiento para eficientar la producción masiva de *Trichoderma* spp., utilizando medio liquido en tubos Falcón, como pruebas piloto.
- Corroborar la eficiencia de las condiciones determinadas en tubos tipo Falcón, para la producción máxima de conidias y clamidosporas bajo condiciones de biorreactor.

- Inocular las cepa de *Trichoderma* spp., y patógenos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, y *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero.

### **2.3 Hipótesis.**

Variando condiciones físicas de crecimiento, nivel de inóculo, concentración y tipo de fuente de carbono, se puede obtener un cultivo de *Trichoderma* spp con la combinación óptima de micelio y clamidosporas en biorreactor.

## **CAPITULO III. FUNDAMENTO TEÓRICO.**

### **3.1 Bioinoculantes.**

Un bioinoculante es un producto de uso agrícola que contiene uno o varios microorganismos del suelo y puede ser aplicado con el fin de incrementar su número, asociarse directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecer su interacción e incrementar su desarrollo vegetal o reproductivo. Estos bioinoculantes aplicados al suelo, tienen la capacidad de:

1. Solubilizar Nutrientes (biofertilizantes).
2. Estimular Rizogénesis y otras funciones fisiológicas. (PGPR por su sigla en inglés Plant Growth Promoting Rizhobacterias) Rizhobacterias, cuyos principales mecanismos de acción son fijación del nitrógeno atmosférico, producción de sustancias reguladoras de crecimiento e incremento en el volumen radical.
3. Control biológico de plagas y agentes causales de enfermedades.
4. Restaurar suelos o ecosistemas degradados o contaminados (biorremediación).
5. Activar procesos de compostaje.

El uso de bioinoculantes ha mejorado la comprensión de la relación planta – microorganismo en su contribución a minimizar los riesgos de degradación de los suelos y a maximizar el regreso de energía a los sistemas de producción (Valdés y Lundstedt, 2012).

### **3.2 Control biológico: Definición y generalidades.**

El control biológico es una práctica agrícola en la cual se aprovecha las características alimenticias de un organismo, en contra de otro que le servirá de alimento y las condiciones naturales de control. El control puede darse intercepas (individuos de un mismo género y especie con algunas modificaciones genéticas) o interespecies (individuos de diferentes especies). Los organismos más comúnmente utilizados en esta práctica son hongos, bacterias, insectos, virus y parasitoides (Martínez, 2001).

El control biológico puede definirse como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas.

El control biológico de plagas y patógenos ha sido utilizado en la agricultura de manera empírica desde sus inicios. La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de control biológico: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos. El

desarrollo y aplicación de este potencial de la naturaleza cobra cada vez mayor importancia, y seguramente tendrá un gran impacto en la agricultura en el futuro cercano. Recientemente, la aplicación de la ingeniería genética (la introducción artificial de genes de una especie en otra) para mejorar la resistencia de cultivos a plagas o patógenos ha abierto un sinfín de posibilidades para el control biológico (Serrano *et al.*, 2003).

### **3.3 *Trichoderma* spp.**

El género *Trichoderma* fue introducido por Persoon hace casi 200 años y consiste en hongos anamórficos aislado principalmente del suelo y de materia orgánica en descomposición (Grondona *et al.*, 1997).

El género *Trichoderma* comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente, la mayoría de cepas de *Trichoderma* no poseen etapa sexual por lo que producen únicamente esporas asexuales, se reproducen asexualmente mediante conidios y es el estado anamorfo. La etapa sexual cuando está presente, corresponde al género *Hypocrea* (estado teleomorfo), que es un hongo Ascomycotina (Rodríguez, 2002).

*Trichoderma* es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprofito o parasito, propiedades que benefician su actividad antagónica (Camargo, 2005). Es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de materia orgánica en descomposición, también es aislado comúnmente a partir de la superficie de raíces de varias plantas de madera y parasitando estructuras de diferentes hongos patógenos, debido a la competencia de nutrientes y micoparasitismo (Camargo, 2005).

*Trichoderma* es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la diversidad de enzimas que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfato de amonio (Cholango, 2009).

Gran parte del potencial de este hongo radica en el hecho de que presenta un amplio espectro de antagonismo con la capacidad de controlar muchos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Phytophthora* entre otros, que afectan muchos cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijol, trigo, etc. (Chet *et al.*, 1998).

### **3.3.1 Ubicación taxonómica de *Trichoderma*.**

*Trichoderma* spp, se encuentra clasificado según Alexopoulos *et al.*, 1996, como:

División: Eumycota.

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Hypomicetes.

Orden: Hyphales.

Familia: Monilaceae.

Género: *Trichoderma*.

Especie: *Harzianum*, *hamatum*, *viride*, *longibranchiatum*, entre otras.

### **3.3.2 Morfología.**

*Trichoderma* spp es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesto por quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos. (Harman, 1998).

#### **3.3.2.1 Características macroscópicas.**

Las colonias de *Trichoderma* son de crecimiento rápido y se puede observar en los primeros 5 días de incubación, con micelios inicialmente sumergidos. Dependiendo de la cepa y el medio de cultivo el micelio es aéreo, hialino, eventualmente floccoso o lanoso.

El reverso de la colonia se presenta sin color, o de color amarillo, rojo opaco, ámbar o verde amarillo. Algunas cepas pueden presentar un aroma pronunciado o débil a coco o alcanfor. Su conidiación es efusa, en manojo, o en pústulas típicamente de color verde, menos común blancas, gris o pardas se logra apreciar al tercer o cuarto día de incubación (Gams y Bissett, 1998).

#### **3.3.2.2 Características microscópicas.**

Según Gams y Bissett, (1998). Las características microscópicas por las que se identifica a *Trichoderma* ssp, son:

**Fialides:** pueden estar dispuestos regularmente en forma de verticilos, en parejas alternadamente o en disposiciones irregulares. El cuerpo de los fialides es una característica de algunas divisiones, así en la división *Pachybasium* los fialides son característicamente pequeños y verticales, mientras que en la división *Longibrachiatum* son alargadas en forma de cilindro, en la mayoría de las cepas las partes terminales de los fialides tienden a ser alargadas y estrechas.

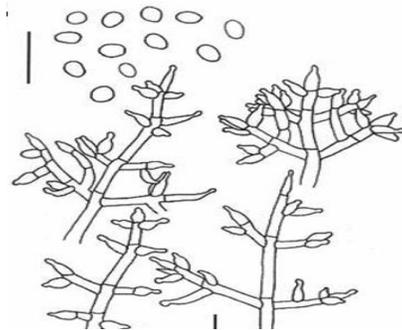
**Hifas:** pueden ser anchas y rectas o relativamente angostas y flexibles. La punta de los conidióforos en especies de la división *Pachybasium* termina en una elongación la cual podría ser recta ondulada y espiralada.

**Conidias:** existen varias formas de conidias desde globosas, elipsoides, ovoidales y de pequeños cilindros, la parte final en forma estrecha basal y truncada. En general las variaciones de las dimensiones de las conidias en *Trichoderma* spp, no son grandes; sin embargo, las especies que son parecidas pueden ser usualmente diferenciadas en tamaño. La superficie de las conidias aparece lisas en la mayoría de las especies en observaciones a través de la luz del microscopio, aunque algunas especies tienen conidias aparentemente lisas y con estructuras adicionales. En algunos grupos de *Trichoderma viride* las conidias suelen ser ásperas y rugosas, y las conidias pueden tener proyecciones laterales en forma de balas al exterior en dos especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense*, los pigmentos de las conidias también son características que varían de color desde cuerpos verdes o plomo o café pero estos colores no son frecuentes; en algunas especies maduras las conidias suelen ser de color verde oscuro y otras suelen ser más pálidas.

Clamidosporas: son muy comunes en las especies de *Trichoderma* sp. Pero estas tienden a ser en forma de globo o elipse, terminal o intercalada, con olores a moho o humedad, de color amarillento o verdoso y de 6-15µm de diámetro en la mayoría de especies.



(Image Courtesy of www.doctorfungus.org @ 2005).



Conidióforo y conidias de *Trichoderma* spp. Microbiology. 2006 Sep;

Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas de *Trichoderma*.

### 3.3.3 Factores que afectan el crecimiento de *Trichoderma*.

Dentro de los factores que afectan el crecimiento *Trichoderma* se encuentran los de tipo físico y de tipo nutricional como:

**Fototrofia.** La mayoría de especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos (Domsch *et al.*, 1980).

**Esporulación.** *Trichoderma* esporula fácilmente sobre muchos sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico circular en respuesta a la alternación de luz diurna y oscuridad, donde los conidios se producen durante el período de luz. La

exposición de los cultivos en agar durante 20 a 30 segundos a la luz es suficiente para inducir la esporulación. La mayor foto inducción de la conidiogénesis se obtiene con la exposición a la luz del día por 3 minutos o cerca de la radiación ultravioleta tipo A (366 nm) de 10 a 30 segundos (Fonseca, 1998). Además, el número total de conidias producidos es inversamente proporcional a la concentración de la fuente de carbono.

Cuando la concentración de carbono es inferior a 50 g/l, la producción de conidias se eleva; por el contrario, cuando la concentración de carbono supera este valor, la esporulación tiende a disminuir (Astudillo, 1999). De igual manera, las sales minerales en general (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>) en una concentración elevada (20-70 g/l) inhiben la esporulación. Los iones de sodio y potasio producen una disminución de la presión osmótica de las células inhibiendo la esporulación. Una baja concentración de iones calcio (1-10 g/l), aumenta la presión osmótica dentro de las células fúngicas induciendo así la esporulación (Astudillo, 1999).

**Germinación.** La germinación de las conidias de *Trichoderma* depende del tipo de enlace que presenta la fuente de carbono, la cual puede ser un disacárido o un polisacárido. Para su aprovechamiento el hongo emplea enzimas como amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas y endo y exocelulasas que realizan la hidrólisis de los azúcares simples para dar inicio a la germinación en los diferentes medios de cultivo; mientras que para iniciar el proceso de infección, se debe tener en cuenta la composición química de la pared celular de los conidias (Astudillo, 1999).

**Salinidad.** *Trichoderma* se ve inhibido en su crecimiento con altas concentraciones de cloruro de sodio (80 g/l aproximadamente), aunque tolera hasta una

concentración de 60 g/l de cloruro de sodio, éstas condiciones pueden ocasionar mutaciones perjudicando el proceso de conidiogénesis, al disminuir notablemente la producción de esporas (Moore, 1996).

**pH.** El pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. La mayoría de cepas de *Trichoderma* tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 2 a 6 con un óptimo de 4; y se ha reportado que la producción óptima de biomasa ocurre en un rango de pH entre 4.6 y 6.8 (Kredics *et al.*, 2003).

**Temperatura.** El rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* se encuentra entre los 10 °C a los 40 °C, considerándose una óptima de 25 °C (Alexopoulos, 1996). Según otros estudios, se ha demostrado que el crecimiento saprófito en suelo de *Trichoderma koningii*, se presenta a una temperatura que oscila entre los 20 °C y los 30 °C, con una temperatura óptima de 25 °C.

**Humedad.** El contenido de humedad que favorece el crecimiento saprófito se encuentra alrededor del 70 % y el 80 % (Wakelin *et al.*, 1999).

### **3.3.4 Necesidades nutricionales de *Trichoderma*.**

Los microelementos, sales y vitaminas en grandes cantidades no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma* (Papavizas, 1985). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de hongos en general incluyen hierro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno en concentraciones muy pequeñas cercanas a  $10^{-9}$  M. Dentro de las vitaminas necesarias se encuentran tiamina (B1), biotina (B7), piridoxina (B6), ácido

nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalamina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore, 1996).

### **3.3.5 Mecanismo de biocontrol de *Trichoderma* spp.**

El entendimiento de la diversidad genética de cada cepa dentro de las especies de *Trichoderma* y sus mecanismos de biocontrol ha permitido mejorar la aplicación de las diferentes cepas. Estos mecanismos son diversos, complejos y pueden actuar sinérgicamente para lograr el control de enfermedades (Howell, 2003).

Las diferentes especies de *Trichoderma* ejercen el biocontrol de una manera indirecta bien sea por competencia por nutrientes o espacio, antibiosis (producción de metabolitos), modificando las condiciones ambientales o mediante la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y de una forma directa por micoparasitismo. Algunas especies del género *Trichoderma*, son muy comunes en diversos suelos, principalmente en suelos ácidos y ricos en materia orgánica, estas especies son fáciles de aislar, cultivar, y de propagar en diversos sustratos y la mayoría presenta un buen micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004).

#### **3.3.5.1 Biocontrol por competencia.**

**Fungistasis:** Un buen antagonista es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies, incluyendo plantas, y sobrevive bajo condiciones adversas o competitivas (Benítez *et al.*, 2004).

Las cepas de *Trichoderma* crecen rápidamente cuando se inoculan en suelo ya que son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas tales como el dicloro difenil tricloro etano (DDT) y compuestos fenólicos (Chet, 1987), además recuperan muy rápidamente después de la adición de dosis subletales de algunos de estos compuestos.

#### **3.3.5.2 Competencia por nutrientes.**

La inanición es la causa más común de muerte para microorganismos, la competencia por nutrientes limitantes, resulta en un control biológico de hongos fitopatógenos, antagonistas y micoparasitos (Chet *et al.*, 1997).

Un ejemplo claro de este mecanismo de acción se encuentra representado en hongos filamentosos, donde la toma de hierro es esencial para la viabilidad de los mismos. Bajo condiciones de deficiencias de hierro, el hongo excreta agentes quelantes específicos de bajo peso molecular llamados sideroforos que le permiten tomar el hierro en forma reducida (Chávez, 2004).

#### **3.3.5.3 Antibiosis.**

La antibiosis ocurre durante la interacción de los compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Además las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden colonización por otros microorganismos antagonizados; entre estos metabolitos, la producción de ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaiboiles, antibióticos, 6 penthyl pirona,

massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido hepteldico y otros están siendo descritos (Howell *et al.*, 1998).

#### **3.3.5.4 Micoparasitismo.**

El micoparasitismo es esencialmente una interacción hospedero-parasito. La interacción comienza con el reconocimiento del hospedero o de moléculas liberadas por este, por acción enzimática del micoparasito. Tales señales pueden ser generadas por los diferentes polímeros componentes de la pared de distintas estructuras de hongos patógenos o, productos de degradación de la pared celular que son liberados durante el contacto o el acercamiento del hospedero (Mukherjee *et al.*, 2004).

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped. *Trichoderma* spp puede ejercer control directo por el rango de parasitismo de hongo, detectando otros hongos y creciendo sobre el (Benítez *et al.*, 2004).

El proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas. Comienza por el crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma* hacia el hospedador, estimulado por moléculas procedentes del mismo, de naturaleza desconocida. Las únicas que se han detectado hasta ahora son aminoácidos y azúcares, por lo que no cabe esperar que la inducción sea específica del hospedador (Chet y Baker, 1981).

**Degradación de la pared celular:** La lisis es el mecanismo en el cual intervienen las enzimas hidrolíticas producidas por los microorganismos antagonistas como factores biocontroladores. Se ha demostrado que *Trichoderma* spp produce celulasas, glucanasas y quitinasas que degradan invitro la celulosa de las paredes celulares de los microorganismos omycetes y la quitina y B – 1, 3 glucanos de las paredes celulares de microorganismos deuteromicetes como gliocladium spp (Elad y Chet, 1982).

### **3.3.5.5 Sinergismo.**

El sinergismo entre la actividad de enzimas líticas y antibióticos, es la mejor estrategia para ser un buen controlador, además de abrir el campo para posibles cepas transformantes que puedan producir las diferentes enzimas logrando un sinergismo que sea relevante (Benítez *et al.*, 2004).

### **3.4 Producción de *Trichoderma*.**

Los sustratos empleados para la producción de microorganismos, en lo posible deben contener todos los elementos necesarios para una adecuada síntesis del material celular y para la producción de metabolitos, cuando son requeridos.

#### **3.4.1 Arroz.**

El arroz es el cereal más rico en almidón, en torno al 70 %. Su contenido en proteína es bajo (7.3 %) pero es rico en lisina (4.1 %). Su contenido en cenizas es muy escaso y su aporte en macrominerales prácticamente despreciable. A si mismo su contenido en vitaminas es muy bajo (FEDNA, 2003).

La estructura química del almidón es relativamente sencilla comparada con otros sustratos. Esencialmente está compuesto de dos polímeros relacionados en diferentes proporciones: amilosa (16 – 30 %) y amilopectina (68 – 85 %). La amilosa es un polímero de glucosa unido por enlaces  $\alpha - 1,4$ , principalmente en cadenas lineales. La amilopectina es un polímero de glucosa altamente ramificado incluyendo también enlaces  $\alpha - 1,6$  en los puntos de ramificación (Raimbauth, 1998).

De esta manera *Trichoderma* spp hidroliza el polímero del almidón mediante enzimas como glucoamilasas,  $\alpha -$  amilasas, pululanasa e isoamilasas (Raimbauth, 1998), obteniendo moléculas libre de glucosa, los cuales son fáciles de asimilar, permitiendo el crecimiento micelial y la producción de conidios, al mismo tiempo se producen ácidos orgánicos producto del desarrollo del microorganismo los cuales influyen en la disminución gradual del pH. Del mismo modo se ha reportado la producción de enzimas celulíticas por *Trichoderma* spp., haciéndolo capaz de crecer en sustratos poco nutritivos como mezcla de paja con trigo, sustrato asimilado fácilmente gracias a la producción de estas enzimas (Chahal, 1985).

### **3.4.2 Melaza.**

La melaza es un líquido denso y negrozco constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la mayor parte de las azúcares de caña por cristalización y centrifugación. Las melazas son concentrados de hidratos de carbono. Los azúcares representan del orden del 80 % de su contenido en materia seca. Como consecuencia son muy palatables y su contenido energético es apreciable. Este subproducto de la industria azucarera posee un alto contenido de

sacarosa (32 %), oligosacáridos (rafinosa) y ácidos orgánicos (málico, oxálico, láctico, acotínico y cítrico) (FEDNA, 2003).

La melaza de caña tiene un contenido en proteína bruta cercano al 4 %. La fracción nitrogenada es totalmente soluble, estando constituida en un 50 % de aminoácidos (principalmente aspártico y glutámico) y en un 50 % por nitrógeno no proteico. La proporción de aminoácidos esenciales es muy baja.

Las melazas presentan alto contenido en cenizas. La de caña es rico en calcio, cloro y magnesio así como en potasio (1,5 – 4 %). Sin embargo el nivel de fósforo es reducido (FEDNA, 2003).

### **3.4.3 Levaduras.**

Las levaduras son hongos unicelulares que se pueden dividir asexualmente, por gemación o división (fisión), aunque ciertas levaduras también son capaces de crecer como filamentos irregulares formando un micelio. Asimismo, pueden reproducirse sexualmente, formando ascas que contienen ascosporas haploides.

El papel de las levaduras como agentes fermentadores no fue reconocido sino hasta 1856 por Luis Pasteur, quien propuso la teoría vitalística y demostró que las células viables de levaduras provocan fermentación en condiciones anaerobias, proceso en el cual el azúcar presente en el jugo es convertido principalmente en etanol y CO<sub>2</sub> (Calzada *et al.*, 2000).

### 3.5 Proceso fermentativo.

Fermentación es el término utilizado para describir cualquier proceso para la obtención de un producto por medio del cultivo de un microorganismo. El producto puede ser la célula en sí, referida como producción de biomasa o un metabolito del microorganismo.

En este sentido, una fermentación puede ser vista como un sistema de tres fases, implicando líquido, sólido, reacciones de gas sólido y de gas líquidas:

- La fase líquida contiene sustancias nutritivas, así como sustancias disueltas y metabolitos.
- La fase sólida consiste en células individuales, pellets, sustratos insolubles o productos metabólicos precipitados.
- La fase gaseosa proporciona un depósito para el suministro de oxígeno y para el retiro de CO<sub>2</sub> (Pumphrey y Julien, 1996).

La producción de biomasa constituye con frecuencia el objetivo de numerosas fermentaciones; cuando se desea obtener esa producción es necesario hacerlo en las condiciones en las que el rendimiento energético sea el mejor, es decir, en las que haya una oxidación completa del sustrato por el oxígeno del aire y en las que toda la energía potencial del sustrato sea liberada y utilizada para la síntesis (Arnaud *et al.*, 1985).

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros como pH, temperatura, oxígeno disuelto

y nutrientes, entre otros; con el fin de que el microorganismo ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base para un producto de interés comercial (Forero, 2002).

Los microorganismos implicados en los procesos de fermentación son principalmente quimiorganotrofos, es decir, que pueden obtener su energía y su fuente de carbono por la oxidación de compuestos orgánicos. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos: los *zygomycotina*, con hifas aceptadas como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los Deuteromicotina, septados u hongos imperfectos, por ejemplo los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium*. En general la producción masiva de microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie (Ward, 1989).

### **3.5.1 Fermentación líquida.**

La fermentación líquida o sumergida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación sumergida se realiza

principalmente usando tres métodos de alimentación de sustrato: fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y fermentación en cultivo continuo (Crueger y Crueger, 1989).

### **3.5.2 Fermentación sólida.**

La fermentación sólida se define como el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en sustratos sólidos húmedos en la ausencia de agua libre. La habilidad de los microorganismos para crecer en un sustrato sólido es una función de sus requerimientos en cuanto a la actividad de agua, su capacidad de colonización y penetración en el sustrato y su habilidad para asimilar mezclas de diferentes polisacáridos, debido a la naturaleza usualmente compleja de los mismos (Pérez – Guerra *et al.*, 2003).

Los sustratos que con mayor frecuencia han sido utilizados para esta evaluación incluyen una variedad de productos agrícolas como arroz, trigo, soya y maíz entre otros (Pérez – Guerra *et al.*, 2003).

Este tipo de fermentación involucra interacciones de la biomasa microbiana con un sustrato sólido humedecido, en este el microorganismo puede crecer entre los fragmentos del sustrato (Padmasari, 2005).

### **3.6 Biorreactores.**

Los biorreactores son aparatos donde se desarrollan una serie de reacciones, por la acción de microorganismos o de enzimas, bajo un ambiente controlado en el que se pretende un crecimiento celular o la producción de metabolitos de interés con una

eficiencia óptima. Para lograr el desarrollo de un proceso fermentativo es necesario tener en cuenta que los microorganismos necesitan ciertos elementos nutricionales (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y nutrientes específicos) para activar su metabolismo celular; adicionalmente, es indispensable la determinación y selección de las variables por medir, controlar y manipular el curso de la fermentación (temperatura, velocidad de agitación, concentración de nutrientes, presión, oxígeno disuelto, pH, entre otros), para mantener unas condiciones óptimas de crecimiento (Pachón, 1997).

### **3.6.1 Biorreactor AIRLIFT de lazo interno.**

Los reactores airlift son equipo neumáticos de contacto gas – líquido empleados en procesos aerobios en los cuales el gas (aire u oxígeno) cumple las funciones de suministrar oxígeno y agitar el medio líquido contribuyendo a la transferencia de calor y de materia. Este concepto se utiliza principalmente en los reactores cilíndricos profundos que cuentan con conductos de aireación, tubos concéntricos abiertos en ambos extremos y localizados justo por encima del punto de difusión del aire (Tovar y Prieto, 1995). Se utilizan frecuentemente para cultivos de células animales y vegetales, además de catalizadores inmovilizados, debido a que los esfuerzos cortantes son muy inferiores a los que se presentan en los reactores agitados convencionales. El rasgo más característico que diferencia los reactores airlift de las columnas de burbujeo es que las corrientes de flujo de líquido están bien definidas, debido a la separación física de las corrientes ascendente y descendentes (Doran, 1998).

### **3.6.2 Biorreactores con agitación mecánica.**

Son tanques cilíndricos con un motor que mueve una flecha central, lo cual soporta uno o más agitadores. Generalmente, se le colocan cuatro baffles a la misma distancia del centro alrededor de la periferia del tanque (Chisti y Moo-young, 2002). La relación altura/diámetro es entre tres y cinco, excepto en el cultivo de células animales donde, normalmente, no excede de dos y se utilizan reactores sin baffles (Chisti y Moo-young, 2002). El agitador puede ser introducido por arriba o por el fondo del tanque siempre que se cuente con un sello hermético.

En el laboratorio, los recipientes con volúmenes de hasta 20 litros son elaborados de vidrio y para volúmenes mayores de acero inoxidable (Scragg, 1997). Pueden ser con o sin recirculación interna.

### **3.6.3 Biorreactores con recirculación interna.**

En los biorreactores con recirculación interna (Fig. 2) se utiliza un cilindro (tubo de circulación) en el interior del tanque en el cual el líquido de fermentación se introduce por la parte superior y sale por la parte inferior, el fluido en movimiento arrastra las burbujas de gas, mejorando la transferencia de oxígeno, la desventaja de este tipo de biorreactor es que no se pueden utilizar en el cultivo de organismos filamentosos los cuales no soportan grandes fuerzas de corte (Scriban, 1985).

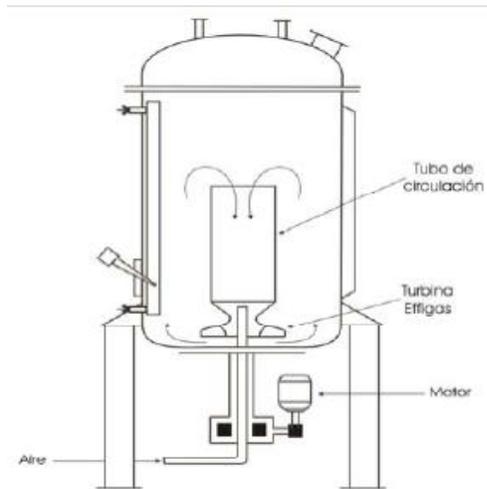


Figura. 2 Fermentador de agitación mecánica con recirculación interna (Scriban, 1985).

#### 3.6.4 Biorreactores sin recirculación interna.

En los biorreactores sin circulación interna (Fig. 3) son convenientes para la producción de antibióticos, por tratarse, generalmente, de procesos exotérmicos que utilizan microorganismos filamentosos relativamente frágiles y sensibles a la acción de corte y cuyas necesidades de oxígeno no son muy grandes. Para reducir el efecto de corte, la velocidad de rotación del agitador es de 50-60 rpm, que además asegura, la transferencia del oxígeno que el microorganismo necesitan (Scriban, 1985).

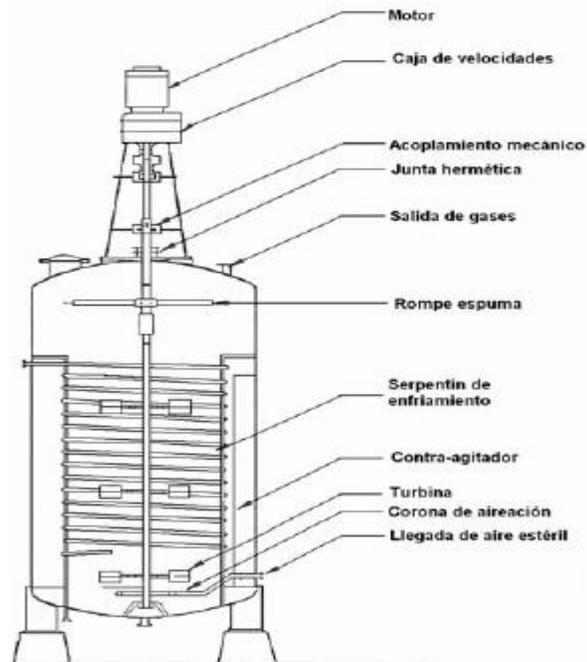


Figura. 3 Fermentador de agitación mecánica sin circulación interna (Scriban 1985).

### 3.6.5 Biorreactores sin agitación y aireación no forzada.

Generalmente son conocidos como fermentadores de bandejas, este tipo de biorreactores poseen una cámara cerrada con varias bandejas removibles. El aire circula alrededor de las bandejas pero de manera forzada a través de esta y es utilizado para regular la temperatura. De igual manera se puede utilizar aire húmedo o seco para controlar la humedad (Chen y Zhu, 2013).

### 3.6. 6 Biorreactores sin agitación y aireación forzada.

También conocidos como biorreactores de lecho o empacado, consisten de un lecho estático por el cual pasa aire a través de este (Mitchell *et al.*, 2006). El flujo de aire

permite un mejor control de la temperatura dentro del lecho, pero siempre existirá un gradiente de temperatura a la entrada y salida de aire. Esto puede producir un crecimiento más lento o incluso la muerte de los microorganismos así como la disminución del rendimiento (Chen y Zhun, 2013).

### **3.7 Tomate (*Solanum lycopersicon mill*).**

#### **3.7.1 Importancia económica del tomate.**

El tomate (*Solanum lycopersicon Mill.*) es considerado una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, ocupando el segundo lugar solo superado por el cultivo de la papa (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

El tomate (*Solanum lycopersicon Mill.*) es una de las hortalizas más difundidas en todo el mundo con alto valor económico, ya que representa 30% de la producción hortícola a nivel mundial (Mejía *et al.*, 2007). Su demanda aumenta considerablemente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años, se debe principalmente al rendimiento e incremento de la superficie cultivada (Jaramillo *et al.*, 2007).

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicon Mill*) representa uno de los principales cultivos tanto a nivel mundial como nacional debido a la importancia que tiene para el consumo fresco así como para su utilización en la agroindustria. Sin embargo, cada año los rendimientos son afectados en gran parte por la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo (Jiménez y Sanabria, 2008).

### **3.7.2 Clasificación taxonómica.**

De acuerdo a Hunziker (1979), la taxonomía generalmente aceptada del tomate es:

Clase: Dicotiledóneas.

Orden: Solanales.

Familia: Solanaceae.

Subfamilia: Solanoideae.

Tribu: Solanae.

Género: *Lycopersicon*.

Especie: *esculentum*.

### **3.7.3 Morfología.**

#### **3.7.3.1 Raíz.**

La planta presenta una raíz principal pivotante (que crece unos 3 cm al día hasta que alcanza los 60 cm de profundidad), simultáneamente se producen raíces adventicias y ramificaciones que pueden llegar a formar una masa densa y de cierto volumen. Sin embargo, este sistema radical puede ser modificado por las prácticas culturales, de tal forma que cuando la planta procede de un trasplante, la raíz pivotante desaparece siendo mucho más importante el desarrollo horizontal (Rodríguez *et al.*, 2001).

#### **3.7.3.2 Tallo.**

Los tallos son ligeramente angulosos, semileñosos, de grosor mediano y con tricomas (pilosidades), simples y glandulares. Eje con un grosor que oscila entre 2-4

cm en su base, sobre el que se van desarrollando las hojas, tallos secundarios e inflorescencias. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales (Escalonada *et al.*, 2009).

### **3.7.3.3 Hoja.**

Las hojas son compuestas e imparipinnadas, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternada sobre el tallo (Escalonada *et al.*, 2009).

### **3.7.3.4 Flor.**

La flor del tomate es perfecta. Consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color amarillo dispuestos de forma helicoidal y de igual número de estambres que se alternan con los pétalos. Los estambres están soldados por las anteras y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo y evitan la polinización cruzada. El ovario es bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias denominadas comúnmente como “racimos”. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal. Las inflorescencias se desarrollan cada 2-3 hojas en las axilas (Escalonada *et al.*, 2009).

### **3.7.3.5 Baya.**

Baya bi o plurilocular que puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos y 600 gramos. Está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Escalonada *et al.*, 2009).

### **3.7.4 Enfermedades del tomate.**

#### **3.7.4.1 Moho gris (*Botrytis cinerea sp*).**

En las flores ataca los pedúnculos florales formando lesiones deprimidas y húmedas cubiertas de color gris. En tallos en la zona de inserción de las ramas por la proximidad de hojas afectadas aparecen canchales hundidos de color castaño claro y secos. En las hojas se desarrollan manchas grandes, circulares color castaño, aspecto húmedo con reblandecimiento de los tejidos. En frutos produce podredumbre acuosa de color gris (Sosa, 2013).

#### **3.7.4.2 Podredumbre de raíces y cuello (*Rhizoctonia solani*).**

La enfermedad puede atacar las plántulas previas al trasplante, post-trasplante, plantas jóvenes y aún adultas. La enfermedad se manifiesta sobre las raíces en forma de manchas secas, bien delimitadas, color castaño rojizo. En el cuello puede desarrollar lesiones hundidas color castaño. Numerosas plantas son hospederos y puede mantenerse en el suelo y en restos de plantas enfermas en forma de micelio o esclerocios (Sosa, 2013).

#### **3.7.4.3 Tizón temprano (*Alternaria dauci f. sp. Solani*).**

Toda la parte aérea de la planta es susceptible, pero es mayor la incidencia en las hojas maduras. Las lesiones son pardo oscuras, con anillos concéntricos, de bordes definidos, circulares, hasta 2-3 cm de diámetro rodeadas de un halo amarillento (Sosa, 2013).

#### **3.7.4.4 Tizón tardío (*Phytophthora infestans*).**

Sobre las hojas se desarrollan manchas grandes húmedas, pardas redondeadas con margen más claro. La infección es muy virulenta, avanza rápidamente, infectando follaje, tallos, pecíolos y frutos. La coloración general es castaña. Al entrar en los invernaderos afectados se aprecia olor a “heno” o material compostado. Si descienden los valores de humedad bajo cubierta las lesiones adquieren consistencia de papel. El hongo sobrevive en el suelo, sobre restos de cultivo (Sosa, 2013).

#### **3.7.4.5 Pudrición de la corona y raíz del tomate y Marchitez vascular del tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*).**

Estos son hongos cosmopolitas, con múltiples formas especializadas, cuyo ciclo de vida incluye una etapa de crecimiento Saprofíticos y una de crecimiento parasitario, con distinta fases en cada uno de ellos de muy difícil manejo por su gran capacidad para establecerse y colonizar casi cualquier tipo de suelo, además de que pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en suelos infestados y recuperarse rápidamente a fumigaciones o a otras prácticas agrícolas que se incluyan en el manejo de estas enfermedades (Apodaca, 2006).

La pudrición de la corona y raíz es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici* y la marchitez vascular es inducida por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Apodaca, 2006).

El primer indicio aparece al inicio de la floración o formación de primeros frutos y es un amarillamiento de las hojas inferiores, las cuales gradualmente se marchitan y mueren adheridas a la planta y posteriormente caen al suelo. Los síntomas pueden aparecer en un solo lado de la planta (ataque en el tejido conductor de algunas ramas) mientras que el resto permanece sano, aunque puede manifestarse en toda la planta. Bajo condiciones favorables, se puede manifestar en etapas más tempranas del cultivo (Mendoza, 1996).

Al hacer cortes transversales principalmente en la parte baja del tallo se puede observar una coloración café obscura del tejido vascular (xilema), si el corte es longitudinal se puede ver la tonalidad café del tejido vascular a lo largo de todas las ramas, tallos y raíces. Las plantas en estas condiciones se ven afectadas en la producción, causando que los frutos sean de baja calidad; induce achaparramiento de planta, marchitez, caída de hojas al suelo y por ultimo muerte de plántulas ó plantas adultas (Carrillo *et al.*, 2003).

### **3.8 Agave *Tequilana* Weber, Var. Azul.**

El agave tequilana weber en su variedad azul, es el único agave que goza de propiedades que son exclusivas en la producción de tequila, empleándose como materia prima en la elaboración de tequila 100 % agave (Valenzuela, 2003).

#### **3.8.1 Importancia económica.**

El *Agave tequilana* Weber variedad Azul destaca en México por que cubre una superficie de 170 000 ha cultivadas en condiciones de temporal, de las cuales el

98.3% se concentra en el estado de Jalisco, generando importantes divisas al estado y al país a través de la industria tequilera (SAGARPA, 2006).

### **3.8.2 Clasificación científica.**

Reino: Plantae.

División: Antophyta.

Clase: Monocotiledóneas.

Orden: Liliopsida.

Familia: Agavaceae.

Género: Agave.

Especie: *Agave Tequilana Weber*, var. Azul (Valenzuela, 2003).

### **3.8.3 Enfermedades del Agave *Tequilana Weber* Var. Azul.**

El cultivo del agave es afectado por factores adversos de índole físico llamado factores abióticos, como los ambientales que en un momento dado, al estar fuera del rango que la planta pueda tolerar, causaran un daño. Ejemplos son las bajas temperaturas o heladas, un Ph ácido o la deficiencia de algún nutriente. Otros factores, denominados bióticos, son microorganismos donde se incluyen hongos y bacterias que viven a expensas de este cultivo y le causan enfermedad (Rendon *et al.*, 2011).

#### **3.8.3.1 Mancha gris (*Cercospora agavicola*).**

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas acuosas de color grisáceo en la base de las hojas y que posteriormente se expanden, hasta

alcanzan el cogollo. Cuando las lesiones llegan al cogollo avanzan de manera descendente hasta afectar a la piña, lo que cual finalmente provoca la muerte de la planta. Esta enfermedad es causada por el hongo ascomiceto, que en su fase asexual se denomina *Cercospora agavicola* dentro de los deutromycetos. Inicialmente la presencia de plantas enfermas tiene un patron de distribucion al azar, pero si no se toman las medidas adecuadas y las condiciones climaticas son favorables, se pueden conformar manchones de plantas afectadas, que de manera rapida pueden propagar la enfermedad a todas las plantas de la parcela ( Rendon *et al.*, 2011).

### **3.8.3.2 Pudricion de cogollo (*Erwinia carotovora*).**

Esta enfermedad provoca lesiones necroticas acuosas y malolientes en las hojas. Las lesiones iniciales aparecen en el apice de las hojas, avanzando de forma descendente hacia la piña, pudriendola y causandole la muerte a la planta. Es comun que esta enfermedad se desarrolle en las hojas ineteriores del cogollo las cuales practicamente se desintegran y despiden un olor fetido. El origen de esta enfermedad se determino como causado por un grupo de bacterias Gram negativo de las especies *Erwinia cacticida*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* sp. que provocan pudriciones suaves. La enfermedad puede presentarse en hijuelos desde el inicio de la plantacion, especialente cuando no se realiza eficientemente el tratamiento preventivo al transplante. La dispersion de una planta a otra se ve favorecida bajo condiciones de lluvia combinada con vientos, especialmente cuando las condiciones de temperatura son inferiores a 10 ° C. En estas condiciones se facilita el movimiento

de exudados de las lesiones a puntos de ingreso a hojas de plantas sanas ( Rendon *et al.*, 2011).

### **3.8.3.3 Marchitez del agave (*Fusarium oxysporum*).**

El sintoma de marchitez en el cultivo de agave evidencia reduccion de su capacidad para absorber agua del suelo y debido a que la planta sigue transpirando y las hojas pierden turgencia, lo que se aprecia inicialmente como un cambio de color, del color tipico de la especie a un color amarillento. Las hojas se enrollan formando un encarrujamiento, que avanza hasta quedar las hojas cafes totalmente deshidratadas en la parte baja de la planta y finalmente la planta muere ( Rendon *et al.*, 2011).

Esta enfermedad es causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, el que se encuentra en las raices y el tallo. En plantas de agave se induce la marchitez por un daño al xilema, sin afectar en gran medida su sistema radical. Cepas diferentes de esta misma especie de hongo son patogenos economicamente importantes en cultivos como: tomate, algodón, platano, frijol, entre muchos otros, donde causan las llamadas marchiteces vasculares. Sin embargo, la lesion rojiza que se presenta en la corona y raices necrosadas del agave, que tambien induce una marchitez, es causada por el hon *Fusarium solani*. La descripcion de los sintomas de esta enfermedad se parece a la denominada pudricion del tallo del agave ( Rendon *et al.*, 2011).

Los hongos antes mencionados ( *F. oxysporum* y *F. solani*) ingresan a la planta a traves de la raiz y cuando esta muere y se degrada su tejido, se liberan esporas localmente en el suelo, estructuras de propagacion muy resistentes, que son

incorporadas por labores de cultivo y permanecen viables por varios años. Estas estructuras de resistencia iniciarán un nuevo ciclo patogénico cuando se plante una nueva planta de agave en el suelo en que están presentes. Por lo tanto, para tratar de reducir la presencia de esta enfermedad en la huerta madre, es necesario que se establezca en terrenos que no hayan tenido cultivo de agave afectado por la marchitez, al menos en los cuatro años anteriores ( Rendon *et al.*, 2011).

## **CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS.**

Este trabajo se realizo en el Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco, en el laboratorio de Sanidad Vegetal y en el invernadero de dicho tecnológico, ubicada en el municipio de Tlajomulco Jalisco.

### **4.1 Activación y preparación de inóculo de cepas.**

Las cepas de *Trichoderma* spp, T1, T4, C4, C13, C17, C30, C44, Bar321, Bar331 y Trich arándano que fueron la base para este trabajo de investigación, fueron activadas a partir del cepario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Esto se realizó cortando con una pinza, un fragmento pequeño de papel filtro (Figura 4), que es el método con el que se conservan las cepas de *Trichoderma* spp., en refrigeración. Se preparó medio de cultivo PDA de la marca SIGMA, pesándolo en una balanza analítica, para luego vaciarlo en un matraz Erlenmeyer y disolverlo con agua, se esterilizo en autoclave, se vació en cajas petri, una vez solidificado el medio, se sembró el fragmento, y se incubo a una temperatura de 27 °C, durante siete días, que después de crecido el micelio, se consideró el material biológico para los ensayos posteriores.



Figura 4. Fragmentos de papel filtro en el que se conservan las cepas de *Trichoderma*.

#### 4.1.1 Realización de cepario de trabajo de cepas de *Trichoderma* spp.

Esta actividad se llevó a cabo sembrando en medio de cultivo PDA, un fragmento de micelio, de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp., mencionadas anteriormente, agregando alrededor de este papel filtro esterilizado previamente en autoclave (Figura 5). Estas cajas se incubaron a 27 °C, durante una semana para lograr con su crecimiento la colonización del papel filtro, para después extraer el papel filtro colonizado por micelio, depositándolo en cajas de Petri vacías y guardarlo en refrigeración a 4 °C.



Figura 5. Fragmento de micelio de *Trichoderma* spp., sembrado en medio de cultivo PDA, con papel filtro alrededor.

## **4.2 Determinación del protocolo más idóneo para generar biomasa de *Trichoderma* en tubos tipo Falcón.**

### **4.2.1 Pruebas de antagonismo de *Trichoderma* spp Bar321 y Bar331 contra los fitopatógenos de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*.**

Para determinar el protocolo más idóneo, para generar biomasa de las cepas de *Trichoderma*, primero se tuvieron que realizar confrontaciones de las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331 con hongos fitopatógenos.

Para esto, se utilizaron cepas patogénicas de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, para ver si las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331, mantenían el mismo nivel de antagonismo sobre estos fitopatógenos de agave tequilero.

Para realizar las confrontaciones, se utilizaron cajas de medio PDA, en las que previamente se había medido el diámetro de la caja, señalando en la tapa inferior de esta, en su parte media, a una distancia de 1 cm de la orilla. Estos dos puntos se utilizaron como referencia para sembrar los hongos a confrontar, dejando un espacio de 6 cm entre ambos hongos, que crecerían hasta encontrarse en la parte media y a partir de ahí se antagonizaran.

Para realizar esta actividad, primero se colocaron en uno de los puntos marcados, círculos de agar colonizados con micelio, extraídos con un sacabocados previamente esterilizado a la flama y frío, de la periferia de colonias de los hongos fitopatógenos creciendo en medio PDA, debido a que su crecimiento es lento en comparación el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp; dándole una ventaja en tiempo de

cinco días, para sembrar posteriormente los círculos de agar con micelio de las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331, en el punto opuesto marcado en la caja.

Una vez sembrados los hongos en el medio PDA, se incubaron a una temperatura de 27 °C, evaluando las confrontaciones a los cinco días y a los diez días. Para evaluar el sobrecrecimiento de los hongos de *Trichoderma* spp., Bar321 y Bar331 se midió con una regla el diámetro de crecimiento de ambos hongos y se sacó la diferencia que había, tomando como medida base 6 cm de espacio entre un punto de siembra y otro.

Para realizar estas confrontaciones se compararon cuatro tratamientos y cinco repeticiones, considerándose cada confrontación como una repetición.

Los tratamientos fueron:

T1: Cepa Bar321 vs *F. oxysporum*.

T2: Cepa Bar321 vs *F. solani*.

T3: Cepa Bar331 vs *F. oxysporum*.

T4: Cepa Bar331 vs *F. solani*.

Para saber el nivel de antagonismo que ejercían las cepas de *Trichoderma* spp se calculó su sobrecrecimiento sobre la colonia del patógeno, realizando los siguientes cálculos.

$$\text{Sobrecrecimiento} = r \text{ colonia de Trichoderma} + r \text{ colonia del patógeno} - 6$$
$$\% \text{ de sobrecrecimiento} = \text{Sobrecrecimiento} \times 100 / r \text{ colonia del patógeno}$$

Después de que se realizaron los cálculos, se ubicó el nivel de antagonismo de cierta cepa contra un patógeno, utilizando las condiciones que se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Escala para la evaluación in vitro de la actividad antagonista de *Trichoderma* spp.

Nivel de antagonismo 1.	<i>Fusarium</i> sobrecrece a <i>Trichoderma</i> entre un 70 y un 100 %.
Nivel de antagonismo 2.	El patógeno sobrecrece a <i>Trichoderma</i> y <i>Trichoderma</i> sobrecrece al patógeno en más del 75 %, sin un daño aparente en ambos.
Nivel de antagonismo 3.	Patógeno y <i>Trichoderma</i> crecen 50 % deteniendo ambos su crecimiento.
Nivel de antagonismo 4.	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium</i> en menos de un 25 % y se detiene.
Nivel de antagonismo 5.	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium</i> de más del 75% con gran esporulación.

Fuente: Ávila *et al* (2006).

#### 4.2.2 Aislamiento de fitopatógenos.

Con el fin de obtener aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (FOL) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL), se obtuvieron muestras de plantas de invernadero, con síntomas de marchitez vascular de inducida por estos patógenos. Ya obtenidas las muestras, primeramente con una navaja se hicieron cortes pequeños en la parte necrosada de la planta, tanto de la corona como en el área del tallo. Los cortes se hicieron por separado para que no se revolvieran las muestras de tallo o corona, guardándose por separado y etiquetándose muy bien la muestra. Posteriormente se utilizó una solución 1-1- 8 (cloro-alcohol-agua v/v) para desinfectar los cortes, que una vez desinfectados, se sembraron en cajas con medio PDA, las

cajas se sellaron y se incubaron a una temperatura de 27 °C durante tres días (Agrios, 2005).

Todos los materiales utilizados en esta actividad se esterilizaron previamente en autoclave a una temperatura de 121 °C, durante 45 minutos.

En la Figura 6, se observan las muestras en donde se hicieron los cortes de la parte necrosada de la planta de tomate, tanto del interior del tallo y de la corona, así como los cortes desinfectados y sembrados en las cajas Petri con medio PDA.

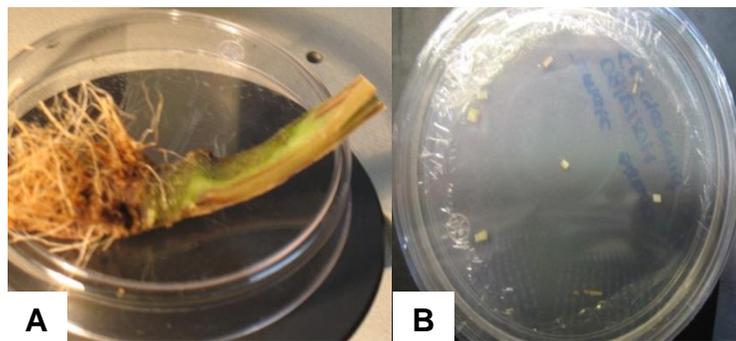


Figura 6. A) Muestras de tallo y corona de tomate de donde se obtuvieron los fragmentos de tejido. B) Siembra en cajas Petri con medio PDA de los fragmentos de tejidos obtenidos.

#### **4.2.2.1 Purificación de hongos obtenidos de las muestras de tomate.**

Después de haber mostrado crecimiento los hongos fitopatógenos y un aislado de hongo del género *Trichoderma* spp, obtenidas a partir de las muestras de tomate, con una aguja de disección se extrajo un fragmento de micelio para resembrarlo en medio de cultivo PDA y así poder crecerlo como colonia pura en forma individual. Estas cajas Petri se incubaron a una temperatura de 27 °C durante tres días. (Agrios, 2005).

#### **4.2.2.2 Ubicación taxonómica de los aislados por morfología.**

Con una aguja de disección previamente esterilizado a la flama y fría se extrajo micelio del hongo fitopatógeno a partir de la purificación, depositando una cantidad en un portaobjetos, previamente cubierto con azul de lactofenol, para poder teñir el hongo fitopatógeno, cubriéndolo con un cubreobjetos. Se enfocó al microscopio en un objetivo de 40X y se observaron las conidias y los conidióforos del hongo, para así poder corroborar que efectivamente las colonias formadas, eran de esos hongos del genero *Fusarium* que se tenía como objetivo para su aislamiento. (Agrios, 2005)

#### **4.2.2.3 Pruebas de antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.**

Para realizar confrontaciones con los fitopatógenos de tomate, se usaron seis cepas de *Trichoderma* spp., Bar321, Bar331, C4, T1, T4 y el aislado de *Trichoderma* sp, obtenido de las muestras de tomate al cual se le denominó TOM.

Se utilizaron cuatro repeticiones por cepa. Los tratamientos se describen a continuación, Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos con cepas de *Trichoderma* spp., confrontados para evaluación de la capacidad de antagonismo *invitro* de estas cepas contra los fitopatógenos de tomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.

T1. Cepa Bar321 vs <i>F.o.l</i>	T1'. Cepa Bar321 vs <i>F.o.r.l</i>
T2. Cepa Bar331 vs <i>F.o.l</i>	T2'. Cepa Bar331 vs <i>F.o.r.l</i>
T3. Cepa C4 vs <i>F.o.l</i>	T3'. Cepa C4 vs <i>F.o.r.l</i>
T4. Cepa T1 vs <i>F.o.l</i>	T4'. Cepa T1 vs <i>F.o.r.l</i>
T5. Cepa T4 vs <i>F.o.l</i>	T5'. Cepa T4 vs <i>F.o.r.l</i>
T6. Cepa TOM vs <i>F.O.L</i>	T6'. Cepa TOM vs <i>F.O.R.L</i>

Para la evaluación de estas confrontaciones, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, en las confrontaciones realizadas de las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331 contra los fitopatógenos de agave *F. oxysporum* y *F. solani*.

#### 4.2.3 Producción de conidias.

Una vez determinado el nivel de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* Bar321, Bar331, T1, y C4, considerando los resultados de la confrontación anterior se procedió a evaluar el procedimiento más eficiente de producción de conidias. Esto se llevó a cabo sembrando con una aguja de disección un pequeño fragmento de micelio de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp, en medio de cultivo PDA y se incubo a una temperatura de 27 °C, durante cinco días, esperando a que el micelio creciera.

Para obtener suficientes conidias, se utilizaron cinco cajas de PDA para cada cepa de *Trichoderma* spp. excepto la cepa C4, de la cual se utilizaron siete cajas con

medio PDA, esto debido a que se había observado que no producían suficientes conidias, además de que se incrementó el periodo de incubación a nueve días en esta cepa.

#### **4.2.4 Conteo de conidias.**

A cada caja de Petri con medio PDA donde se produjeron las conidias de las cepas de *Trichoderma* Bar321, Bar331, T1, C4, se le aplicaron 8 ml de agua destilada estéril, frotando el micelio con un triángulo de vidrio esterilizado a la flama y frío para remover las conidias.

En total se obtuvieron 40 ml de suspensión de conidias de *Trichoderma* spp, de cada una de las cepas. Esos 40 ml se vaciaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, aforándose a 100 ml con agua destilada estéril. De esta suspensión se extrajeron 1,000  $\mu$ l con una micropipeta de 1ml que se vaciaron a un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml. De este tubo, con una micropipeta de 100  $\mu$ l, se extrajeron dos alícuotas de 50  $\mu$ l de la suspensión, depositándolos en una cámara Neubauer, una en cada lado de la cámara, colocando posteriormente un cubre objetos sobre ellas (Tuite, 1969).

La cámara Neubauer se llevó a la platina del microscopio y se observó con el objetivo de 10X, esto para localizar primero las escalas de la cámara para el conteo, posterior a esto, se enfocó con el objetivo de 40X para proceder a contar conidias.

Para determinar la cantidad de conidias por ml, se usó la formula siguiente: (Tuite, 1969).

$$\text{No. de conidias por ml} = \text{Conteo total en la cámara} \times 50 \times 1000$$

La cámara de Neubauer tiene la apariencia de un portaobjetos grueso; en una cara tiene una placa muy delgada de metal grabada con dos cuadrículas muy finas de medidas definidas (Figura 7), y separadas una de otra por una ranura. El fondo de la cámara del campo central es usualmente 0,1 mm más bajo (= profundidad cámara) que ambos campos adyacentes. Entre campo central el cubreobjetos que se coloca sobre la misma existe por tanto una ranura de 0,1 mm. La limitación lateral del volumen a contar se establece mediante la cuadrícula de recuento. De esta manera, es posible conocer el volumen de muestra celular que se coloca en la cámara, y sólo es necesario contar el número de células presentes en ese volumen (Pietrasanta y Bilderling, 2011).

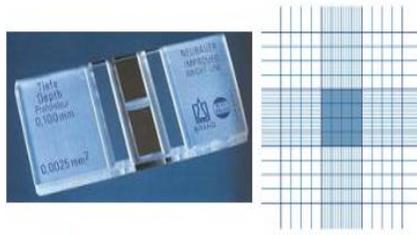


Figura 7. Cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de la cuadrícula utilizada para el recuento de células (derecha).

#### **4.2.5 Elaboración de medio sintético de *Trichoderma* spp., para producir clamidosporas variando la concentración de conidias.**

Para determinar la cantidad óptima de conidias inoculadas a medio líquido con el objetivo de producir clamidosporas, se preparó medio sintético para *Trichoderma*, (MST) (Elad *et al.*, 1982) en formulación líquida en matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad al que se agregaron los ingredientes listados en el cuadro 4, en la

proporción suficiente para aforar 250 ml con agua destilada. Los elementos traza se prepararon por separado, en un litro de agua, utilizando un matraz Erlenmeyer de 2 litros de capacidad, esto debido a la baja cantidad en peso que se agrega de estos ingredientes. Esta solución se esterilizo a 121 °C y una vez esterilizado el MST, se vaciaron 25 ml del medio a tubos tipo Falcón con capacidad de 45 ml, en total se utilizaron ocho tubos tipo Falcón. A los tubos tipos Falcón con MST se le agregaron tratamientos que diferían en el número de conidias por ml de inóculo considerando las cantidades especificadas en el cuadro 4., una vez formulados los tratamientos, los tubos tipo Falcón se colocaron inclinados sobre una base de poliuretano y se pusieron en un agitador orbital con temperatura controlada a 200 rpm y 27 °C. Cuantificando como variable de respuesta su porcentaje de germinación a las 24 y 48 horas. Para esta evaluación se utilizaron las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331.

Los tratamientos utilizados se describen a continuación en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos con cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331, para producir clamidosporas, variando la proporción de conidias.

T1. 250, 000 conidias.
T2. 2, 500,000 conidias.
T3. 25, 000, 000 conidias.
T4. 250, 000, 000 conidias.

Cuadro 4. Ingredientes para preparar Medio Sintético para *Trichoderma* en diferentes concentraciones.

<b>Ingredientes</b>	<b>100 ml</b>	<b>500 ml</b>	<b>1 L</b>	<b>2 L</b>
Dextrosa	1.5 g	7.5 g	15 g	30 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.002 g	0.01 g	0.02 g	0.04 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.06 g	0.3 g	0.6 g	1.2 g
KCL	0.015 g	0.075 g	0.15 g	0.30 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 g	0.5 g	1.0 g	2.0 g
<b>ELEMENTOS TRAZA</b>				
<b>ingredientes</b>	<b>1 L</b>	<b>500 ml</b>		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.005 g	0.0025 g		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.006 g	0.003 g	1 ml / 1 L de medio.	
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.004 g	0.002 g		
COCl <sub>2</sub>	0.002 g	0.001 g		

#### 4.2.5.1 Evaluación del número de clamidosporas.

Para determinar el número de clamidosporas producidas contabilizándolas por campo visual, se realizó un montaje, aplicando primeramente azul de lactofenol en un portaobjetos, se colocaron 50 µl del medio sintético previamente inoculado con conidias y que contenía el crecimiento micelial de *Trichoderma* spp, después de haberse incubado por 24 y 48 horas. Para cuantificar, se enfocó el microscopio compuesto en el objetivo de 40X, se ubicó un campo visual sobre una masa de micelio y se contabilizaron las clamidosporas que se alcanzaban a distinguir en ese campo, se contabilizaron tres campos ópticos de cada una de las cinco repeticiones de cada tratamiento, determinándose como variable respuesta, el número de clamidosporas por tratamiento.

#### **4.2.6 Preparación de MST con variación en la proporción de fuentes de carbono.**

Para la realización de este bioensayo, primeramente se licuó champiñón enlatado en salmuera, hasta que se obtuvieron partículas relativamente pequeñas. Se procedió a elaborar el MST siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado, con la diferencia que se preparó en cuatro matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, añadiendo 50 ml de MST, en cada matraz, variando la cantidad en peso de fuente de carbono, que consistía en concentraciones variables de dextrosa -champiñón, considerando cada tratamiento como el porcentaje del 10, 40, 70 y 100 % de dextrosa en peso, respecto una cantidad de 15 gr por litro de dextrosa recomendada en el medio MST. Ya preparados los medios de los distintos tratamientos, se procedió a esterilizarlos en autoclave a 121 °C por 20 minutos, una vez esterilizado el medio, se vació en tubos tipo Falcón aforándose a 25 ml e inoculando una cantidad de 250,000,000 de conidias. En total se utilizaron ocho tubos Falcón, dos tubos para cada variación de fuente de carbono, esto porque se utilizaron las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331, se determinó como variable respuesta el contenido de clamidosporas en los tratamientos, después de haberse agitado a 200 rpm, a una temperatura de 27 °C, durante 24 y 48 horas. La cantidad de conidias utilizada fue la que dio mejor resultado con respecto a la producción de clamidosporas en un bioensayo previo. Los tratamientos se describen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Distribución de tratamientos variando la proporción de fuentes de carbono, para producir clamidosporas, de cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331.

T1. 0.075 g de dextrosa + 0.675 g de champiñón + 250 000 000 de conidios.
T2. 0.3 g de dextrosa + 0.45 g de champiñón + 250 000 000 de conidios.
T3. 0.525 g de dextrosa + 0.225 g de champiñón + 250 000 000 de conidios.
T4. 0.75 g de dextrosa + 250 000 000 de conidios.

#### 4.2.6.1 Concentración de clamidosporas.

Para contabilizar el número de clamidosporas producidas en cada tratamiento, se contabilizaron las clamidosporas producidas por tratamiento utilizando el procedimiento mencionado anteriormente en el bioensayo de variación de concentración de conidias.

#### 4.2.7 Preparación de MST con máxima concentración dextrosa/champiñón.

Para la realización de este bioensayo se consideró la proporción dextrosa-champiñón que dio mejor resultado en el experimento previo, basándose de esa proporción, se calcularon incrementos proporcionales para determinar un máximo más adecuado para producir clamidosporas. Las proporciones ascendentes a evaluar dieron lugar a los siguientes tratamientos T1. 100 %, T2. 148.14 %, T3. 222.22 %, T4. 296.29 % con cantidades que se muestran en la tabla 6. Los medios de cultivo se formularon en cuatro matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, añadiendo 50 ml de MST en cada matraz, debido a que se utilizaron dos cepas de *Trichoderma* la Bar321 y Bar331, creciéndolas finalmente en 25 ml de MST en tubos tipo Falcón. Se aplicó la

cantidad de conidias que resulto más adecuada de acuerdo a resultados obtenidos en el mejor tratamiento para la producción de clamidosporas. Los tubos se agitaron a 200 rpm y se incubaron a 27 °C, evaluado a las 24 y 48 horas.

Una vez que se hicieron los cálculos de la variación de concentración de fuentes de carbono, tomando como referencia el experimento anterior, los porcentajes de fuentes de carbono quedaron como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Distribución de tratamientos con cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331, para producir clamidosporas, presentando máxima concentración de dextrosa/champiñón.

T1: 0.7424 g de champiñón + 0.33 g de dextrosa + 250 000 000 de conidias.
T2: 1.1 g de champiñón + 0.4884 g de dextrosa + 250 000 000 de conidias.
T3: 1.65 g de champiñón + 0.7315 g de dextrosa + 250 000 000 de conidias.
T4: 2.2 g de champiñón + 0.9735 g de dextrosa + 250 000 000 de conidias.

#### 4.2.7.1 Concentración de clamidosporas.

Para contabilizar el número de clamidosporas producidas por campo visual, se utilizaron el mismo procedimiento, mencionados anteriormente.

#### 4.3 Protocolo para incrementar la producción de conidias en medio líquido.

Conidias de *Trichoderma* de las cepas T1 y C4 utilizadas como inóculo para este bioensayo. El inóculo utilizado se produjo en cajas Petri con medio de cultivo PDA que fueron incubadas a 27 °C durante cinco días, después se sacaron de la

incubadora y se realizó el conteo utilizando una cámara de Neubauer, con el procedimiento mencionado anteriormente.

La producción de conidias, se evaluó utilizando tres medio de cultivo líquido, que para la preparación de uno de ellos se agregaron a 250 ml de agua destilada, 7.5 g de arroz en un vaso de precipitado y se calentó a 90 °C durante media hora en una plancha de calentamiento con agitador magnético. Para el segundo medio se realizó el mismo procedimiento pero usando como ingrediente melaza e igual para el tercer medio pero usando sacarosa, agregando en los tres medio estos ingredientes en una proporción 3 % p / v. de cada sustrato (Chávez, 2006). El medio que contenía arroz se coló para agregar al medio solo la infusión de arroz. Una vez realizado lo anterior, los 250 ml de cada medio que se hirvieron se vaciaron equitativamente en tres matraces Erlenmeyer de 500 ml, a estos matraces se le agregaron los ingredientes del MST en una proporción de 250 ml. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C 15 psi durante 20 minutos. Ya esterilizados los medios se dejaron reposar 20 minutos para que se enfriaran, una vez enfriados, en una cámara de flujo laminar se procedió a vaciar el medio líquido en tubos tipo Falcón, aforándolo a 25 ml, se usaron en total 12 tubos Falcón y una cepa de *Trichoderma* T1. Se utilizaron cuatro repeticiones. Los tratamientos quedaron como se muestra en el Cuadro 7

Cuadro 7. Tratamientos distribuidos para incrementar la producción de conidias de *Trichoderma* de la cepa T1, en tres diferentes medios de cultivo líquido.

T1. Cepa T1 + 25 ml caldo de arroz al 3% p/v + 80 000 000 de conidias.
T2. Cepa T1 + 25 ml de medio de melaza al 3 % p/v + 80 000 000 de conidias.
T3. Cepa T1 + 25 ml de medio de sacarosa al 3 % p/v + 80 000 000 de conidias.

#### **4.3.1 Producción de conidias de cepas de *Trichoderma* T1 y C4 en medio líquido en sustrato de melaza/levadura.**

Considerando resultados del bioensayo anterior se procedió a evaluar un cuarto medio de cultivo líquido, formulado. Utilizando como fuentes de carbono melaza y levadura mezcladas. El inóculo para estas pruebas se obtuvo de la misma manera antes mencionada, pero en esta ocasión se incrementó el número de cajas y los días de incubación para la cepa C4, debido a su lento crecimiento.

Para esta evaluación se usaron dos matraces con capacidad de 250 ml, donde se colocaron en un matraz 5 ml de solución de melaza al 5 % y 0.66 g de levadura esto se llevó a 9 ml de agua estéril esto para la cepa T1 y en el otro matraz, se colocaron 12 ml de solución de melaza al 5 % y 0.8 g de levadura esto se llevó a 24 ml, para la cepa C4. Para la preparación de este medio primero se preparó la mezcla de agua con melaza, que posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi, durante tres horas. Enseguida la mezcla se dejó reposar 24 horas, para después agregar la levadura y volver a esterilizarla bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El medio se dejó enfriar, para enseguida posteriormente inocular la

cantidad de conidias de *Trichoderma* de las cepas T1 y C4, correspondiente para cada medio.

La cantidad de conidias inoculados para la cepa T1 en el medio preparado de 9 ml fueron 40 ml de suspensión de conidios, equivalente a  $1.519 \times 10^9$  (1519, 000, 000) y para la cepa C4 en el medio de 24 ml fueron una suspensión de conidio de 56 ml equivalente a  $40.572 \times 10^8$  (4057, 200, 000). Con una suspensión por ml para la cepa de *Trichoderma* T1 de  $3.1 \times 10^7$  (31, 000, 000) y para la cepa C4 de  $50.715 \times 10^6$  (50, 715, 000).

#### **4.3.2 Fermentación líquida en biorreactor de las cepas de *Trichoderma*T1 y C4.**

Esta preparación de inóculo fue llevada a cabo en un reactor microbiológico Applicon®, modelo ADI 1030, con capacidad de 15 litros, con una agitación de 150 rpm, aireación y temperatura ambiente, con doce litros de MST adicionados con 480 gr de champiñón en salmuera, licuado durante 12 min.

A un matraz Erlenmeyer de 1 L de capacidad, se le añadieron 700 ml de agua esterilizada y 212.4 g de sacarosa, agitando la mezcla hasta que se disolvió la sacarosa, se agregaron los ingredientes del medio MST proporcionales a 12 L y se agito nuevamente. Esta mezcla se agregó al reactor y se aforo a 12 L con agua destilada. El reactor se cerró y las mangueras se sellaron perfectamente, para evitar que ingresara aire al medio de cultivo y evitar posteriores riesgos de contaminación, con el fin de eliminar la carga microbiana presente en el medio de cultivo ya preparado, se colocó a 90 °C dentro de un horno seco de la marca Memmer®,

modelo SN30 durante 24 horas. Completado este tiempo, se dejó enfriar durante otras 24 horas y enseguida se le agregó el inóculo de la cepa de *Trichoderma*.

Para la cepa T1 se agregaron  $15.85395 \times 10^9$  (15, 853, 950,000) millones de conidias en el reactor.

Para la cepa C4, se prepararon en 6 L de medio conteniendo proporcionalmente los ingredientes MST, y las fuentes de carbono champiñón / sacarosa, agregando a este  $8.722 \times 10^9$  (8, 722, 000, 000) millones de conidias.

#### **4.3.3 Producción de clamidosporas de las cepas T1 y C4, en pruebas pequeñas, en tubos Falcón.**

Para determinar la influencia de temperatura constante a 27 °C y la sacarosa como fuente de carbono en la producción de clamidosporas de las cepas T1 y C4 de *Trichoderma* se realizaron bioensayos en tubos tipo Falcón con 25 ml y 250, 000, 000 de conidias, utilizando dos tipos de dextrosa, solidificada y en polvo, los tratamientos se presenta en el cuadro 8. Los tubos se incubaron en cuatro repeticiones en un agitador orbital refrigerado, con temperatura controlada, a 28 °C y 150 rpm durante 24 horas, transcurrido este tiempo se extrajeron cuatro alícuotas de 50 µl de cada repetición.

Cuadro 8. Tratamientos distribuidos de las cepas de *Trichoderma* T1 y C4 para determinar la influencia de la temperatura constante a 28 °C y la sacarosa como fuente de carbono.

T1: 250 000 000 de conidias cepa T1 + 2 gr champiñón + 0.885 gr de sacarosa.
T2: 250 000 000 de conidias cepa T1 + 2 gr champiñón + 0.885 gr de dextrosa polvo.
T3: 250 000 000 de conidias cepa T1+ 2 gr de champiñón + 0.885 gr de dextrosa solidificada.
T1': 250 000 000 de conidias cepa C4 + 2 gr de champiñón + 0.885 gr sacarosa.
T2': 250 000 000 de conidias cepa C4 + 2 gr de champiñón + 0.885 gr de dextrosa polvo.
T3': 250 000 000 de conidias cepa C4 + 2 gr de champiñón + 0.885 gr de dextrosa solidificada.

#### **4.4 Antagonismo de las cepas T1 y C4 de *Trichoderma* sobre infecciones de las especies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* en plantas de tomate.**

Las plantas de tomate utilizadas fueron para producción de invernadero.

Las cepas de *Trichoderma* T1 y C4, producidas en medio líquido MST con melaza-champiñón como fuente de carbono con las condiciones de incubación mencionada anteriormente. O bien estas mismas cepas se produjeron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA que se separaron y cuantificaron como fue mencionado anteriormente.

Una vez que se determinó la concentración de conidias de las cepas T1 y C4 de *Trichoderma*, por ml obtenidos se calculó el inóculo a aplicar las plantas de tomate, tomando como base  $1 \times 10^6$  conidias por ml, para ambas cepas. En el caso de los fitopatógenos del genero *Fusarium* se utilizaron como inóculo base  $4 \times 10^5$  conidias por ml para FOL y FORL.

La inoculación se realizó mezclando las dos cepas de *Trichoderma* T1 y C4 en una concentración de  $5 \times 10^5$  por ml de cada una completando un volumen de 315 ml que se vaciaron a vasos de plástico con capacidad de 1 L. Se utilizaron tres vasos de plástico desechable, vaciando por separado la mezcla de las cepas, crecidos en cajas Petri con medio PDA y la que se crecieron en medio líquido y en el tercer vaso se vació agua destilada estéril, para ser utilizada en los tratamientos testigo. Las plantas, para inocularse, se sumergieron durante 10 segundos en cualquiera de las suspensiones de conidias o en agua destilada estéril según el tratamiento, para posteriormente ser trasplantadas en macetas con sustrato estéril. La descripción de los tratamientos en detalle se muestra en el Cuadro 9.

Para la inoculación de los fitopatógenos de las especies FOL y FORL se utilizaron 100 ml de medio como inóculo, para cada fitopatógeno. Para FOL se diluyó una suspensión de conidias de 0.816 ml en 100 ml de agua destilada estéril y para la especie FORL se diluyeron 0.496 ml de la suspensión de conidia en la misma cantidad de agua esterilizada. Estas suspensiones de inóculo se vaciaron en un atomizador, utilizando uno para cada fitopatógeno. Para inocular una cantidad similar en cada plántula, primeramente se cuantifico la cantidad de líquido que los

atomizadores expulsaban al presionarles tres veces la palanca, con una aplicación en aspersión, considerando este volumen de aplicación se calculó que en ese volumen se aplicó, en el caso de FOL se aplicó  $1 \times 10^5$  de conidias y para FORL se aplicó  $9.2 \times 10^4$  de conidias se le inóculo a cada maceta. Para inocular los fitopatógenos se agregó sustrato a la mitad de las macetas, y se emparejo la superficie de este, enseguida se presionó tres veces el atomizador, remojando superficialmente el sustrato y posteriormente, se agregó otra pequeña cantidad de sustrato para que se cubriera el inóculo aplicado, para sobre este trasplantar las plantas de tomate, ya inoculadas previamente con las cepas de *Trichoderma*, una vez concluidas las inoculaciones se procedió a cubrir con bolsas de plástico la superior de las macetas, de tal manera que se evitara que en el momento del riego el agua escurriera a través del sustrato solo cercana a la pared de la maceta, para reducir el acarreo de las conidias de *Trichoderma* a las partes inferiores de la maceta, considerando que se deseaba evaluar la capacidad de colonización de las cepas de *Trichoderma* sobre la raíz nueva de las plantas de tomate y que si el agua escurría a través de la raíz, arrastraría el hongo hacia las raíces nuevas de las plantas de tomate. También se consideró evaluar el porcentaje de colonización de los fitopatógenos en la raíz de la planta.

Cuadro 9. Distribución de los tratamientos para el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* sobre las infecciones de las especies de *Fusarium* en plantas de tomate.

T1. Control.
T2. <i>Trichoderma</i> C4 + T1 conidias medio PDA.
T3. <i>Trichoderma</i> C4 + T1 conidias medio líquido.
T4. <i>Trichoderma</i> C4 + T1 conidias medio líquido + <i>F.o.l</i>
T5. <i>Trichoderma</i> C4 + T1 conidias medio líquido + <i>F.o.r.l</i>
T6. <i>F.o.l</i>
T7. <i>F.o.r.l</i>

#### 4.4.1 Aislamiento de las cepas T1 y C4 y de los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* de las plantas de tomate.

Después de cumplir los días después de la inoculación se tomaron muestras de las raíces terminales de las plantas de tomate de los diferentes tratamientos inoculados con *Trichoderma*, se tomaron muestras de los tallos altos y bajos de las inoculadas con *F.o.l* y *F.o.r.l*, haciendo cortes tanto del tallo como de la raíz. Los cortes de raíz y tallo se desinfectaron en la solución 1-1-8 (alcohol, cloro, agua) y se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo PDA, incubándolos a una temperatura de 27 °C, durante cinco días. Posterior a eso se realizaron montajes con azul de lactofenol de los diferentes tratamientos, se observó el crecimiento de *Trichoderma*, y de los fitopatógenos y se midió el porcentaje de su colonización sobre las raíces de las plantas, así como el porcentaje de tallos dañados por los fitopatógenos.

#### **4.5 Análisis estadístico.**

Todos los tratamientos utilizados se compararon estadísticamente utilizando el programa SAS ver 8.0. Utilizando el proceso GLM con un diseño completamente al azar con diferente número de repeticiones por tratamiento. (Rebolledo, 2000).

## CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 Activación de cepas de *Trichoderma* spp.

Las cepas activadas de *Trichoderma* spp, mostraron crecimiento rápido en medio PDA, indicando de esta manera que si estaban viables después de un tiempo en el cepario. En el caso de las cepas de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, fueron entregadas ya activas por el laboratorio de fitopatología.

En la Figura 8 se observan las cepas de *Trichoderma* Bar321, Bar331, C4 y T1 activadas en medio de cultivo PDA, después de haber sido incubadas a una temperatura de 27 °C, durante cinco días, también se muestran las colonias de las cepas de *F. solani* y *F. oxysporum*.

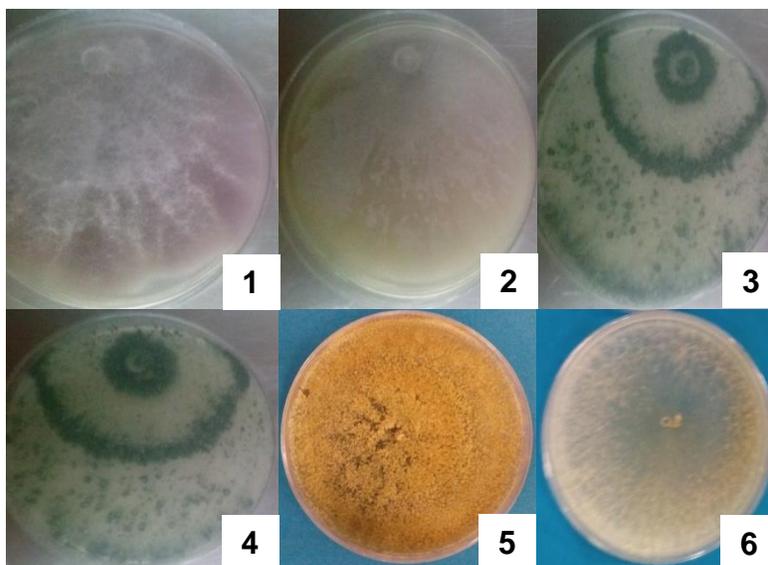


Figura 8. Cepas activadas para conformar un cepario de trabajo. 1- Ceba "Q" de *Fusarium solani*, 2- Ceba "O" de *Fusarium oxysporum*, 3- Ceba de *Trichoderma* Bar331, 4- Ceba de *Trichoderma* Bar321, 5-Ceba T1 de *Trichoderma*, 6- Ceba C4 de *Trichoderma*.

## 5.2 Realización de ceparios de cepas de *Trichoderma* y de fitopatógenos de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*.

Muestra de los ceparios obtenidos, después de que el micelio de las cepas activadas había colonizado los fragmentos estériles de papel filtro que se colocaron en cajas Petri estériles y secas, sellándolo con cinta Cleanpack, para guardarse posteriormente en refrigeración a una temperatura de 4 °C., como se muestra en la Figura 9.

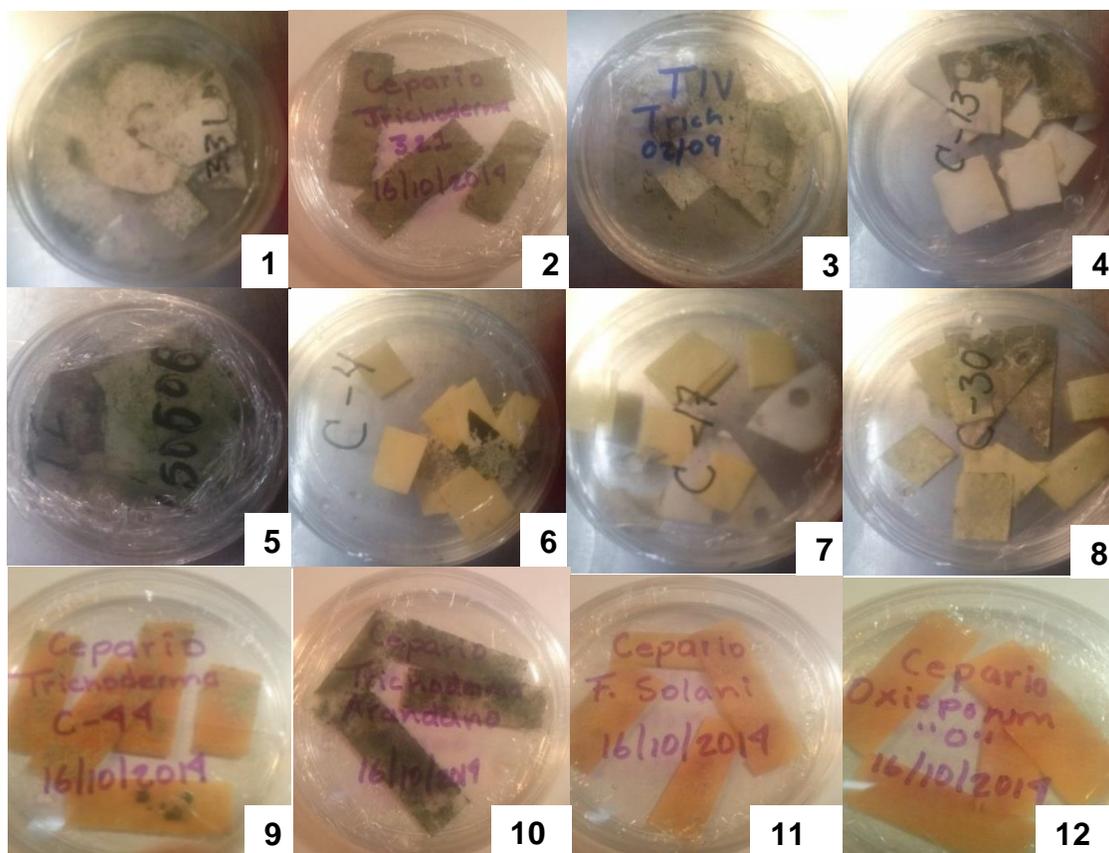


Figura 9. Ceparios de *Trichoderma* spp., 1. Bar331, 2. Bar321 3. T4, 4. T1, 5. C4, 6. C13, 7. C17, 8. C30, 9. C44, 10. *Trich-arándano*, y cepas de 11. *Fusarium solani*, 12. *Fusarium oxysporum*.

### 5.3 Pruebas de antagonismo de cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331 contra los fitopatógenos de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*.

Las confrontaciones que se realizaron para evaluar el nivel de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331 contra fitopatógenos de agave de las especies *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, mostraron un sobrecrecimiento de las cepas antagonistas sobre ese patógeno, como se muestra en la Figura 10.

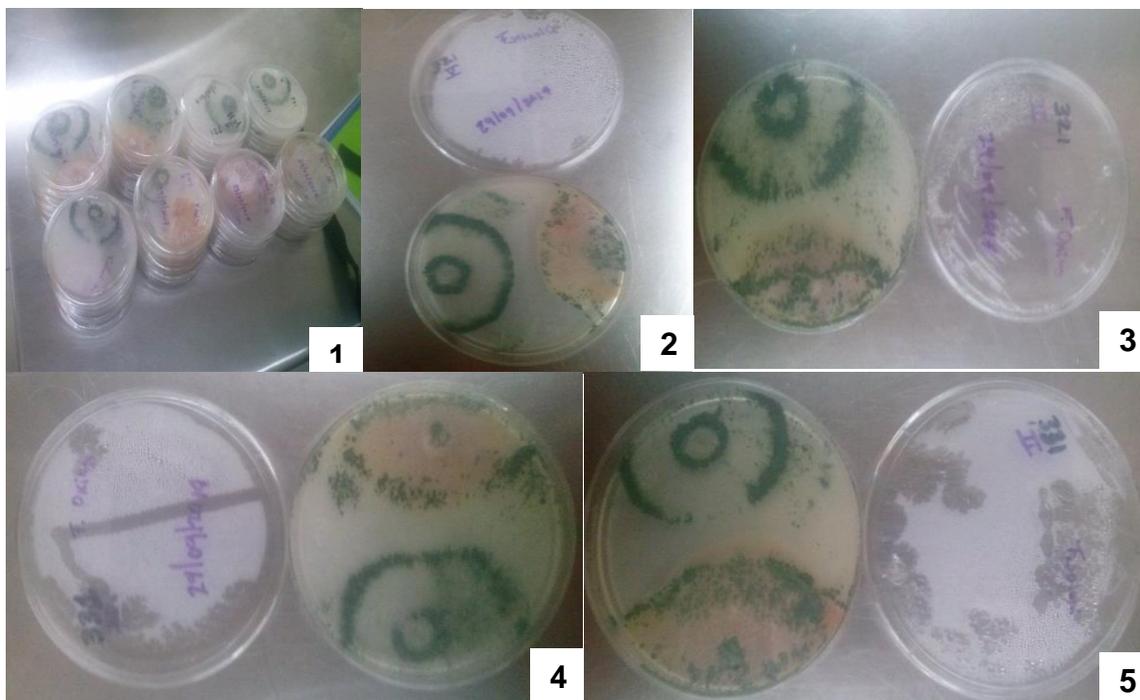


Figura 10. Confrontaciones de las cepas de *Trichoderma* spp., Bar321 y Bar331 contra cepas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*: .1.- Cepas confrontadas. 2.- Bar321 vs *F. solani*. 3. - Bar321 vs *F.oxysporum*. 4. - Bar331 vs *F. oxysporum*. 5. - Bar331 vs *F. solani*.

### 5.3.1 Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp sobre los fitopatógenos de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*.

En el análisis estadístico de las pruebas de confrontación para evaluar el nivel de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp, contra fitopatógenos de *Fusarium* no hubo diferencias significativas entre las cepas evaluadas, ni en la primera a los cinco ni en la segunda evaluación a los diez días (Cuadro 10 y 11). Esto indica de que las cepas de *Trichoderma* spp, mantiene el mismo grado de agresividad contra esos fitopatógenos de agave.

Cuadro 10. Nivel de antagonismo de las cepas de *Trichoderma*. Bar321 y Bar331 en confrontaciones *in vitro* contra las cepas de *F. oxysporum* y *F. solani* después de cinco días de iniciado el estudio.

Agrupación de Duncan.	Medias.	Repeticiones.	Tratamiento.
A	4.000	5	Bar321 vs <i>F. o</i>
A	4.000	5	Bar321 vs <i>F. s</i>
A	4.000	5	Bar331 vs <i>F. o</i>
A	4.000	5	Bar331 vs <i>F. s</i>

Cuadro 11. Análisis estadístico de confrontaciones *in vitro* después de diez días, entre las cepas de *Trichoderma* spp. Br321 y Br331 contra las cepas de *F. oxysporum* y *F. solani*.

Agrupación de Duncan.	Medias.	Repeticiones.	Tratamiento.
A	4.8000	5	Bar321 vs <i>F.o</i>
A	4.8000	5	Bar331 vs <i>F. s</i>
A	4.6000	5	Bar331 vs <i>F. o</i>
A	4.2000	5	Bar321 vs <i>F. s</i>

### 5.3.2 Aislamiento de patógenos de de las especies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *F. oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici* de aislados de muestras de tomate.

Las muestras de tomate sembrados en el medio PDA presentaron abundante crecimiento de hongos, estos aislamientos presentaron diferentes morfologías, entre ellos los hongos fitopatógenos mencionado anteriormente y otras pertenecían a *Trichoderma* que creció muy frecuentemente en las siembras de los dos tipos de muestra de tomate para aislar *Fusarium*, ya que este tipo de hongos se aplican como insumo en la empresa que proporcionó las muestras. A partir de ello se

procedió a la recuperación de las cepas que por sus características macroscópicas y microscópicas perteneciera al género de interés.

De esta manera y con los pasos sucesivos se logró la purificación de una cepa de *Trichoderma*, y fitopatógenos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *F. oxysporum* f. sp. *Radiciis lycopersici* (Figura 11).

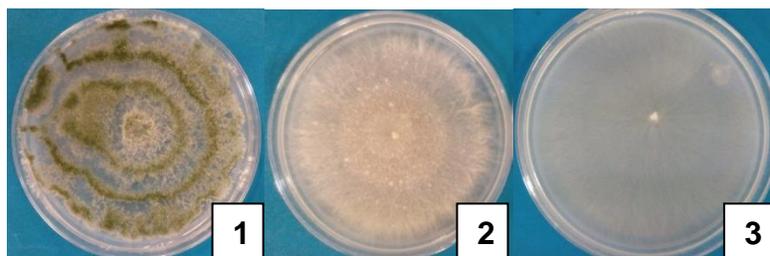


Figura 11. Cepas purificadas de fitopatógenos y *Trichoderma*. 1.- Cepa de *Trichoderma* TOM. 2.- Cepa de la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. 3.- cepa de la especie *F. oxysporum* f. sp. *Radiciis lycopersici*.

### **5.3.3 Análisis estadístico de pruebas de antagonismo de cepas de *Trichoderma* T1, T4, C4, Bar321, Bar331 y TOM contra el fitopatógeno de la especie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**

Cuando se analizó el desempeño antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* a los cinco días de iniciada la confrontación, las cepas Bar321, Bar331 y C4, mostraron un nivel de sobrecrecimiento 4 en la escala de antagonismo y las cepas T1 y T4 mostraron un nivel de sobrecrecimiento 3.75, sin una diferencia estadística entre estos dos grupos de cepas. Sin embargo, fue la cepa TOM, la que evidenció un nivel de antagonismo estadísticamente inferior, con una media de 3.0, lo que implica que inhibe con

antibióticos el crecimiento del patógeno, pero que a la vez su crecimiento es inhibido por esta cepa del patógeno. (Cuadro 12). En la evaluación realizada a los diez días de haberse iniciado la confrontación, la capacidad de antagonismo de las diversas cepas de *Trichoderma* antagonizando a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* indica que la cepa C4 fue estadísticamente más eficiente que la cepa TOM. El resto de las cepas tienen un nivel de antagonismo considerado estadísticamente igual. Cuadro 13.

Cuadro 12. Análisis estadístico de Antagonismo in vitro de diversas cepas de *Trichoderma* spp. Evaluadas a los cinco días de haberse iniciada la confrontación contra el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Agrupación de Duncan.	Media	Repeticiones	Tratamiento
A	4.0000	4	CEPA Bar321.
A	4.0000	4	CEPA Bar331.
A	4.0000	4	CEPA C4.
A	3.7500	4	CEPA T1.
A	3.7500	4	CEPA T4.
B	3.0000	4	CEPA TOM.

Cuadro 13. Antagonismo in vitro de diversas cepas de *Trichoderma* evaluado a los diez días de haberse iniciado la confrontación contra fitopatógeno de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

Agrupación de Duncan.	Medias	Repeticiones.	Tratamiento.
A	4.50	4	CEPA C4.
A B	4.00	4	CEPA Bar331.
A B	4.00	4	CEPA Bar321.
A B	4.00	4	CEPA T1.
A B	4.00	4	CEPA T4.
B	3.75	4	CEPA TOM.

### 5.3.4 Antagonismo de las cepas de *Trichoderma* T1, T4, C4, Bar321, Bar331 y TOM contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis - lycopersici*.

La comparación del antagonismo de las distintas cepas contra *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* indica que todas las cepas sobrecrecen a la colonia del patógeno, pero la cepa T1 con un promedio de 4.5 supera estadísticamente a las cepas Bar331 y TOM que evidenciaron niveles de antagonismo de solo 3.5 (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis estadístico de cepas de *Trichoderma* evaluado a los cinco días de haberse iniciado, la confrontación contra fitopatógeno de *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Agrupación de Duncan.	Medias.	Repeticiones.	Tratamiento.
A	4.5000	4	CEPA T1.
A B	4.2500	4	CEPA T4.
A B	4.0000	4	CEPA C4.
A B	3.7500	4	CEPA Bar321.
B	3.5000	4	CEPA Bar331.
B	3.5000	4	CEPA TOM.

En la figura 12 se muestra las pruebas de antagonismo realizadas en cajas Petri con medio de cultivo PDA, con cepas de *Trichoderma* spp., del laboratorio de sanidad vegetal contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la cual en esta prueba de antagonismo la cepa C4 fue más eficiente que las demás cepas, evaluado a los diez días. En la segunda prueba de antagonismo evaluadas con las mismas cepas de *Trichoderma* spp., contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, la cepa que tuvo mayor nivel de sobrecrecimiento fue la T1.

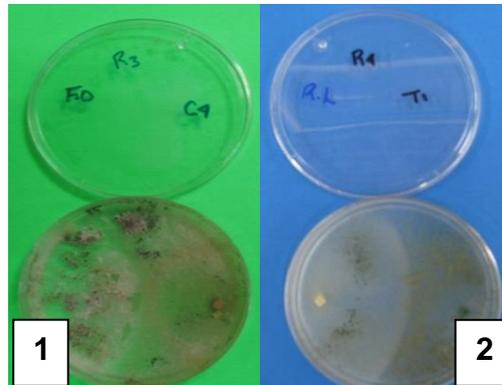
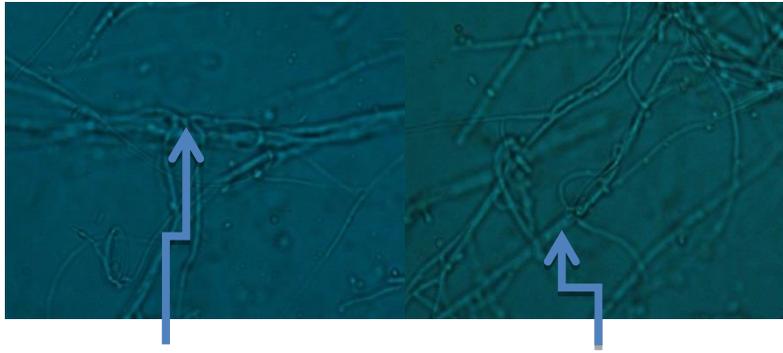


Figura 12. 1.- Cepa de *Trichoderma* C4 con mayor nivel de sobrecrecimiento sobre la cepa patogénica de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. 2.- Cepa de *Trichoderma* T1, con mayor nivel de sobrecrecimiento sobre la cepa patogénica de *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici*.

Para analizar detalladamente los eventos de micoparasitismo de las cepa de *Trichoderma* sobre los fitopatógenos. Se realizaron montajes utilizando el colorante azul de algodón - lactofenol, observando al microscopio compuesto como las hifas de las cepas del antagonista del género *Trichoderma* spp, iban enrollándose y parasitando las hifas de los hongos fitopatógenos, (Figura 13).



Enrollamiento de *Trichoderma* spp., sobre el fitopatógeno de *Fusarium*.

Hifas de *Fusarium*.

Figura 13. Enrollamiento de las hifas del hongo *Trichoderma* sobre las hifas de hongos fitopatógenos de agave del genero *Fusarium*, que es evidencia de eventos de micoparasitismo de una cepa sobre la otra.

En estudios realizados en pruebas de antagonismo de *Trichoderma* spp, contra fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en especies del genero *Allium*, se obtuvieron resultados similares, determinándose un porcentaje de colonización e inhibición al patógeno de un 25 a un 55 %, dependiendo de la cepa que se utilizó, (Ávila *et al.*, 2006). Estos resultados nos indica que especies del genero *Trichoderma* spp, pueden inhibir y colonizar diferentes especies de fitopatógenos, dependiendo las especies de *Trichoderma*, ya que no todas las especies inhiben y colonizan a un determinado patógeno de la misma forma, como se demostró en estas pruebas de antagonismo con los diferente patógenos confrontados.

#### 5.4 Producción de conidias de las cepas de *Trichoderma* Bar321, Bar331, T1 y C4.

Después de seis días de incubación a 27 °C de cajas Petri con PDA sembradas con las cepas de *Trichoderma* Bar321, Bar331, T1 y C4, se observó un crecimiento abundante concéntrico de micelio con un cubrimiento total de la colonia sobre la superficie del medio de cultivo y alta esporulación (Figura 14).

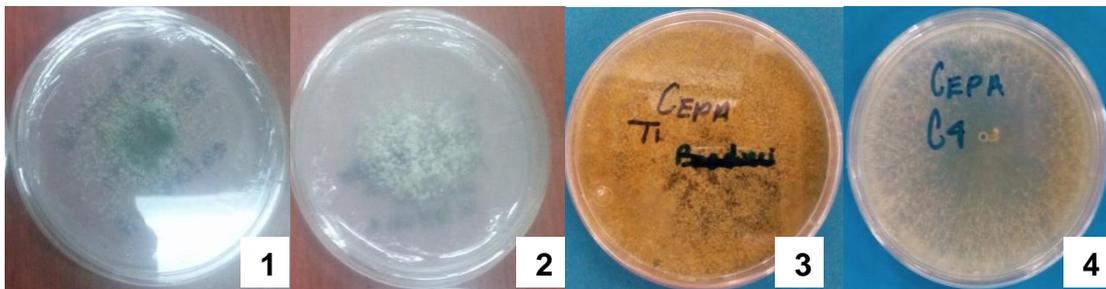


Figura 14. Producción de conidias de las cepas 1.- Bar321, 2.- Bar331, 3.- T1 y 4.- C4 de *Trichoderma* en cajas de Petri con el fin de obtener el inóculo de estas cepas.

##### 5.4.1 Cuento de conidias de las cepas de *Trichoderma* Bar321, Bar331, T1 y C4.

La cepa de *Trichoderma* Bar321 produjo un promedio de  $81.7 \times 10^6$  conidias por ml de suspensión, generándose 40 ml de suspensión con un total de  $3.268 \times 10^9$  de conidias.

En la cepa de *Trichoderma* Bar331, se contabilizaron un total de  $77.65 \times 10^5$  conidias por ml, obteniendo 40 ml de suspensión con un total de  $3.106 \times 10^9$  conidias.

Para la cepa T1 se obtuvieron un total de  $45.750 \times 10^6$  conidias por ml, esta cepa se diluyó dos veces, ya que no se podía hacer el conteo debido a que estaba bien concentrado, por la cual se multiplico por 2 y se obtuvo un total de  $91.500 \times 10^6$  conidias por ml, con 40 ml de suspensión de conidias, dio una producción final de  $3.477 \times 10^9$  conidias.

La cepa C4 produjo una cantidad de  $72.450 \times 10^6$  conidias por ml, obteniendo 56 ml de suspensión, con una producción acumulada de  $4.0572 \times 10^9$  conidias.

En la figura 15 se observa la conidias ya enfocada al microscopio, sobrepuesto en la cámara Neubauer, procedimiento utilizado para estimar su concentración en las suspensiones utilizadas como inóculo en los bioensayos.

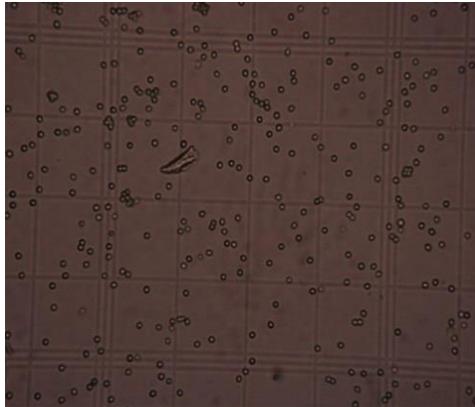


Figura 15. Conidias de cepas de *Trichoderma* enfocada al microscopio con un objetivo de 40 X.

### **5.5 Cantidad de clamidosporas producidas con variación de conidias.**

Al evaluar la producción de clamidosporas en medio líquido, variando el número de conidias inoculados en 25 ml de medio, a las 24 horas, la comparación indicó que el

tratamiento 4 con un inóculo de 250, 000,000 de conidias fue el mejor en producir clamidosporas, para las cepas Bar321 y Bar331, con poco más de 500 clamidosporas por campo óptico en el microscopio (Figura 16).

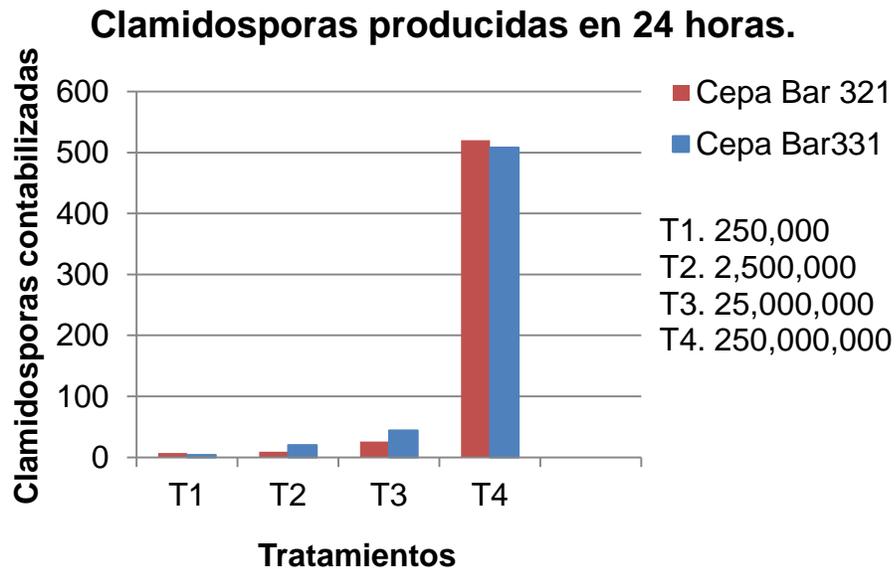


Figura 16. Cantidad de clamidosporas contabilizadas por campo óptico en medios líquidos, inoculados con las cepas Bar321 y Bar331 de *Trichoderma* spp, después de 24 horas de incubación.

La cantidad de clamidosporas producidas a las 48 horas después de haber sido inoculado el medio, indica que el mejor tratamiento para las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331, continuó siendo el tratamiento 4 con 250, 000,000 de inóculo de conidias (Figura 17).

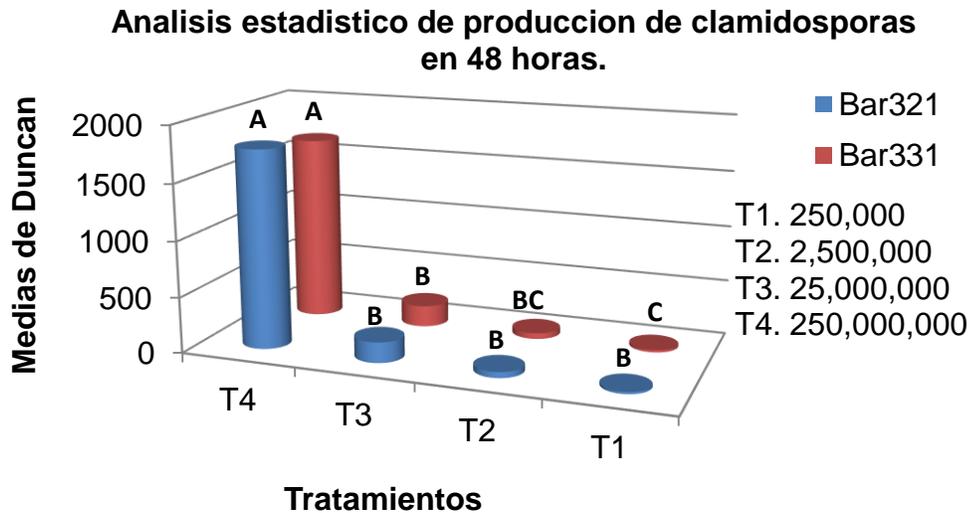


Figura 17. Número de clamidosporas contabilizadas por campo óptico, producidas por las cepas Bar321 y Bar331.

### 5.6 Cantidad de clamidosporas producidas con variación en la proporción de fuentes de carbono.

Cuando se varió la proporción de dextrosa y champiñón como fuentes de carbono, tomando como base 20 g de fuente de carbono por litro, con el fin de definir su influencia en la formación de clamidosporas por las cepas Bar321 y Bar331 el tratamiento 3, que contenía 30 % champiñón y 70 % de dextrosa, fue el que influenció la tendencia a producir más, estos resultados fueron obtenidos en una prueba preliminar de 24 horas, cuyos resultados se muestran en la Figura 18.

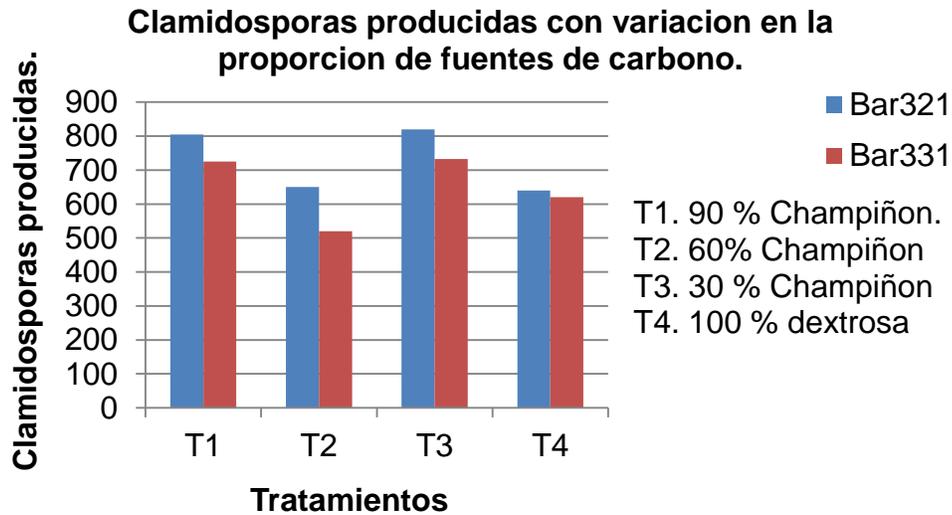


Figura 18. Clamidosporas por campo óptico contabilizadas después de 24 horas de incubación de las cepas de *Trichoderma*, Bar321 y Bar331, con variación en el % de dextrosa, respecto a un 100 % de fuente de carbono complementado con champiñón (p/p).

Se obtuvieron diferencias significativas en la producción de clamidosporas, cuando el bioensayo se incubó durante 48 horas. En esta evaluación resultó mejor el tratamiento T3, en el que las conidias fueron crecidas en 30 % de champiñón / 70 % dextrosa, así como el tratamiento T1, que consistía en 90% de champiñón complementado con 10 % dextrosa, este resultado fue similar para las dos cepas Bar321 y Bar331, como se presenta en la Figura 19. En esta figura se observa las diferencias significativas que existen entre ambos tratamientos.

### Analisis estadístico de producción de clamidosporas en 48 horas.

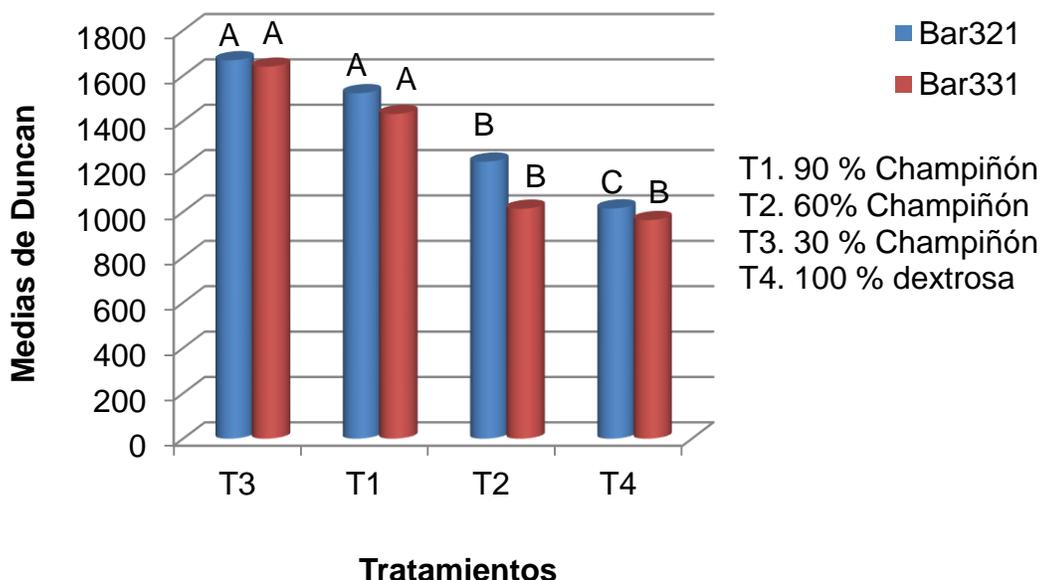


Figura 19. Promedio de clamidosporas contabilizadas por campo óptico en tratamientos con proporciones variables de fuente de carbono dextrosa-champiñón.

#### 5.7 Cantidad de clamidosporas producidas bajo condiciones variables en la concentración de dextrosa – champiñón como fuente de carbono.

La cantidad de clamidosporas producidas de las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar3331 bajo las condiciones variables en la concentración de dextrosa– champiñón, evaluados a las 24 horas de incubación como prueba preliminar, se muestra en la Figura 20, donde destaca el tratamiento 4, que con 40 gr de champiñón y 17.7 gr de dextrosa por litro de medio, produjo una cantidad superior de clamidosporas con un promedio de 1780 clamidosporas por tres campos óptico contabilizados esto para la cepa Bar321 y para la cepa Bar331 un promedio de 1598 clamidosporas.

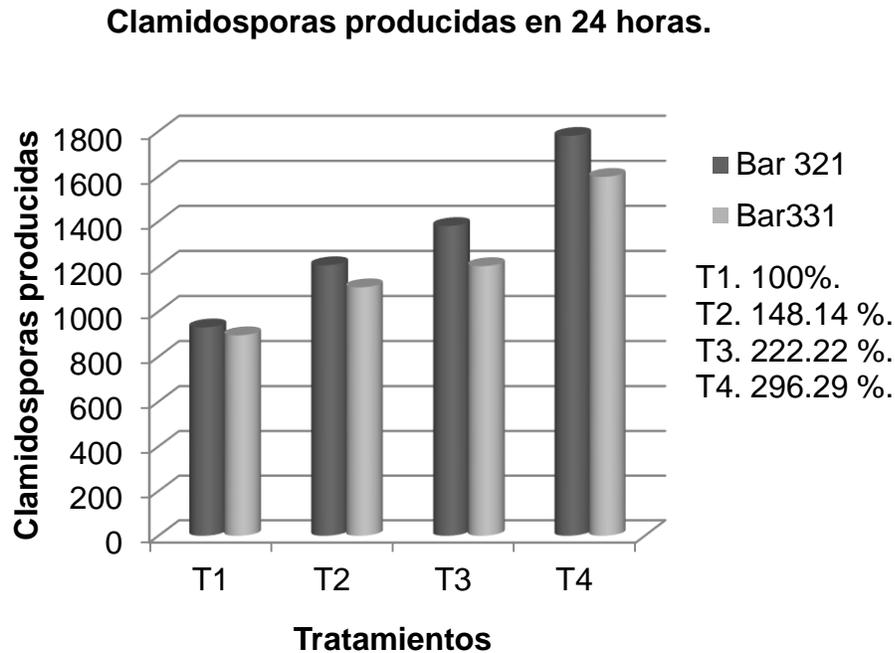


Figura 20. Clamidosporas producidas, bajo condiciones variables en la concentración de dextrosa – champiñón.

Al analizar la producción de clamidosporas por la cepa de *Trichoderma* Bar321, hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos, siendo los mejores aquellos en los que se concentró en mayormente cantidad las fuentes de carbono integradas en el medio (dextrosa/champiñón) que fueron los tratamientos 3 y 4 con 30 y 40 gr por litro de champiñón así como 13.3 y 17.7 gr por litro de dextrosa.

Para la cepa de *Trichoderma* Br331, todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente, respecto del número de clamidosporas producidas, presentando mejores resultados el tratamiento 4, esto nos indica que entre mayor concentración champiñón/dextrosa, mayor fue la producción de clamidosporas. Figura 21.

**Número de clamidosporas producidas en 48 horas, bajo condiciones variables en la concentración dextrosa-champiñón.**

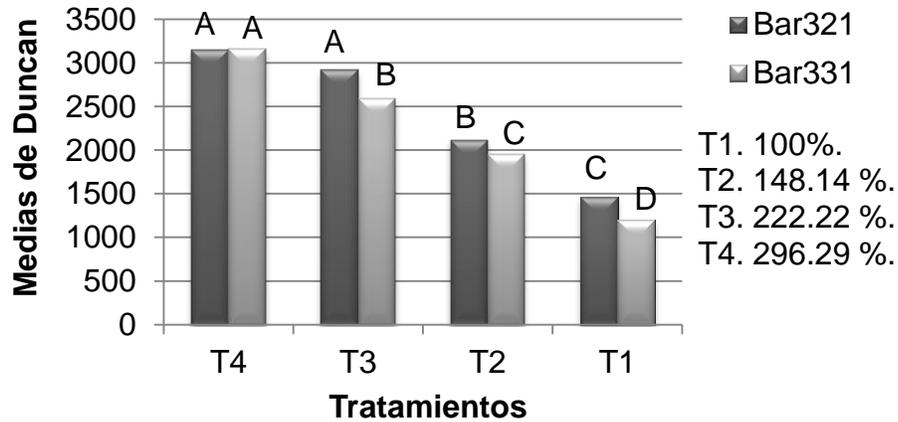


Figura 21. Número de clamidosporas por campo óptico producidas en 48 horas, por las cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331 bajo condiciones variables en la concentración de dextrosa – champiñón.

En la Figura 22 se muestra las clamidosporas producidas en medio líquido con la mezcla dextrosa- champiñón, observadas en microscopio compuesto en un objetivo de 40 X.

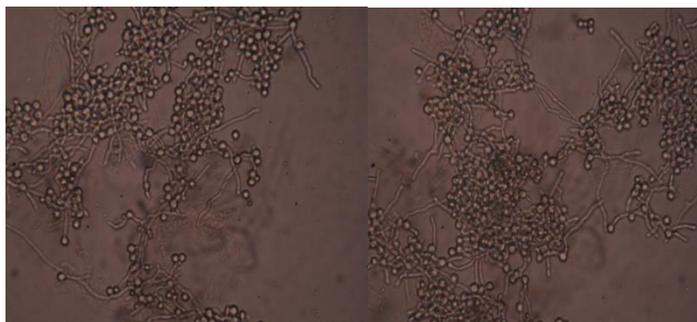


Figura 22. Apariencia de las clamidosporas formadas sobre el tejido de champiñón y el micelio de las cepas de *Trichoderma*.

El lograr mejorar la inducción de la producción de clamidosporas en las cepas de *Trichoderma* es una gran ventaja considerando que Caldwell (1958) observó que las clamidosporas sobreviven mejor en el suelo que las conidias. Por su parte esta ventaja incrementa el potencial de varias especies de *Trichoderma*, de acuerdo a Lewis y Papavizas (1984) quienes demostraron el potencial de varias especies de *Trichoderma* en formar rápidamente un gran número de clamidosporas en suelo o en fragmentos de materia orgánica después de agregar el hongo al suelo. Incrementaron el potencial de 29 introducidos al mejorar su agresividad para establecerse y colonizar la materia orgánica en ambientes naturales.

Aunado a lo anterior, Stefanova *et al.*, (1999) menciona que la mayoría de las especies de *Trichoderma* pueden producir clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales, esta característica le permite a las cepas tolerar condiciones ambientales adversas ya que actúan como estructuras de sobrevivencia y le permiten al hongo perdurar a través del tiempo.

Considerando que cepas de *Trichoderma*, tiene una gran agresividad contra diversos hongos cultivados, principalmente el champiñón (Domsh *et al.*, 1993; Rossman, 1996), colonizándolo para su formación de micelio y conidias, esta puede ser la razón que al utilizarlo como fuente de carbono combinado dextrosa, incrementa la producción de clamidosporas.

Este trabajo de investigación viene a dar continuidad a otros previamente realizados en el laboratorio de sanidad vegetal, que si bien ya se había determinado la producción de conidias en medio líquido, con medios que contenía dextrosa-

champiñón como fuentes de carbono combinado con los ingredientes de MST, se requería conocer más a fondo los factores que pudieran influir en aumentar su cantidad de producción en medio líquido.

### **5.8 Incremento en la producción de conidias por las cepas de *Trichoderma* T1 y C4 en medio líquido.**

La cantidad de conidias inoculadas en el medio líquido de la cepa C4 fueron  $5.2 \times 10^6$  conidias por ml y  $2.1 \times 10^8$  en los 40 ml producidos, los cuales se produjeron en cajas Petri con medio PDA.

Por su parte la cepa T1 produjo  $91.5 \times 10^7$  millones de conidias por ml, haciendo un total de 40 ml una cantidad de  $3477 \times 10^6$  de conidias. Esta diferencia en nivel de producción determino que solo se evaluara la cepa.

Al inocular la cepa de *Trichoderma* T1 en medio líquido con infusión de arroz como fuente de carbono, durante ocho días, se produjo un promedio de  $633.75 \times 10^4$  conidias por ml, haciendo un total en 25 ml de  $15.8 \times 10^7$  millones de conidias.

Cuando se utilizó la melaza como fuente de carbono, se produjo una cantidad de  $333.6 \times 10^4$  conidias por ml, produciendo en 25 ml una cantidad de  $83.4 \times 10^6$  millones de conidias, que no fue una producción sobresaliente de conidias.

A pesar de que el medio líquido con sacarosa como fuente de carbono produjo  $7.6 \times 10^6$  conidias por ml alcanzando una producción de  $19 \times 10^7$  millones en 25 ml, estos resultados no concuerdan con un estudio reportado por (Chávez, 2006) en

donde utilizando infusión de arroz en un volumen de 200 ml al 3 % p/v, e inoculando  $32 \times 10^5$  conidias en la cual obtuvo  $14 \times 10^8$  conidias durante tres días de fermentación. Este mismo autor reporta que utilizando arroz con agua destilada al 3 %, arroz-melaza al 3 %, y arroz-melaza al 10%, logro producir  $40 \times 10^{16}$ ,  $23 \times 10^{10}$  y  $50 \times 10^{10}$  conidias respectivamente en cada uno de los tratamientos, lo cual nuevamente no coincide con los niveles determinados en nuestro bioensayo.

En la producción de conidias de la cepa T1 en medio combinado de melaza con levadura como fuentes de carbono, se obtuvo una producción de  $3235.5 \times 10^5$  conidias por ml, produciéndose en un total de 49 ml, la cantidad de  $15853.95 \times 10^6$  conidias. La cepa C4 produjo  $10.9 \times 10^7$  conidias por ml, alcanzándose un volumen de 80 ml con un total de  $872.2 \times 10^7$  de conidias, estos resultados coincide con un estudio previo realizado por (García *et al.*, 2006) en el que se evaluó la eficiencia de la producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai, mediante fermentación líquida, donde se utilizó melaza de trapiche de caña panelera fresca y levadura panadera granulada como fuentes de carbono. Con esta metodología se logró incrementar de  $1 \times 10^{10}$  en 5 ml a  $1.8 \times 10^9$ ,  $5.8 \times 10^8$ ,  $5.4 \times 10^8$  por ml, en 200 ml de medio dependiendo de la cepa de *Trichoderma* utilizada en un periodo de 10 a 14 días.

### **5.9 Fermentación líquida en biorreactor de las cepas de *Trichoderma* T1 y C4.**

Cuando el biorreactor cargado con medio líquido con melaza mezclada con levadura como fuente de carbono, con el fin de cuantificar, su capacidad para producir

clamidosporas, con la cepa T1, cepa inoculada no produjo clamidosporas. Cuando la cepa inoculada fue la cepa C4 produjo clamidosporas en una menor cantidad, menor que la registrada en tubos tipo Falcón en los bioensayos previos.

Los resultados obtenidos al repetir bioensayos en tubos tipo Falcón, para producir clamidosporas en la incubadora refrigerada con agitación, donde se agregó nuevamente dextrosa como fuente de carbono, siendo este en forma solidificada y polvo, al igual que la sacarosa. En la Figura 23 se muestra el análisis estadístico de la cepa T1, inoculado en diferente fuentes de carbono , en la cual hubo diferencias significativas entre tratamientos, mostrando un nivel de producción de clamidosporas de 83.750 el tratamiento 3 y el tratamiento 2 mostro un nivel de 76.500, sin una diferencia estadística entre estos dos tratamientos, sin embargo el tratamiento 1 evidenció un nivel de producción de clamidosporas estadísticamente inferior, con una media de 4.750, lo que indica que fue factor clave la sacarosa y la temperatura, para no producir clamidosporas. Resultados similares se presentaron en la cepa C4.

### Número de clamidiosporas producidas en 24 horas.

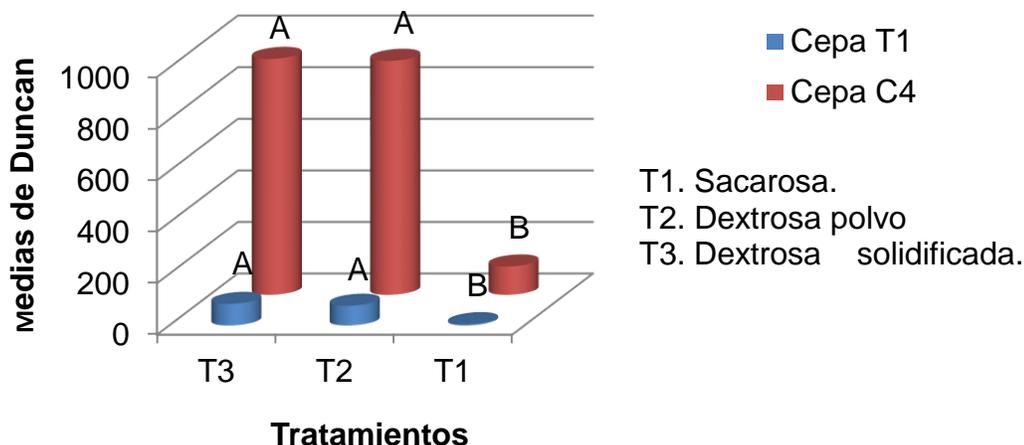


Figura 23. Número de clamidiosporas por campo óptico producidas en 24 horas, por las cepas de *Trichoderma* T1 y C4 crecidos en diferentes fuentes de carbono.

### 5.10 Aislamiento de cepas de *Trichoderma* y fitopatógenos en plantas de tomate, después de cumplir los quince días de haberse infectado.

Las muestras que se aislaron de las plantas de tomate sembrados en el medio PDA de los diferentes tratamientos presentaron abundante crecimiento de hongos, estos aislamientos presentaron diferentes morfologías, entre ellos hongos fitopatógenos que no pertenecía a lo esperado, estos fitopatógenos encontrados correspondieron a *Rizoctonia solani* y *Penicillium*, y otras pertenecían a *Trichoderma* que creció muy frecuentemente en las siembras de los diferentes tratamientos.

Los fitopatógenos de *Rizoctonia solani* se presentaron en el tratamiento 1 de los aislados de las muestras de raíz, tratamiento 2, tratamiento 3, y el fitopatógeno de

*Penicillium* en el tratamiento 7, tanto en las muestras de los aislados del tallo bajo y alto, esto se debió a que las plantas de tomate ya estaban contaminadas con esos fitopatógenos o de que se hallan contaminado al momento del trasplante a las macetas.

Todos los tratamientos presentaron *Trichoderma*, esto pudo haberse debido que al momento del riego se salpicaran a los otros tratamientos no inoculados con *Trichoderma*, otro factor determinante pudiera haber sido que la persona que nos proporcionó las plantas de tomate aplicará como insumo este tipo de control biológico.

Se analizaron estadísticamente las muestras de raíz de los diferentes tratamientos, en la cual se presentó diferencias significativas, presentando un nivel de porcentaje de colonización de *Trichoderma* de 98 el tratamiento 5, el tratamiento 4 un porcentaje de 88, el tratamiento 3 un porcentaje de 86 y el tratamiento 2 presentando un porcentaje de 80, siendo este tratamiento igual a los tratamiento mencionados anteriormente y al tratamiento 1, presentándose en el tratamiento 1 un nivel de porcentaje de colonización estadísticamente inferior, con una media de 56, siendo este el tratamiento control. En la cual se puede deducir de que al momento del riego se hubiese salpicado el inoculo de *Trichoderma* hacia este tratamiento. Figura 24.

Al analizarse estadísticamente las muestras aisladas del tallo bajo y alto de las plantas de tomate del porcentaje de colonización de *Trichoderma* se presentó en el tallo bajo diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento 4 y 7 iguales no mostrando diferencia estadística entre estos tratamientos, mientras el

tratamiento 1 y 6, no presento diferencias significativas, apreciándose de que fue igual al tratamiento 4, 7, y al tratamiento 5 el cual presento un nivel de porcentaje de colonización estadísticamente inferior con una media de 46. Figura 25. En el tallo alto no se presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Figura 26.

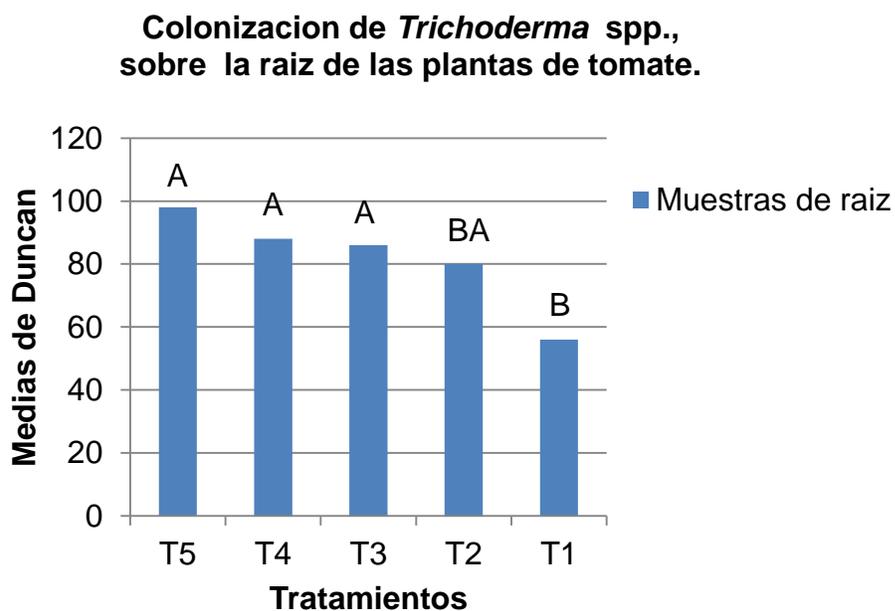


Figura 24. Análisis estadístico de colonización de *Trichoderma* spp, sobre la raíz de las plantas de tomate.

**Colonización de *Trichoderma* spp., sobre el tallo bajo de las plantas de tomate.**

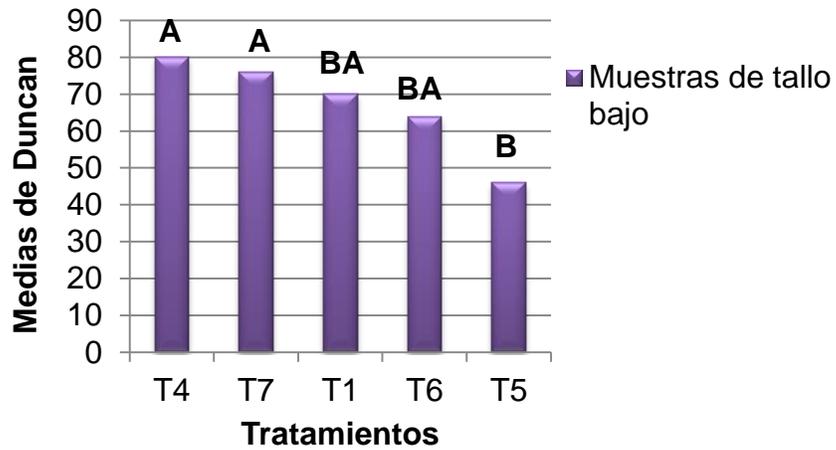


Figura 25. Análisis estadístico de colonización de *Trichoderma* spp., sobre el tallo bajo de las plantas de tomate.

**Colonización de *Trichoderma* spp., sobre el tallo alto de las plantas de tomate.**

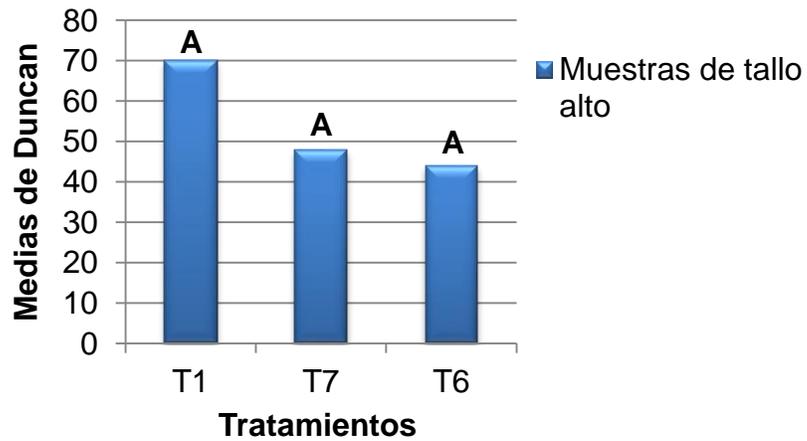


Figura 26. Análisis estadístico de colonización de *Trichoderma* spp., sobre el tallo alto de las plantas de tomate.

En la figura 27 se muestra las raíces de las plantas de tomate inoculado con *Trichoderma* spp., y las no inoculadas, notándose claramente que las que fue inoculada con *Trichoderma* spp., se incrementó el crecimiento de las raíces y desarrollo.



Figura 27. 1.- Raíz de planta de tomate inoculado con *Trichoderma* spp., 2.- Raíz no inoculada.

En estudios previos realizados por (Tovar, 2008) en pruebas de antagonismo de 6 aislados de *Trichoderma* en esquejes enraizados de clavel de la variedad Everest susceptibles a *R. solani* bajo condiciones de invernadero, confirmando los bioensayos de antagonismo in vitro, obtuvo resultados favorables, reflejado en mayores valores de crecimiento de la parte aérea, raíz, además de una mejor apariencia de los mismos y ausencia de signos de la enfermedad, resultados similares a esto se presentó en este bioensayo evaluado en plantas de tomate.

En estudios realizados por Benítez *et al.*, 2004 con *Trichoderma* demostraron que la colonización de raíces por este hongo frecuentemente incrementa el crecimiento y

desarrollo de raíces, productividad de cultivos, resistencia a estados abióticos y la forma y uso de nutrientes.

## CAPITULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 6.1 Conclusiones.

- Se logró evaluar la capacidad antagonista in vitro de cepas de *Trichoderma* Bar321 y Bar331 contra fitopatógenos de *F. oxysporum* y *F. solani*. Estas cepas mostraron un nivel de antagonismo viable. Al igual se evaluó la capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma* Bar 321, Bar331, T1, T4, C4, y TOM contra fitopatógenos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis – lycopersici* en donde la cepa C4 presentó el mayor nivel de antagonismo contra el fitopatógeno de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y la cepa T1 presentó mayor nivel de antagonismo contra el fitopatógeno de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis – lycopersici*.
- En la producción de conidios, en la cepa Bar321 se obtuvieron recuentos de  $81.7 \times 10^6$  conidios/ml y en la cepa Bar331 se obtuvieron recuentos de  $77.65 \times 10^5$  conidios/ml. después de cinco días de incubación.

Al igual se obtuvo en las cepas T1 una cantidad de  $45.750 \times 10^6$  conidias/ml y para la cepa C4 un total de  $72.450 \times 10^6$  conidias/ml

- El mejor tratamiento en variación de conidias de *Trichoderma* spp., para producir clamidosporas fue al que se concentró mayor cantidad de conidias.
- En la evaluación de variación de fuentes de carbono champiñón/dextrosa, la mejor producción de clamidosporas, conidias y micelios fue el tratamiento 60% champiñón y 40% dextrosa, al igual que el tratamiento 30% champiñón y 70% dextrosa. Este resultado fue para las cepas Bar321, Bar331, C4 y T1.
- El mejor tratamiento obtenido en las condiciones variables de champiñón/dextrosa fue el que se le dio mayor concentración, este resultado fue para la cepa Bar321, Bar331, T1 y C4.
- Se logró condicionar los factores determinantes para no producir clamidosporas en el biorreactor, siendo este la temperatura y como fuente de carbono la sacarosa.
- En la infección de cepas de *Trichoderma* y fitopatógenos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis – lycopersici* en plantas de tomate, se logró el aislamiento de las cepas de *Trichoderma*, y no habiendo infecciones del patógeno hacia las plantas.

## 6.2 Recomendaciones.

- Efectuar pruebas de antagonismo con diferentes cepas de *Trichoderma* spp, ya que no todas las cepas responden eficazmente a diferentes patógenos.
- Hacer evaluaciones con respecto a la producción de clamidosporas y conidios, con las diferentes cepas de *Trichoderma* spp, ya que varían en cuestión de producción. No todas las cepas producen la misma cantidad de clamidosporas y conidias.
- Variar concentraciones de fuentes de carbono en diferentes cepas de *Trichoderma* spp., ya que esto influye en la producción de conidias y clamidosporas.
- Evaluar en autoclave diferentes tiempos de esterilización, de los medios que se utilicen, ya que hay veces que no es lo suficiente el tiempo de esterilización que se le da y presentan signos de contaminación, además tomar en cuenta de que Todos los materiales que se utilizan para hacer el MST deben de estar previamente esterilizado.
- Para realizar infecciones en planta de cualquier tipo de cultivo, determinar primero la procedencia, así como tener mucho cuidado en el momento de la infección y tomar en cuenta de que el tratamiento control debe de estar lejos de los tratamientos infectados.

## CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. 5th ed. El Sevier academic press. Pp.922. Burlington, MA, USA.
2. Alexopoulos, C; Mims, C. and Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. John Wiley y Sons Inc. USA. Pp. 125.
3. Apodaca, S. M. A. (2006). Enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* en el tomate (*lycopersicon esculentum*). En: Memoria del curso Enfermedades de Hortalizas. Fundación Produce Sinaloa. Culiacán Sinaloa.
4. Arnaud, A; Bernard, M; Berset, C; Bocquet, J; Bovix, M; Rosnay, J; Dubuis, T; Galzy, P; Goulsaud, J; Guiraud, J; Kubiak, C; Larrieu, J; Leveav, J; Pourquoi, J; Richard, H; Scriban, R; y Vandecasteele, J. (1985). Biotecnología. Ed. El Manual Moderno. México, DF. Pp. 669.
5. Ascencio-Álvarez, A; López-Benítez, A; Borrego-Escalante, F; Rodríguez-Herrera, SA; Flores-Olivas, A. y Jiménez-Díaz, F. (2008). Marchitez del tomate. I: Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 26. Pp. 114-120.
6. Astudillo, M.C. y Blanco, B. (1999). Establecimiento de los parámetros de producción Semi-industrial del hongo *Trichoderma harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de posgrado. Microbiología industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia. Pp. 7 - 11, 14 - 20.
7. Ávila, M. M. E; Herrera, E. y Cabriales, P.J. J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.). By strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. Soil Biology Biochemistry. Pp 1823-1830.

8. Benitez, T; Rincon, A.M; Limón, M.C. and Codón, A. (2004). Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. V. 7. Pp. 249 – 260.
9. Caldwell, R. (1958). Fate of spores of *Trichoderma viride* Pers. Ex Fr. Introduced into soil. *Nature* 181: 1144 – 1145.
10. Calzada, A; Bueno, A. y Sánchez, M. (2000). Temas de enfermedades emergentes y hongos patógenos asociados con la infección por VIH. *Ciencia al Día Internacional*. Ciencias Biológicas. Universidad de Salamanca, Salamanca. España. Pp. 120.
11. Camargo, H. (2005). Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza satriva*), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista *Trichoderma harzianum*. Tesis profesional. Universidad de Salamanca, Salamanca. España. Pp. 98.
12. Carrillo, F.J.A; Montoya, R.T.J; García, E.R.S; Cruz, O.J.E; Márquez, Z.I. y Sañudo, B.A.J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 21. Pp. 123-127. Sinaloa.
13. Chahal, D. (1985). Solid – state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and environmental. Microbiology*. Vol. 49. No. 1. Pp. 205 – 210.
14. Chávez, G.M.N. (2006). Producción de *Trichoderma* spp. Y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis profesional. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pp 178.
15. Chávez, D. (2004). Caracterización molecular de especies de *Trichoderma*. Trabajo de grado. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pp. 57.
16. Chen, J. y Zhu, Y. (2013). Solid state fermentation for food and Bevarages. Noviembre. 2014. Academic Press. London.
17. Chet, I; Benhamou, N. y Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.2). Kubicek C. P. y Harman G. E. (Eds.). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. Pp. 153 – 172.

18. Chet, I. (1987). *Trichoderma* application mode of action, and potencial as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Pp. 137. En I. Chet, ed. Innovative approaches to plant disease control. New York.
19. Chet, I. and Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. V.71. Pp. 286 – 290.
20. Chet, I; Inbar, J; Hadar I. (1997). Fungal antagonists y mycoparasites. In: Wicklow D.T. Soderstrom, B. eds. The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer – Verlag, Berlin, Pp. 165 – 184.
21. Chisti, Y. y Murray, Moo-Young. 2002. Bioreactor, Encyclopedia of physical Science and Technology, Vol. 2 (on-line), Academic Press, London. 247-266.
22. Cholango, L. (2009). Selección de cepas de *trichoderma* sp. in vitro, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Tesis. Quito, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército IASA I. Pp.90.
23. Crueger, W. y Crueger, A. 1989. Biotecnología. Manual de Microbiología, Industria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España. Pp. 73, 115 – 118.
24. Domsh, K; Anderson, W; Yersoon, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Revision of the genus *Trichoderma*. Academic Pres. London Pp. 136 – 139, 794 – 810.
25. Domsh, K.H; Gams, W. y Anderson, T.H. (1993). Compendium of soil Fungi: *Trichoderma*. Vol. 1 Academic press London (UK). Pp. 794 – 809.
26. Doran, P. (1998). Principios de ingeniería en los bioprocesos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Pp. 349-358.
27. Elad, Y. and Chet, I. (1982). Degradation of plant pathogenic fungus by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of microbiology. V.28. Pp: 719 – 225.
28. Escalonada, C.V; Alvarado, V.P.; Monardes, M.H.; Urbina, Z.C. y Martin, B.A. (2009). Manual de Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Nudo Hortícola VI Región. Facultad de C. Agronómicas, Universidad de Chile. Pp. 60.
29. FEDNA. (2003). Tablas de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) de composición y valor nutritivo de

- alimentos para la formulación de piensos compuestos. Fundación española para la nutrición animal. Madrid España. P. 423.
30. Fonseca, A. (1998). Estudio preliminar sobre la dinámica poblacional del biocontrolador *Trichoderma* spp; en el suelo. Tesis de posgrado. Bacteriología Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia. Pp. 29 - 32.
  31. Forero, M. (2002). Producción masiva de microorganismos biocontroladores. Programa de Manejo Integrado de Plagas MIP. Centro de Investigación Tibaitata. Ed. Acrivia. Corpoica. Publicación.V. 9. Pp. 27.
  32. Gams, W. y Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma* and *Gliocladium*. London. Editorial Taylor and Francis.
  33. García, R; Duran, A.M. y Riera, R. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. Mérida Venezuela. Fitosanidad. Vol. 10. No. 4. Pp. 295 – 298.
  34. Grondona, I; Hermosa, R; Tejada, M; Gomis, M; Mateo, P; Bridge, P; Monte, E. and García, I. (1997). Physiological and biochemical. Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. Applied and environmental Microbiology. Vol. 63, No. 8. Pp. 3189 – 3198.
  35. Harman G. (1998). “El *Trichoderma* spp. Deuteromycetes, Moniliales (el sistema de la clasificación asexual). London. Pp. 150.
  36. Howell, C.R. (1998). The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G.E. Kubicek C.P. *Trichoderma* y *Gliocladium*. V. 2. Taylor y Francis, Padstow, Pp. 173 – 184.
  37. Howell, C.R. (2003). Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. V. 87. Pp. 4 – 10.
  38. Hunziker, A. T. (1979). South American Solanaceae: a synoptic survey. In: Hawwkes, J. G.; Lester, R. N.; Skelding, A. D. (Eds.). The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Academic Press, New York, London: 4985 p.
  39. Jaramillo, N; Rodríguez, P; Guzmán, A. y Zapata, C. (2007). Manual técnico de buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Corpoica. Ed. CTP Print Ltda. Pp. 314.

40. Jiménez, C. y Sanabria, N. (2008). Población final de *Trichoderma harzianum* en el control de la marchitez vascular del tomate causado por *F. oxysporum*. F. sp. *Lycopersici*. Fitopatología venezolana. Venezuela. Vol. 21. Pp. 29 – 30.
41. Kredics, L; Antal, Z; Manczinger, L; Szekeres, A; Kevel, F. and Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains With biocontrol potential. Food Technology and biotechnology. Vol. 41. No.1. Pp. 37 – 42.
42. Lewis, J. y Papavizas, G. (1984). Chlamydospore of *Trichoderma* spp in natural substrate. Can. J. Microbiol. 30: 1 – 7.
43. Martínez, M. (2001). Libro de agricultura orgánica. Bogotá Colombia. pp.20,186,191,192. [scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010).
44. Mejía, M; Estrada, E. y Franco, M. (2007). Respuesta del tomate chonto cultivar Unapal Maravilla, a diferentes concentraciones de nutrientes. Acta Agronómica. 56(2). Pp. 75-83.
45. Mendoza, Z.C. (1996). Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. Imprenta Universitaria de la Universidad Autónoma de Chapingo, México. 85 p.
46. Menéndez, A. B. (1996). Micoparasitismo de *Trichoderma* spp., sobre el patógeno vegetal de suelo *Sclerotinia sclerotiorum*, pruebas preliminares sobre el biocontrol de esta enfermedad. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Buenos Aires Argentina. Pp. 196.
47. <http://dx.doi.org/10.4489/MYCO.2006.34.3.111>.
48. Mitchell, D; Krieger, N. y Berovic, M. (2006). Solid-state Fermentation Bioreactors: Fundamentals of design and operation. Primera edición. Berlin, Germany. Springer.
49. Moore, E. (1996). Fundamentals of the fungi. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.
50. Mukherjee, P; Latha, J; Hadar, R. and Horwitz B. (2004). Role of two 6-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. Applied and environmental. Microbiology. Vol. 70, No. 1. Pp. 542 – 549.

51. Pachón, J. (1997). Puesta en marcha de un biorreactor airlift y pruebas preliminares con el hongo del Té. Facultad de ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Pp. 4, 5, 18 -20, 23-27.
52. Padmasari, Y. (2005). Fungal Mats in Solid – state fermentation. PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen. The Netherlands.
53. Páez, M.E. y Sanabria de A.N. (2007). Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersice*. Revista Fav.Agron. Universidad de Venezuela, facultad de Agronomía. Venezuela. Pp 27-31.
54. Papavizas, G. (1985). *Trichoderma* y *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of phytopathology. Vol 23. Pp. 23 – 54.
55. Pérez – Guerra, N; Torrado – Agrasar, A; López – Macías, C. and Pastrana, L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. Vol. 2. No.3. Pp. 343 – 350.
56. Pietrasanta L. Bilderling V.C. (2011). Tópico en Biofísica Molecular. Practica de Laboratorio.
57. Pumphrey, B. y Julien, C. (1996). And introduction to fermentation. New Brunswick Scientific Benelux BV. (The Netherlands). Pp. 26.
58. Raimbauth, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 1. No. 3. Pp. 1 – 15.
59. Rebolledo, R.H.H. (2000). SAS en microcomputadora, análisis estadístico de datos experimentales. 9ed. Printed in México. Departamento de suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México 176.
60. Rendón, S.L.A; Ávila M.M.E; Rodríguez, G.B. y del Real, L.J.I. (2011). Manual Técnico para el Establecimiento de Huertas Madre de Agave Azul. Edición Prometeo editores. Guadalajara, Jalisco, Mex. Pp. 127.
61. Rodríguez, V. (2002). Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofiticos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del damping off en plantas de tomate. Unidad de Postgrados. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Unidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
62. Rodríguez, R; Tavares, R. y Medina. (2001). Cultivo moderno del tomate. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 255 p.

63. Rossman, A. (1996). Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia*. Vol. 88. No. 1. P. 1 – 19.
64. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2006). Anuario estadístico de la producción agrícola. Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable. México, D. F.
65. Scragg, A. (1997). Biotecnología para ingenieros. Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos. LIMUSA, México. Pp. 287-331.
66. Scriban, R. (1985). Biotecnología. El manual Moderno. México. Pp. 168-216, 233.
67. Serrano, C; Flores, M; Patiño, M; Ortiz, V; Albiter, M; Caro, R; Allende, A; Carrillo, E. y Galindo, A. (2003), “Desarrollo de bioprocesos para la producción de agentes de control biológico: experiencias de escalamiento y pruebas de campo”, Memorias del X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jalisco. Pp.56.
68. Sosa, M. A. (2013). Guía para el Reconocimiento de Enfermedades en el Cultivo de Tomate. Estación Experimental Agropecuaria el Colorado. Producción Vegetal. Cultivos Extensivos. Ediciones INTA. Argentina. Pp. 34.
69. Stefanova, M; Leiva, A; Larriganaga, L. y Coronado, M. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* sp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*. 16a Ed. Cuba. Pág. 509 – 516.
70. Tovar, C.J.C. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de *Trichoderma* spp., frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia. Pp. 81.
71. Tovar, W. y Prieto, D. (1995). Estudio preliminar sobre un reactor airlift. Tesis de pregrado. Ingeniería química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional. Pp.9-12.
72. Tuite, J. (1969). Plant pathological methods fungi and bacteria. Burgess publishing company. Minneapolis, Minn. Pp 239.
73. Valdés, R. y Lundstedt J. (2012). Bioinoculantes de suelo. Boletín técnico. No.6. Departamento técnico ASP, Chile. PP. 181.

74. Valenzuela, Z. A. G.; (2003). El agave tequilero, cultivo e industria de México; Ediciones Mundi-Prensa; México D.F., Madrid, Barcelona.
75. Wakelin, S.A. Sivasithamparam, K. Cole, A.L.J. y Skipp, R.A. (1999). Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koninngi*. New Zeland Journal of agricultural. Research. Vol. 42. Pp. 37 – 45.
76. Ward, O. (1989). Biotecnología de las fermentaciones. Editorial Acríbia. S.A. Zaragoza – España. Pp. 173 – 185.
77. [www.doctorfungus](http://www.doctorfungus.com) @ 2005.