



***Secretaría de Educación Pública***

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Efecto de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* y  
*Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de tomate (*Solanum  
lycopersicum esculentum*) y cacao (*Theobroma cacao* L.)**

Tesis

Que para obtener el grado de:  
Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ Natali Guadalupe Hernandez Gonzalez

Asesores:

Dr. Mario Ramírez Lepe

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

Dra. María del Jesús Perea Flores

H. Veracruz, Ver., Mex.

29 Junio de 2017

## RECONOCIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haberme otorgado su apoyo económico durante el programa de Maestría.

A la **Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz**, por facilitarme sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

Al **Centro de nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politecnico Nacional** por facilitar sus instalaciones para el cumplimiento de algunos objetivos de esta tesis.

## RESUMEN

Hernández González, Natali Guadalupe. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2017. **Efecto de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* y *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y cacao (*Theobroma cacao* L.)**. Asesores: Dr. Mario Ramírez Lepe, Dra. Cynthia Cano Sarmiento, Dra. María del Jesús Perea Flores.

Todas las plantas en los ecosistemas naturales parecen tener relaciones simbióticas con microorganismos (MO). Las interacciones entre plantas y MO en la rizosfera son clave de la salud vegetal, la productividad y la fertilidad del suelo. Estos MO incrementan el reciclaje y la solubilización de nutrientes minerales, sintetizan vitaminas, aminoácidos y hormonas. Se sabe que la inoculación de semillas o suelos con MO solubilizantes de fosfatos da como resultado un mayor rendimiento de los cultivos. El género de *Pochonia chlamydosporia* y *Trichoderma* spp. son endófitos que tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, promoviendo su crecimiento, resistencia a las enfermedades y estimulan las defensas contra microorganismos fitopatógenos. Sin embargo son muy pocos estudios sobre el efecto que genera la combinación de dos especies de hongos endófitos en plantas de tomate y cacao. Por lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto endófitico que tiene la combinación de las especies de *Trichoderma* y *Pochonia Chlamydosporia* var. *catenulata* en el crecimiento de plántulas de tomate (*S. lycopersicum*) y cacao (*T. Cacao* L).

En los experimentos realizados con las plántulas de tomate, el aislado de *P. chlamydosporia* logro incrementar dos veces el número de raíces secundarias y en cuanto al peso fresco aumento hasta 9 g más con respecto al testigo. En cuanto a los tratamientos con los aislados VSL 20 y VL 104 se observa una reducción en el número de raíces secundarias y el peso total fresco. Los resultados de la combinación de las especies de *Trichoderma* y *P. chlamydosporia* no se observa

efectos benéficos. Del mismo modo los estudios realizados con plántulas de cacao, el tratamiento con *P. chlamydosporia* no fue capaz de aumentar el número de raíces secundarias ni el peso fresco, en el resto de los tratamientos hubo una reducción en el número de raíces secundarias y peso fresco.

Concluyendo que la combinación de las especies ensayadas de *Trichoderma spp.* y *Pochonia chlamydosporia* no tienen efecto sobre el número de raíces secundarias y peso de plantas de tomate y cacao.

## ABSTRACT

Hernández González, Natali Guadalupe. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2017. **Efecto de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* y *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y cacao (*Theobroma cacao* L.)**. Asesores: Dr. Mario Ramírez Lepe, Dra. Cynthia Cano Sarmiento, Dra. María de Jesús Perea Flores.

All plants in natural ecosystems seem to have symbiotic relationships with microorganisms (MO). The interactions between plants and MO in the rhizosphere are key to plant health, productivity and soil fertility. These MOs increase the recycling and solubilization of mineral nutrients, synthesizing vitamins, amino acids and hormones. Inoculation of seeds or soils with phosphate solubilizing MOs is known to result in increased crop yields. The genus *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma* spp. Are endophytes that have the ability to colonize the roots of plants, promoting their growth, resistance to diseases and stimulate the defenses against phytopathogenic microorganisms. However, there are very few studies on the effect of combining two species of endophyte fungi on tomato and cacao plants. Therefore, the general objective of this work was to evaluate the endophytic effect of the combination of *Trichoderma* and *Pochonia Chlamydosporia* var. *Catenulata* in the growth of tomato plants (*S. lycopersicum*) and cocoa (*T. cocoa* L.).

In the experiments carried out with tomato plants, the isolate of *P. chlamydosporia* was able to increase the number of secondary roots twice and, in terms of fresh weight, increased up to 9 g more than the control. Regarding the treatments with VSL 20 and VL 104 isolates, a reduction in the number of secondary roots and the total fresh weight was observed. The results of the combination of the species of *Trichoderma* and *P. chlamydosporia* do not observe beneficial effects. In

the same way the studies with cocoa seedlings, the treatment with *P. chlamydosporia* was not able to increase the number of secondary roots nor the fresh weight, in the rest of the treatments there was a reduction in the number of secondary roots and fresh weight.

Concluding that the combination of the tested species of *Trichoderma spp.* And *Pochonia chlamydosporia* have no effect on the number of secondary roots and weight of tomato and cacao plants.

## CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN  | iii |
| ABSTRACT   | v   |
| CONTENIDO  | vii |
| LISTA DE TABLAS  | x   |
| LISTA DE FIGURAS   | xi  |
| LISTA DE ABREVIACIONES   | xiv |
| 1 INTRODUCCION   | 1   |
| 2 ANTECEDENTES   | 4   |
| 2.1 Los hongos endófitos: diversidad y roles funcionales   | 4   |
| 2.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i>   | 4   |
| 2.2.1 Mecanismo de acción de <i>P. chlamydosporia</i> sobre nematodos                              | 5   |
| 2.2.2 Mecanismo endófitico de <i>P. chlamydosporia</i> con la planta.                              | 5   |
| 2.2.3 Estilo de vida de <i>P. chlamydosporia</i>   | 6   |
| 2.2.4 Producción de enzimas extracelulares por diferentes aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> | 7   |
| 2.3 <i>Trichoderma</i>   | 8   |
| 2.3.1 <i>Trichoderma</i> spp. puede colonizar los espacios intercelulares de las raíces            | 9   |
| 2.3.2 Efectos beneficiosos de la interacción <i>Trichoderma</i> -planta                            | 9   |
| 2.4 Uso de Microorganismos endófitos en cultivos de interés económico.                             | 11  |
| 2.5 Composición de las células de las plantas  | 15  |
| 3 OBJETIVOS  | 16  |
|  | vii |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.1   | Objetivo general   | 16 |
| 3.2   | Objetivos específicos  | 16 |
| 4     | MATERIALES Y METODOS   | 17 |
| 4.1   | Organismos utilizados  | 17 |
| 4.2   | Producción de Enzimas Hidrolíticas de <i>Pochonia chlamyosporia</i> .  | 18 |
| 4.3   | Actividad poligalacturonasa  | 18 |
| 4.3.1 | Actividad de endoglucanasa.  | 19 |
| 4.3.2 | Actividad $\beta$ -1,3-Glucanasa   | 20 |
| 4.3.3 | Actividad quitinolítica  | 20 |
| 4.3.4 | Actividad quitosanasa.   | 21 |
| 4.3.5 | Actividad lipolítica   | 21 |
| 4.3.6 | Actividad proteolítica   | 22 |
| 4.4   | Determinación de Ácido Indolacético (IAA)  | 23 |
| 4.5   | Detección de la solubilización de fosfatos   | 23 |
| 4.6   | Evaluación del efecto de <i>P. chlamyosporia</i> y <i>Trichoderma spp.</i> sobre el NRS y el peso fresco de plántulas de tomate y cacao. | 24 |
| 4.7   | Microscopia Óptica   | 25 |
| 4.7.1 | Preparación de las muestras  | 25 |
| 5     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN   | 27 |
| 5.1   | Ensayos de actividad enzimática de <i>P. chlamyosporia</i> var. <i>catenulata</i> .  | 27 |
| 5.1.1 | Sustrato 0.1% ácido poligalacturónico (APG)  | 27 |
| 5.1.2 | Sustrato 0.1% de carboximetilcelulosa (CMC)  | 28 |
| 5.1.3 | Sustrato laminarina 0.1%   | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 5.1.4 Sustrato Quitina 0.1%   | 29 |
| 5.1.5 Sustrato Quitosano 0.1%   | 30 |
| 5.1.6 Sustrato Tween 0.1%   | 30 |
| 5.1.7 Sustrato Caseína 0.1%   | 31 |
| 5.2 Producción de IAA en PDB suplementado con triptófano  | 34 |
| 5.3 Índice de solubilización de fosfatos  | 35 |
| 5.4 Efecto de los aislados de <i>Trichoderma</i> y <i>P. chlamydosporia</i> sobre el crecimiento de plántulas de tomate | 37 |
| 5.5 Efecto de los aislados de <i>Trichoderma</i> y <i>P. chlamydosporia</i> sobre el crecimiento de plántulas de cacao  | 40 |
| 5.6 Micrografías de plántulas de tomate   | 42 |
| 6 CONCLUSIONES  | 46 |
| 7 BIBLIOGRAFÍA  | 47 |
| 8 APENDICES   | 52 |
| APENDICE A  | 52 |
| APENDICE B  | 52 |
| APENDICE C  | 54 |
| APENDICE D  | 54 |
| APENDICE E  | 55 |
| APENDICE F  | 55 |
| APENDICE G  | 56 |
| APENDICE H  | 56 |
| APENDICE I  | 57 |
| APENDICE J  | 58 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| TABLA 4-1. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>P. chlamydosporia</i> utilizadas en este estudio.....                                | 17 |
| TABLA 4-2 Diseño de experimentos. Tratamientos en tomate y cacao .....  | 24 |
| TABLA 5-1. Producción de ácido Indolacético por diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>P. chlamydosporia</i> . .....     | 34 |
| TABLA 5-2. Índice de solubilización de fosfatos por diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>P. chlamydosporia</i> . ..... | 36 |
| TABLA 9-1. Composición del medio MS .....   | 57 |
| TABLA 9-2. Soluciones y tiempos de deshidratación.....  | 58 |
| TABLA 9-3. Soluciones y tiempos para la desparafinación.....  | 58 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 2-1. Estilo de vida tritrófico de <i>P. chlamydosporia</i> . P) se muestra a <i>P. chlamydosporia</i> parasitando huevos de <i>Meloidogyne javanica</i> , S) se muestra una clamidospora como las que se encuentran en el suelo (saprofito de suelos), E) se muestra a <i>P. chlamydosporia</i> colonizando endofíticamente raíces de cebada (Larriba <i>et al.</i> , 2014). ..... | 6  |
| FIGURA 2-2. Representación esquemática de la señalización molecular de la planta de <i>Trichoderma</i> y de los efectos inducidos por las plantas. T, <i>Trichoderma</i> ; P, patógeno; IAA, ácido indol -3- acético; ACCD, ACC desaminase; ET, etileno; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; ISR, resistencia sistémica inducida. (Hermosa <i>et al.</i> , 2012). .....            | 10 |
| FIGURA 5-1 Actividad Poligalacturonasa y proteasa en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pcat) que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de ácido poligalacturónico como fuente de carbono.   | 27 |
| FIGURA 5-2. Actividad Endoglucanasa y Proteasa en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de carboximetilcelulosa, como fuente de carbono. ..   | 28 |
| FIGURA 5-3. Actividad $\beta$ -1,3- glucanasa y Proteasa en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de laminarina, como fuente de carbono. ....   | 29 |
| FIGURA 5-4. Actividad Quitinasas y Proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de quitina, como fuente de carbono. ....   | 29 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 5-5. Actividad Quitosanasa y Proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de quitosano, como fuente de carbono.....   | 30 |
| FIGURA 5-6. Actividad lipolítica y proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (v / v) de tween, como fuente de carbono.....  | 31 |
| FIGURA 5-7. Actividad Proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de caseína, como fuente de carbono.....   | 31 |
| FIGURA 5-8. Comparación de la actividad proteasa en los diferentes medios inductores, como fuente única de carbono.....   | 32 |
| FIGURA 5-9. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el número de raíces secundarias (15 días después de la siembra) de plántulas de tomate. Los valores en las columnas indican la media de n= 24 plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a $P \leq 0,001$ . .....                 | 37 |
| FIGURA 5-10. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso fresco total de raíces secundarias 15 días después de la siembra (dds) de plántulas de tomate. Los valores en las columnas indican la media de n= 24 plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a $P \leq 0,001$ . ..... | 39 |
| FIGURA 5-11. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el número de raíces secundarias (13 días después de la siembra) de plántulas de cacao. Los valores en las columnas indican la media de n= 24 plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a $P \leq 0,001$ . .....                 | 40 |
| FIGURA 5-12. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso fresco total (13 días después de la siembra) de plántulas de cacao. Los valores en las columnas indican la media de n= 24 plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a $P \leq 0,001$ . .....                            | 41 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 5-13 Fragmento de raíz de tomate sin tratamiento. Se observan las estructuras de la raíz intactas. Esto nos sirve para observar algún cambio estructural debido a la colonización por los hongos endófitos. Tamaño de escala, 10 $\mu$ m.....                        | 42 |
| FIGURA 5-14 Fragmento de raíz de tomate 8 días después de la inoculación con <i>P. chlamydosporia</i> (Pcat) Las flechas indican la aparición de clamidosporas en el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 $\mu$ m. ....  | 43 |
| FIGURA 5-15 Fragmento de raíz de tomate 8 días después de la inoculación con <i>Trichoderma spp.</i> (VSL20). Las flechas indican la aparición de hifas y esporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 $\mu$ m. ....                             | 43 |
| FIGURA 5-16 Fragmento de raíz de tomate 8 ddi con <i>Trichoderma spp.</i> (VSL104). Las flechas indican la aparición de hifas y esporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 $\mu$ m.....  | 44 |
| FIGURA 5-17 Fragmento de raíz de tomate 8 ddi con <i>Trichoderma spp.</i> (VSL20) y <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pcat). Las flechas indican la aparición de hifas, esporas y clamidosporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 $\mu$ m....   | 44 |
| FIGURA 5-18 Fragmento de raíz de tomate 8 ddi con <i>Trichoderma spp.</i> (VSL104) y <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pcat). Las flechas indican la aparición de hifas, esporas y clamidosporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 $\mu$ m..... | 45 |
| FIGURA 9-1 Curva estándar de glucosa para actividad poligalacturonasa.....  | 54 |
| FIGURA 9-2 Curva estándar de glucosa para actividad endoglucanasa y $\beta$ -1,3-Glucanasa. ....  | 54 |
| FIGURA 9-3 Curva estándar de glucosa para la actividad quitinasa.....   | 55 |
| FIGURA 9-4 Curva estándar de glucosa para la actividad Quitosanasa.....   | 55 |
| FIGURA 9-5. Curva estándar de p- nitrofenol para actividad lipasa.....  | 56 |
| FIGURA 9-6 Curva de estándar de Tirosina para actividad Proteasa .....  | 56 |

## LISTA DE ABREVIACIONES

|       |   |
|-------|---|
| ACC   | Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico   |
| ACCD  | ACC Desaminasa  |
| ET    | Etileno   |
| IAA   | Ácido indol-3- acetico  |
| ISR   | Resistencia sistematica inducida  |
| JA    | Ácido jasmonico   |
| MO    | Microorganismos   |
| NBRIP | Medio de crecimiento de fosfato del Instituto Nacional de Investigaciones Botánicas |
| NRS   | Número de raíces secundarias  |
| PDA   | Agar papa dextrosa  |
| PDB   | Caldo papa dextrosa   |
| PVK   | Medio Pikovskaya  |
| SA    | Ácido salicilico  |
| SAR   | Resistencia sistematica adquirida   |
| TFW   | peso total fresco   |

## 1 INTRODUCCION

Todas las plantas en los ecosistemas naturales parecen tener relaciones simbióticas con hongos endófitos (Rodríguez *et al.*, 2009). Se han reportado efectos benéficos de la introducción de microorganismos específicos en el crecimiento de las plantas en numerosos cultivos, incluyendo el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivado en condiciones de campo (Kokalis *et al.*, 2002) o invernadero en medios orgánicos (Guo *et al.*, 2004). Estos microorganismos benéficos denominados PGPR (rizobacteria que promueve el crecimiento de las plantas) o PGPF (hongos que promueven el crecimiento de las plantas) aumentan el crecimiento de las plantas a través de numerosos mecanismos, incluyendo la protección de las raíces contra la infección por patógenos menores y mayores (Whipps, 1997); La disponibilidad de nutrientes para la planta huésped, la reducción del nivel de etileno dentro de la planta o la mejora en la producción de compuestos estimulantes, como los reguladores del crecimiento de las plantas (Antoun y Prévost, 2005). Entre los reguladores del crecimiento de las plantas, el ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina natural más común que se encuentra en las plantas y se cree que su efecto positivo en el crecimiento y morfología de las raíces aumenta el acceso a más nutrientes en el suelo (Vessey, 2003). El fósforo es uno de los principales nutrientes de las plantas que limitan su crecimiento. La mayoría de los nutrientes esenciales de las plantas, incluido el fósforo, permanecen en forma insoluble en el suelo. Una gran parte de los fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizante se inmoviliza rápidamente después de la aplicación y se vuelve no disponible para las plantas (Nautiyal, 1999). Hongos como *Trichoderma* spp. (Hermosa *et al.*, 2012) y *Pochonia chlamydosporia* (Zavala *et al.*, 2015) son endófitos de las raíces de algunas plantas. Estos microorganismos pueden formar asociaciones endofíticas e interactuar con otros microbios en la rizósfera, influyendo así en la protección contra enfermedades, el crecimiento de las plantas y el rendimiento (Hermosa *et al.*, 2012). Estos hongos

han demostrado mejorar los rendimientos de cultivos como el algodón, chile, limón, papa, berenjena, lechuga, trigo, cebada y las plantas ornamentales tuberosa (*Polyanthus tuberosa* L.), petunia (*Petunia hybrid* Vilm.) y amapola (*Papaver rhoeas* L.) (Zavala *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que *P. chlamydosporia* sola o usada en combinación con *Pseudomonas aeruginosa* aumentó la altura de las plantas de tomate en experimentos de campo (Siddiqui y Shaukat, 2003).

El tomate es una planta importante para la alimentación humana y se ha convertido en uno de los cultivos hortícolas más utilizados en el mundo (Zavala *et al.*, 2015). México es considerado el principal exportador de tomate fresco a nivel mundial, que se destinan principalmente a EEUU. El país exporta alrededor de 1.5 millones de toneladas anuales, que representan entre el 50 y 70% del volumen de producción (SHCP, 2014). De acuerdo con estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2016 el volumen de producción ascendió a 3.3 millones de toneladas, cifra que significa un crecimiento de 8.1% respecto del año previo, colocándose así como el 3er. cultivo con mayor valor económico en el país (SIAP, 2017).

*Theobroma cacao* (cacao), la fuente del chocolate, es un árbol tropical de sotobosque. Los árboles de cacao soportan una comunidad microbiana diversa que incluye muchos hongos endofíticos. Investigaciones recientes han identificado aislamientos de muchas especies de *Trichoderma* que son endofíticas en el cacao. En el cacao, las especies de *Trichoderma* se están estudiando principalmente por su capacidad para controlar enfermedades (Bae *et al.*, 2009). En México la superficie de cacao se extiende en Tabasco, Guerrero y Chiapas, teniendo un volumen de producción anual de 28 mil toneladas para 2015, ocupando el octavo lugar como productor a nivel mundial. En relación a comercio Exterior cabe decir que México exporta 39.4% del cacao producido a Estados Unidos, aunque también países europeos adquieren el grano mexicano (SIAP, 2016).

No obstante, y a pesar de los estudios de diversos microorganismos como agentes de control biológico, los mecanismos que pueden regular la promoción de

crecimiento a los cultivos por *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* permanecen como objeto de investigación. En principio, los estímulos propiciados por la combinación de estos dos hongos podrían ser similares a los ya documentados en otros microorganismos de la rizosfera. Por ello este estudio evaluara el efecto de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* en el crecimiento de plántulas de tomate y cacao.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Los hongos endófitos: diversidad y roles funcionales

Todas las plantas de los ecosistemas naturales son simbióticas con hongos micorrízicos y / o con hongos endófitos. Estos simbioses fúngicos pueden tener efectos profundos sobre la ecología, la aptitud y la evolución de las plantas, dando forma a las comunidades vegetales y manifestando fuertes efectos sobre la estructura comunitaria y la diversidad de organismos asociados (por ejemplo, bacterias, nematodos e Insectos).

A diferencia de los hongos micorrízicos que colonizan las raíces de las plantas y crecen en la rizósfera, las endófitas residen enteramente dentro de los tejidos de las plantas y pueden crecer dentro de las raíces, tallos y / o hojas, emergiendo para esporular a la senescencia de plantas o tejido huésped (Rodríguez *et al.*, 2009) .

### 2.2 *Pochonia chlamydosporia*

*Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams es un parásito facultativo de huevos y hembras de nematodos formadores de quistes y de nematodos agalladores. Se encuentra ampliamente distribuida y se ha desarrollado como agente de control biológico. El hongo puede proliferar en la rizosfera donde presumiblemente crece en exudados de la raíz de plantas, pero en presencia de los nematodos parásitos de las plantas puede cambiar su estado trófico y convertirse en un parásito de huevos de nematodos (Kerry y Hirsch, 2011).

### **2.2.1 Mecanismo de acción de *P. chlamydosporia* sobre nematodos**

El genoma de este hongo contiene genes que codifican enzimas hidrolíticas, tales como proteasas, glucosidasas y carboxiesterasas (Larriba *et al.*, 2014).

Las proteasas juegan un rol importante en la infección de las hembras y huevos de nematodos. *Pochonia rubescens* produce la serin proteasa P32 al infectar huevos de *Heterodera schachtii* (Lopez y Robertson, 1992), mientras que *P. chlamydosporia* produce la proteasa VCP1 al infectar huevos de *Meloidogyne incognita* (Segers *et al.*, 1996). Estas dos son los principales factores de virulencia en estos hongos (Larriba, *et al.*, 2012), secretadas durante la patogénesis de huevos de nematodos (Morton *et al.*, 2003) y se producen constitutivamente en los conidios en ausencia de huevos de nematodos (Lopez *et al.*, 2002).

Estudios recientes demuestran que la serin carboxipetidasa SCP1 de *P. chlamydosporia* posee elementos promotores similares a VCP1, lo que sugiere que la expresión de SCP1 está regulada por los mismos factores de transcripción que VCP1 y por esto también podría estar implicada en el parasitismo de huevos de nematodos (Larriba *et al.*, 2012). Se ha observado que la expresión de genes están sujetos a la regulación de carbono, nitrógeno y pH; y que la presencia de huevos de nematodos estimula la producción de VCP1 (Ward *et al.*, 2012).

### **2.2.2 Mecanismo endófitico de *P. chlamydosporia* con la planta.**

*P. chlamydosporia* puede sobrevivir en el suelo en ausencia de huevos de nematodos y entre variedades hay diferencias en su capacidad para colonizar las raíces de las plantas. También se ha demostrado que no tiene efectos adversos en el crecimiento de las plantas (De Leij y Kerry, 1991).

Recientemente, se detectó la expresión de las enzimas VCP1, P32 y de SCP1 durante la colonización endofítica de las raíces de cebada por estos hongos.

El hongo elicita defensas bioquímicas y estructurales de las plantas (Macia *et al.*, 2009, Escudero y Lopez, 2012) promoviendo el crecimiento radicular (Monfort *et al.* 2006, Zavala *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Estilo de vida de *P. chlamydosporia*

*P. chlamydosporia* tiene un estilo de vida tritrófico como parasito, saprótrofo y endófitico (Figura 2-1) puede habitar en el suelo de manera saprotrofica y colonizar el rizoplano (Larriba *et al.*, 2014). Se comporta como parasito infestando los huevos y hembras de nematodos. Y también puede vivir de manera endófitica colonizando la corteza pero no daña el sistema vascular de la raíz, promoviendo así su crecimiento y elicitando las defensas de las plantas. Este comportamiento multitrófico hace que *P. chlamydosporia* sea una herramienta potencialmente útil para enfoques de agricultura sostenible (Bordallo *et al.*, 2001, Macia *et al.*, 2009, Larriba, *et al.*, 2014).

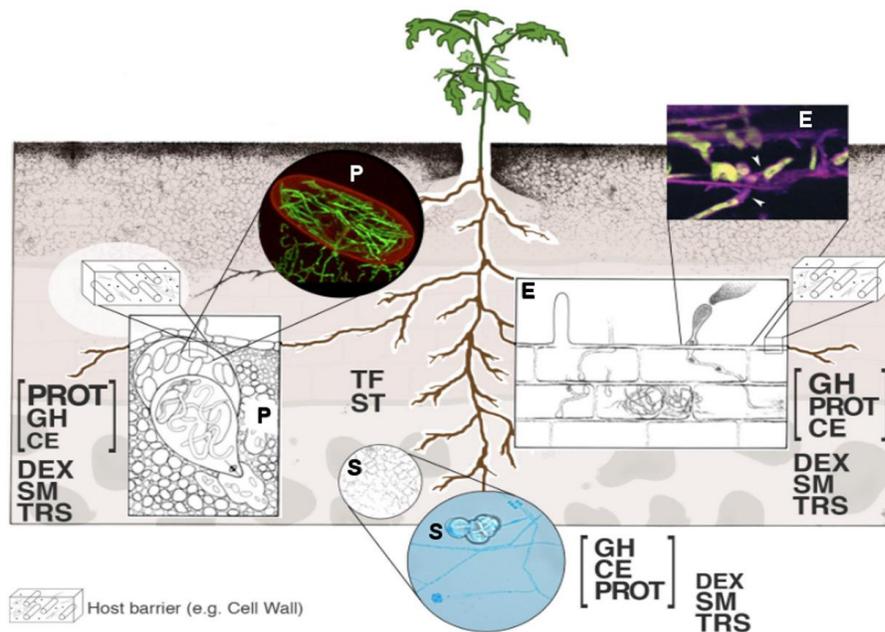


FIGURA 2-1. Estilo de vida tritrófico de *P. chlamydosporia*. P) se muestra a *P. chlamydosporia* parasitando huevos de *Meloidogyne javanica*, S) se muestra una clamidospora como las que se encuentran en el suelo (saprotrofo de suelos), E) se muestra a *P. chlamydosporia* colonizando endófiticamente raíces de cebada (Larriba *et al.*, 2014).

#### **2.2.4 Producción de enzimas extracelulares por diferentes aislamientos de *P. chlamydosporia***

Aunque en las actividades enzimáticas se utilizan sustratos artificiales, podrían imitar la respuesta de *P. chlamydosporia* cuando se encuentra en contacto con huevos de nematodos. Debido a que la primera capa de la cáscara de huevo del nematodo contiene principalmente proteína, las proteasas pueden ser las primeras enzimas segregadas por el hongo germinador, pero también se requieren a través del tiempo para degradar las capas media e interna de la cáscara de huevo que también contienen proteína, quitina y lípidos. En los hongos entomopatógenos, las proteasas son secretadas en las etapas iniciales de la infección, seguidas de quitinasas. La producción de exoquitinasas por Micopatógenos en la última etapa de la infección puede jugar un papel en la inhibición del desarrollo de otros competidores microbianos para quitina.

Esteves *et al.*, (2009) observaron que en la inducción de enzimas las quitinasas fueron las enzimas secretadas con mayor actividad específica, seguidas de esterases y proteasas. La capa de la cáscara de huevo que contiene la quitina es la más gruesa de las tres capas y es probablemente la razón por la que el hongo produce grandes cantidades de esta enzima. El papel de las esterases en la fisiología de este hongo no está claro.

Se ha detectado una alta actividad de esterasa en los filtrados de cultivo de *P. chlamydosporia* y en la enzima VCP1 pura. La enzima VCP1 es altamente activo en la hidrolización de ésteres de cadena corta (C4-C6) y medio (C7-C10). La capacidad de degradar tanto las cadenas largas como las cortas de ésteres puede reflejar la versatilidad nutricional de *P. chlamydosporia*. Se sabe que las esterases son importantes en los procesos metabólicos fúngicos y en la degradación del sustrato, pero su papel en la virulencia no ha sido investigado en hongos nematófagos. Además, una alta capacidad saprotrófica competitiva, una rápida germinación de esporas y una alta tasa de crecimiento pueden depender de una alta producción de enzimas extracelulares.

*P. chlamydosporia* puede no ser considerado un hongo con gran capacidad saprotrófica, ya que es un competidor débil en el suelo, sin embargo, debe producir enzimas para sobrevivir como un saprófito.

La selección de aislamientos para el biocontrol potencial de nematodos e insectos ha incluido estudios sobre la producción de enzimas. Pero parámetros como la virulencia, la capacidad saprotrófica y la producción de esporas deben ser considerados en la selección de potenciales agentes de biocontrol.

### 2.3 *Trichoderma*

*Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) es un género fúngico encontrado en muchos ecosistemas. Algunas cepas tienen la capacidad de reducir la gravedad de las enfermedades de las plantas al inhibir los patógenos de las plantas, principalmente en el suelo o en las raíces de las plantas, a través de su alto potencial antagónico y mioparasítico. La presencia de presas fúngicas y la disponibilidad de nutrientes derivados de raíces pueden haber sido los principales atractores de los antepasados de *Trichoderma* para establecerse en la rizosfera y facilitar la evolución de las interacciones positivas con las plantas. Se ha reportado el control de una amplia gama de patógenos vegetales, incluyendo hongos, oomicetos, bacterias y enfermedades virales, a través de la inducción por *Trichoderma* de la Resistencia sistémica inducida o resistencia localizada. Se ha demostrado que algunas cepas competentes de la rizósfera de *Trichoderma* tienen efectos directos sobre las plantas, aumentando su potencial de crecimiento y absorción de nutrientes, la eficiencia del uso de fertilizantes, el porcentaje y la velocidad de germinación de las semillas y la estimulación de las defensas contra el daño biótico y abiótico (Hermosa *et al.*, 2012).

### **2.3.1 *Trichoderma* spp. puede colonizar los espacios intercelulares de las raíces**

Las cepas de *Trichoderma* se encuentran en muchos ecosistemas de raíces.

De manera similar a la situación con las micorrizas, los polisacáridos altamente hidratados de la capa de mucilago secretada por las raíces y los mono y disacáridos excretados por las raíces de las plantas en la rizosfera estimulan el crecimiento de los hongos. Se ha observado que la sacarosa derivada de plantas es un importante recurso proporcionado a las células de *Trichoderma* para facilitar la colonización de las raíces, la coordinación de los mecanismos de defensa y el aumento de la tasa de fotosíntesis foliar (Vargas *et al.*, 2009).

Las cepas capaces de promover el crecimiento de las plantas y proporcionar protección contra las infecciones deben ser capaces de colonizar las raíces de las plantas. La colonización implica una capacidad para reconocer y adherirse a las raíces, penetrar en la planta y soportar metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión (Hermosa *et al.*, 2012).

En *Trichoderma*, la adherencia a la superficie de la raíz puede estar mediada por Enzimas, que son pequeñas proteínas hidrófobas de la capa externa de la pared celular que recubren la superficie celular de hongos, que se ha demostrado que apoya la colonización de las raíces de las plantas, posiblemente aumentando su fijación a la superficie de la raíz y protegiendo las puntas de hifas de los compuestos de defensa vegetal (Viterbo y Chet 2006).

### **2.3.2 Efectos beneficiosos de la interacción *Trichoderma*-planta**

La inmunidad y el desarrollo de las plantas están interconectados en una red de vías de liberación de hormonas (Pieterse *et al.*, 2009).

*Trichoderma* puede formar asociaciones endofíticas e interactuar con otros microorganismos en la rizósfera, influyendo así en la protección contra enfermedades, el crecimiento de las plantas y el rendimiento. La asociación planta-

microorganismo (Figura 2-2) implica el reconocimiento molecular entre los dos socios a través de una red de señalización mediada por las hormonas vegetales ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). JA y ET se han descrito como moléculas de transducción de señales para la resistencia sistémica inducida (ISR) debido al efecto de microorganismos beneficiosos, y la vía de transducción de señales a través de la acumulación de SA se encuentra en la resistencia sistémica adquirida (SAR) inducida por ataque de patógenos. Una característica común de las respuestas ISR a los microbios beneficiosos es el cebado para mejorar la defensa. En plantas cebadas, las respuestas de defensa no se activan directamente, sino que se aceleran al ataque de patógenos o insectos, resultando en una resistencia más rápida y fuerte al atacante encontrado (Van Wees *et al.*, 2008).

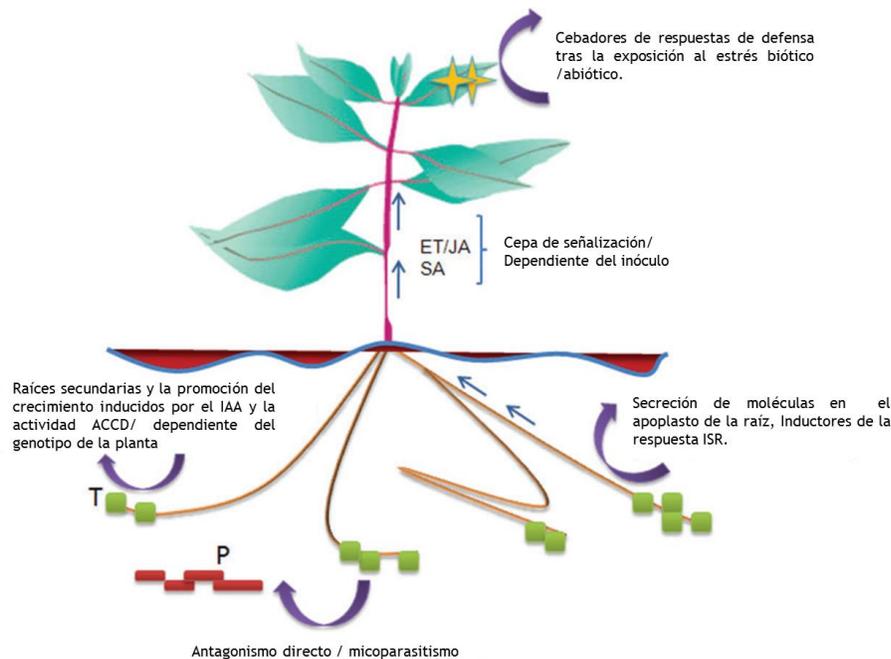


FIGURA 2-2. Representación esquemática de la señalización molecular de la planta de *Trichoderma* y de los efectos inducidos por las plantas. T, *Trichoderma*; P, patógeno; IAA, ácido indol -3- acético; ACCD, ACC desaminase; ET, etileno; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; ISR, resistencia sistémica inducida. (Hermosa *et al.*, 2012).

#### 2.4 Uso de Microorganismos endófitos en cultivos de interés económico.

Los siguientes estudios demuestran que diversos hongos endófitos presentan diversos beneficios, como la capacidad de promover el crecimiento y la protección frente a hongos fitopatógenos y nematodos parásitos en cultivos de interés económico.

Siddiqui y Shaukat (2003) ensayaron la cepa IE-6 de *Pseudomonas aeruginosa* y un antagonista de hongos, *Pochonia chlamydosporia*, para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento micelial de hongos infectantes de raíz en condiciones de laboratorio incluyendo *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Rhizoctonia Solani*. También se determinó la eficacia del control biológico de la bacteria y del hongo solos o en combinación para el control de hongos que infectan las raíces en condiciones de campo. Los experimentos de campo revelaron que *Pochonia chlamydosporia* y *P. aeruginosa* suprimieron significativamente los hongos infectantes de raíz *M. phaseolina*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani* y que la combinación de los dos causó una mayor inhibición de los patógenos fúngicos que solo. La aplicación de *P. chlamydosporia* y *P. aeruginosa* en el suelo también dio lugar a un mayor crecimiento de las plantas de tomate.

Gravel *et al.*, (2007) evaluaron *Pseudomonas putida* y *Trichoderma atroviride* para determinar su efecto promotor sobre el crecimiento de plantas de tomate sanas maduras cultivadas bajo condiciones hidropónicas. Se demostró que *P. putida* y *T. atroviride* mejoran los rendimientos de la fruta. Se investigó la producción o degradación del ácido indolacético (IAA) por los dos microorganismos como posibles mecanismos para la estimulación del crecimiento de las plantas. Tanto *P. putida* como *T. atroviride* produjeron IAA. *P. putida* y *T. atroviride* también aumentaron el peso fresco tanto de la rama como de las raíces de las plántulas de tomate crecidas en presencia de concentraciones crecientes de L-triptófano (hasta 0,75 mM).

Ambos microorganismos mostraron degradación parcial de IAA *in vitro* cuando se cultivaron en un medio mínimo con o sin sacarosa. Además, se investigó la capacidad de estos microorganismos para reducir el efecto deletéreo de IAA

exógeno utilizando plántulas de tomate. Los resultados mostraron que las raíces de plántulas de tomate crecidas en presencia de concentraciones crecientes de IAA (0–10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) fueron significativamente más largas cuando las semillas fueron tratadas previamente con *P. putida* o *T. atroviride*. La reducción del efecto perjudicial del IAA sobre el alargamiento de las raíces podría estar asociada con una reducción de la producción de etileno resultante de una disminución de su precursor ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por degradación microbiana de IAA en la rizósfera y / o por ACC desaminasa presente en ambos microorganismos.

De Souza *et al.* (2008) estudiaron el potencial endófitico de *Trichoderma stromaticum* tanto en los tejidos de brotes y raíces de cacao estéril y no estéril y plántulas de frijol. Demostraron que *T. stromaticum* es capaz de colonizar extensivamente tanto cacao como plantas de frijol cultivadas en condiciones estériles. Sin embargo, la colonización fue menor cuando las plantas crecieron en condiciones no estériles, especialmente en los tejidos de brotes. La colonización endófitica de plantas de cacao por *T. stromaticum* no dio lugar a la promoción del crecimiento de las plantas ni resistencia inducida contra *M. perniciosa* en plántulas que habían sido tratadas 30 días antes de la aplicación del patógeno. Estos resultados fueron confirmados por estudios de Northern blot, en los que el hongo no pudo alterar la expresión de genes seleccionados implicados en la defensa de las plantas, tales como *ChiB*, una supuesta clase VII de quitinasa, *Glu-1*, una putativa endo-1,4- $\beta$ -glucanasa, *Caf-1*, una supuesta sintasa de cafeína, y *Per-1* Apoplásico-Quiacol-peroxidasa, genes implicados en la regulación del crecimiento de las plantas *TcORFX-1* y *TcLhca-1* involucrados en la producción de energía.

Siddiqui y Akhtar (2009) estudiaron el efecto de *P. chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma harzianum*, y algunas rizobacterias promotoras de crecimiento solas o en combinación, para evaluar su efecto en el desarrollo de tomate y la reproducción de *M. incognita*. Aunque la combinación de tratamientos no mostró diferencias respecto al tratamiento testigo, las plantas inoculadas con *P. chlamydosporia* o *Paenibacillus polymyxa* fueron las que presentaron mayor

desarrollo vegetativo y, de igual forma, las que menor índice de agallas presentaron. Con ello se demostró que *P. chlamydosporia* es compatible con otros microorganismos y que puede promover el crecimiento de plantas de tomate.

Bae *et al.*, (2009) estudió el impacto del hongo endófitico DIS 219b de *Trichoderma hamatum* sobre la respuesta del cacao a la sequía. La colonización por DIS 219b retrasó los cambios inducidos por la sequía en la conductancia estomática, la fotosíntesis neta y las emisiones de fluorescencia verde. La sequía indujo un aumento en la concentración de muchos aminoácidos en las hojas de cacao, mientras que la colonización de DIS 219b causó una disminución en las concentraciones de ácido aspártico y ácido glutámico y un aumento en las concentraciones de alanina y ácido g-aminobutírico. Con o sin exposición a condiciones de sequía, la colonización por DIS 219b promovió el crecimiento de plántulas, siendo los efectos más consistentes un aumento en el peso fresco de raíz, peso seco de raíz y contenido de agua de raíz. Las plántulas colonizadas fueron más lentas a marchitarse en respuesta a la sequía, medida por una disminución en la caída del ángulo foliar. El principal efecto directo de la colonización del DIS 219b fue la promoción del crecimiento de las raíces, independientemente del estado del agua, y un aumento en el contenido de agua que se propone causó un retraso en muchos aspectos de la respuesta a la sequía del cacao.

Zhang, *et al.*, (2012) realizó experimentos en laboratorio y en invernadero y compararon la promoción del crecimiento del pepino por el mutante *Trichoderma harzianum* T-E5 versus el tipo salvaje SQR-T037 y los fertilizantes bio-orgánicos fortificados con ellos. El mutante T-E5 se seleccionó basándose en la producción de hormonas vegetales en fermentación líquida y luego los efectos de T-E5 y SQR-T037 para promover el crecimiento de plantas y colonización de raíces de plantas y suelo de rizósfera de pepino. Obteniendo como resultados que la producción de ácido indol-acético (IAA) por T-E5 se incrementó en un 30,2% en comparación con SQR-T037. El tratamiento con T-E5 aumentó estadísticamente la biomasa vegetal de pepino en experimentos hidropónicos y de suelo. Basándose en RT-PCR, la

población de T-E5 fue casi diez veces mayor que la SQR-T037 en las muestras de suelo a los 30 días. La colonización endófito de raíces y tallos por las dos cepas tuvo la misma tendencia dinámica, pero T-E5 fue mucho mayor que SQR-T037 en cualquier momento de muestreo. Concluyendo que el mutante T-E5 mejoró la producción de IAA y la capacidad de colonización de plantas, y esta mejora tiene un gran potencial para la posterior aplicación de T-E5 en la producción de cultivos.

Martínez *et al.*, (2014) probó si las alteraciones en la firma de fitohormona inducida por diferentes aislamientos *Trichoderma* corresponden con su capacidad de biocontrol y promoción del crecimiento y su actividad antagonista contra el patógeno vegetal *Fusarium oxysporum*. Observando que existe una fuerte asociación de la inducción de auxina con la estimulación del crecimiento de plantas por *Trichoderma*. Además, la capacidad protectora de las cepas de *Trichoderma* frente a la infección por *F. oxysporum* parece estar más relacionada con las alteraciones inducidas en el contenido de las hormonas abscísicas, etilénicas y de la transzatina ribosida que la actividad antagonista *in vitro* contra *F. Oxysporum*.

Zavala *et al.* (2015) analizó el efecto de nueve cepas de *P. chlamydosporia* en el crecimiento del tomate. Los experimentos se realizaron a diferentes escalas (placa de Petri, cámara de crecimiento y condiciones de invernadero) y etapas de desarrollo (plántulas, plántulas y plantas). Siete cepas de *P. chlamydosporia* significativamente aumentaron el número de raíces secundarias y seis de ellas aumentaron el peso total de las plántulas de tomate. Seis aislados de *P. chlamydosporia* también aumentaron el peso de las raíces de las plántulas de tomate. La colonización de las raíces varió entre los diferentes aislamientos de este hongo. *P. chlamydosporia* también aumentó significativamente el crecimiento de las raíces de las plantas de tomate bajo condiciones de invernadero y redujo los tiempos de floración y fructificación (hasta 5 y 12 días, respectivamente) frente a plantas de tomate no inoculadas. *P. chlamydosporia* aumentó el peso de frutos maduros en plantas de tomate. Se desconoce la base de los mecanismos para el crecimiento, la floración y la promoción del rendimiento en el tomate por el hongo. Sin embargo, se encontró que

*P. chlamydozporia* puede producir ácido indol-3-acético y solubilizar fosfato mineral. Estos resultados sugieren que las hormonas vegetales o la capacidad de nutrientes podrían desempeñar un papel importante. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia agronómica de *P. chlamydozporia* como agente de biocontrol de nematodos parásitos de plantas con capacidades de promoción del crecimiento del tomate.

## 2.5 Composición de las células de las plantas

De acuerdo a Shachs, (1875) la mayor proporción de células de plantas, (Las raíces jóvenes, las hojas y las frutas), se ven constituidas por tres capas: en primer lugar una piel externa, firme y elástica, la membrana celular o pared celular, constituida celulosa. Una segunda capa, cuya sustancia es blanda e inelástica, y que siempre contiene materia albuminosa, denominada protoplasma. La última capa, cuya sustancia es muy similar a la del protoplasma, el Núcleo, es la cavidad encerrada por el protoplasma, que se encuentra llena con un fluido acuoso, savia celular.

La sustancia de la pared celular es secretada por el protoplasma. La sustancia capaz de formar pared celular siempre consiste en una combinación de agua, celulosa y materiales incombustibles (constituyentes de cenizas), pero después puede sufrir cambios químicos adicionales. Surgen cambios químicos en la pared celular que nunca afectan a toda la planta, pero usualmente dividen la pared celular engrosada en capas concéntricas que difieren entre sí químicamente y físicamente. Estas diferenciaciones químicas, que siempre se combinan con una alteración de la propiedad física, muestran una gran variedad, pero pueden reducirse convenientemente a tres categorías; conversión en cutícula, lignificación y conversión en mucílago.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* en el crecimiento de plántulas de tomate y cacao.

#### 3.2 Objetivos específicos

Estudiar la producción de enzimas de *P. chlamydosporia* en diferentes sustratos inductores.

Evaluar la producción de IAA de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.*

Evaluar la capacidad de solubilizar fosfatos de *P. Chlamydosporia* y *Trichoderma spp.*

Evaluar el efecto de la combinación de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma* sobre el número de raíces secundarias y peso fresco de plántulas de tomate y cacao.

Observar si existen cambios en la estructura de la raíz de las plántulas de tomate.

.

## 4 MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Organismos utilizados

Se utilizaron en este estudio treinta cepas de *Trichoderma*; de las cuales 26 (VSL) provienen de la colección del Dr. Vladimir Sánchez López (Universidad de Papaloapan), FLM16 y FLM17 fueron obtenidos por el Dr. Federico López Moya (Universidad de Alicante), EZG47 fue aislado por el Dr. Ernesto A. Zavala González y NHG9 fue aislado por la IBQ. Natali Guadalupe Hernández González (Instituto Tecnológico de Veracruz). Por otro lado la cepa de *P. chlamydosporia* var. *Catenulata* fue proporcionado por el Dr. Luis Vicente López Llorca (Universidad de Alicante).

TABLA 4-1. Cepas de *Trichoderma* spp. y *P. chlamydosporia* utilizadas en este estudio.

| Cepa         | Genero  | Cepa    | Genero                          |
|--------------|---|---------|---------------------------------|
| Pcat         | <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> | VSL67   | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| EZG47        | <i>Trichoderma harzianum</i>                    | VSL 70  | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| FLM16        | <i>Trichoderma pseudokoningii</i>               | VSL 76  | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| <b>FLM17</b> | <i>Trichoderma citrinoviride</i>                | VSL 79  | <i>Trichoderma viride</i>       |
| NHG9         | <i>Trichoderma harzianum</i>                    | VSL 80  | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| VSL14        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 81  | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| VSL19        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 86  | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| VSL20        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 104 | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| VSL23        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL119  | <i>Trichoderma spiralis</i>     |
| VSL29        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL178  | <i>Trichoderma virens</i>       |
| VSL37        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 185 | <i>Trichoderma koningiopsis</i> |
| VSL47        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 188 | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| VSL57        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 190 | <i>Trichoderma virens</i>       |
| VSL58        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 214 | <i>Trichoderma</i> spp.         |
| VSL60        | <i>Trichoderma</i> spp.                         | VSL 217 | <i>Trichoderma koningiopsis</i> |
| VSL66        | <i>Trichoderma</i> spp.                         |         |                                 |

#### 4.2 Producción de Enzimas Hidrolíticas de *Pochonia chlamydosporia*.

Previo a la determinación de las actividades extracelulares; la cepa de *Pochonia chlamydosporia* fue resembrada en medio PDA e incubada a 25°C durante 7 días.

Posteriormente se inocularon 5 discos de 0.5 cm de diámetro a tubos falcón de 50 mL que contenían 25 mL de medio PDB, los tubos se incubaron durante 3 días a 25°C para permitir el desarrollo del micelio. Los medios agotados se separaron por decantación en condiciones asépticas y los pellets de hongos se aclararon con agua estéril para eliminar los residuos de medios. El micelio recuperado se inoculo en 50 mL de medio de inducción, con la fuente de carbono de acuerdo la actividad a caracterizar, con el fin de inducir cada una de las actividades enzimáticas

El medio inductor consistía en 6,0g KNO<sub>3</sub>, 1,5 g K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,5g KCl, 0.002g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.002g ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.002 g MgCl<sub>2</sub> 7H<sub>2</sub>O y 10g de fuente de carbono en 1L de agua destilada y el pH se ajustó a 5,0. Las fuentes de carbono utilizados fueron quitina, quitosano, caseína, Tween 20, carboximetilcelulosa (CMC), ácido poligalacturónico (APG).

Los matraces fueron incubados a 25 ° C y se recogieron muestras de 2 ml a 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36,42 h después de la inoculación. El experimento se realizó por duplicado. Las muestras se centrifugaron a 5000 g durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes de cada muestra se utilizaron para la determinación de la actividad enzimática (Torres y Ramirez, 2016).

#### 4.3 Actividad poligalacturonasa

Para la determinación de la actividad poligalacturonasa, se prepara una mezcla de reacción compuesta de 5 µL de sobrenadante, 5 µL de ácido poligalacturónico 0,5% (w / v) en tampón de 0.05M acetato de sodio (pH 5,5) y 90 µL de 0.05M de tampón de acetato de sodio (pH 5,5); se incuba en un baño de agua a 45°C durante 1 h. (Masoud y Jespersen, 2006). Se añade 100µL de DSN y se determinan azúcares reductores de acuerdo a Miller (1959). Pasar 150 µL de la mezcla de reacción a una microplaca y leerá 570nm en lector de microplacas (Benchmark Microplate Reader).

La actividad poligalacturonasa (PG) se determina mediante la estimación de las cantidades de grupos reductores de azúcar como se describe por Miller (1959). Se utiliza glucosa como un estándar (Apéndice C).

Una unidad de actividad PG se define como la cantidad de la enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores por min a 45°C.

#### **4.3.1 Actividad de endoglucanasa.**

El ensayo se realizó preparando en una microplaca una mezcla de reacción de 50 $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y 50 $\mu\text{L}$  de CMC al 1%. En condiciones similares y en la misma forma simultánea se prepara un blanco con agua. Las mezclas se incubaron a 50°C durante 30 min. Se añadieron 100 $\mu\text{L}$  del reactivo DNS para detener la reacción (Yun *et al.*, 2001). Pasar 150  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a una microplaca y leerá 570nm en lector de microplacas (Benchmark Microplate Reader). La actividad se determina mediante la estimación de las cantidades de grupos reductores de azúcar como se describe por Miller (1959). Se utiliza glucosa como un estándar (Apéndice D).

Una unidad de actividad de endoglucanasa (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores en un minuto

#### **Preparación del buffer de citrato de sodio pH 4.8**

Mezclar 23 mL de 0.1M de ácido cítrico y 27 mL de 0.1 M de citrato de sodio y ajustar el volumen final a 100mL. Después de diluir el buffer de citrato verifique y ajuste el pH si es necesario hasta que sea de 4.8.

#### **Preparación de la solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1%.**

Disuelva 10 g de carboximetilcelulosa de baja viscosidad en 1 L de buffer de citrato de sodio 50 mM pH 4.8, añadiendo el polvo lentamente con agitación continua. Refrigere la solución.

#### 4.3.2 Actividad $\beta$ -1,3-Glucanasa

Se utilizó el método de Nobe modificado en microplaca. Colocar 50 $\mu$ L de la solución de laminarina (0.5 mg/mL) en búfer citrato-fosfato pH 6.0 en un tubo Eppendorf. Calentar a 50°C durante 10 min. Posteriormente 50 $\mu$ L de extracto enzimático se agregan al sustrato. En condiciones similares y en la misma forma simultánea se prepara un blanco con agua. Se incuban ambas muestras durante una hora a 50 °C. Adicionar 100 $\mu$ L de la solución DNS y determine azúcares reductores de acuerdo a Miller (1959). Pasar 150  $\mu$ L de la mezcla de reacción a una microplaca y leerá 570nm en lector de microplacas (Benchmark Microplate Reader). Se utiliza glucosa como un estándar (Apéndice D).

La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto por mililitro de sobrenadante por minuto en las condiciones de la reacción (Nobe *et al.*, 2003).

#### Preparación del búfer citrato fosfato

Mezclar 17.9 mL de 0.1M de ácido cítrico y 32.1ML de 0.2 M de fosfato de sodio dibásico y se diluye a un total de 100mL. Se confirma que el pH sea 6.0, ajustar con ácido acético.

#### 4.3.3 Actividad quitinolítica

Para la determinación de la actividad quitinolítica se colocan en un tubo Eppendorf 50  $\mu$ L de una suspensión de quitina coloidal al 1.5% y se mezcla con 200 $\mu$ L NaOH al 1.0%. (Blanco). En otro tubo se adiciona 50  $\mu$ L de quitina coloidal al 1.5% y se pre-incubaron ambos tubos a 50°C durante 15 min.

Se retiran los tubos de incubación y se añade 50  $\mu$ L de la solución enzimática y se incuba por 1 h a 50°C. Se adiciona 200 $\mu$ L NaOH al 1.0% para detener la reacción.

Se centrifugan los tubos a 14 000 rpm por 3 min. (Monreal y Reese, 1969).

100µL del sobrenadante se le adicionan 100µL solución DNS para cuantificar azúcares reductores por el método de Miller (1959). Se construye una curva patrón utilizando glucosa como estándar (Apéndice E).

La unidad de actividad enzimática relativa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de N-acetilglucosamina, por minuto por mililitro en las condiciones de la reacción.

#### **4.3.4 Actividad quitosanasa.**

La actividad quitosanasa se ensayó por el método modificado en microplaca de W. Zhou *et al.* (2007) usando quitosano coloidal como sustrato.

La mezcla de reacción consistió en colocar en un tubo Eppendorf 90µL de 1% de quitosano coloidal en 50 mmol l<sup>-1</sup> de buffer de acetato de sodio (pH 5,5) y 10 µL de la solución de enzima. Se Incubo a 55°C durante 30 min Después se enfrió y se centrifugo para eliminar el quitosano insoluble.

100 µl de la mezcla de reacción se transfirió a un tubo y se añaden 100µL de DNS para cuantificar azúcares reductores por el método de Miller. 150 µl de la reacción se transfirieron a la microplaca. Se utilizó glucosa como estándar (Apéndice F).

La cantidad de enzima que produjo 1 µmol de azúcares reductores por minuto se tomó como una unidad.

#### **4.3.5 Actividad lipolítica**

La mezcla de reacción se llevó acabo en un tubo Eppendorf el cual consiste en 50µL del extracto enzimático, 400µL 0,05 M de buffer de fosfato (pH 8,0) y 50µL 0,01 M PNP-laurato en etanol. El tubo se incubo a 60°C durante 30 min, después de lo cual se añadió 125µL 0,1 M Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>.

La mezcla se centrifugo y 200µL de la reacción se adicionaron a un pocillo de microplaca y se determina la actividad a 420 nm (Nawani y Kaur, 2000). Se utilizó p-nitrofenol como estándar (Apéndice G).

Una unidad de actividad de la lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{g}$  de p-nitrofenol, de PNP-laurato como sustrato en 30 min en condiciones de ensayo estándar.

#### **4.3.6 Actividad proteolítica**

El ensayo se realizó preparando en un tubo Eppendorf una mezcla de reacción agregando 50  $\mu\text{L}$  de muestra y 100  $\mu\text{L}$  de solución de caseína al 1% se incubaron por 30 min a 37°C, para detener la reacción se adiciono 350  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico al 7% y se incubaron por 30 min a 5°C. Después del tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se lee la absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro (SmartSpec 3000). Se Interpolaron las absorbencia en una gráfica de tirosina cuya concentración varíe entre 0-6 mmol/mL.

Una unidad proteolítica está definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1  $\mu\text{g}$  de tirosina/min. (Kunitz, 1946)

#### **Preparación de las soluciones:**

##### **Buffer de glicina 0.2 M (pH 9)**

Mezclar 50 mL de glicina 0.1M y 8.8mL de hidróxido de sodio y ajustar el volumen a 200 mL con agua deionizada.

##### **Solución de caseína.**

En un matraz aforado agregar 1g de caseína y ajustar el volumen final a 100 mL con el buffer de glicina 0.2 M.

##### **Solución de la curva patrón.**

Pesar 18.1 mg de tirosina y disolver en 100 mL de buffer de glicina pH 9 (solución de tirosina 1 mM).

#### 4.4 Determinación de Ácido Indolacético (IAA)

El ensayo colorimétrico fue utilizado para evaluar la capacidad de los diferentes aislados de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* para producir IAA. Se utilizó el protocolo descrito por Tsavkelova *et al.*, (2007) con las siguientes modificaciones: En tubos con rosca de 15 mL, se inocularon  $1 \times 10^6$  esporas de cada aislado de *P. chlamydosporia* en 10 mL de caldo papa dextrosa (PDB), suplementado con 2 mg/mL de L-triptófano. Los tubos se incubaron durante 21 días en la oscuridad a 25°C y con agitación de 170 rpm. Transcurrido dicho tiempo, los tubos fueron centrifugados a 11000 rpm durante 5 min para remover el micelio.

Se tomaron 60  $\mu$ L de sobrenadante y se les añadieron 120  $\mu$ L de reactivo de Salkowski (50 mL de HClO<sub>4</sub> al 35%, 1 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.5M), se incubaron durante 30 min en la oscuridad. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos y el cambio de color de amarillo a rosa fue medido a 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas. La concentración de IAA fue estimada a partir de una curva estándar preparada mediante diluciones en serie de IAA (Sigma) en medio PDB. El experimento se realizó por duplicado.

#### 4.5 Detección de la solubilización de fosfatos

La solubilización de fosfato mineral por *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* se determinó en placas de Petri con medio NBRIP (10 g/L glucosa, 5 g/L Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5 g/L MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L KCl, 0.1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 g/L Agar pH 7) como describe Shekhar (Nautiyal 1999) . Las placas de Petri se inocularon en el centro con un fragmento de 5 mm de diámetro procedente del borde de una colonia de *P. chlamydosporia* o *Trichoderma* en PDB. Posteriormente, se incubaron a 25°C durante 2 días. La solubilización de fosfato se estimó mediante la fórmula (1-C/H), en donde C es el radio de la colonia y H el radio del halo de degradación (Zavala Gonzalez, *et al.* 2015). Se utilizaron dos placas por aislado y el experimento se realizó por duplicado.

#### 4.6 Evaluación del efecto de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* sobre el NRS y el peso fresco de plántulas de tomate y cacao.

De los resultados obtenidos en las determinaciones anteriores (producción de IAA) se seleccionaron un aislado de *Trichoderma spp.* altamente productora de IAA y una de baja producción. Quedando los experimentos como se muestra a continuación:

TABLA 4-2 Diseño de experimentos. Tratamientos en tomate y cacao

| Tomate      | Cacao       |
|-------------|-------------|
| Testigo     | Testigo     |
| Pcat        | Pcat        |
| VSL20       | VSL20       |
| VSL104      | VSL104      |
| Pcat- VSL20 | Pcat- VSL20 |
| Pcat- SL104 | Pcat- SL104 |

Todos los experimentos se realizaron utilizando semilla de tomate (*Solanum lycopersicum esculentum*) y cacao (*Theobroma cacao* L.). Para probar el efecto de los hongos sobre las primeras etapas de la planta, se llevaron a cabo ensayos de germinación de semillas en placas de Petri con medio MS, suplementado con 1,5% de Agar Bacteriológico (MCDLAB) Y 1% glucosa. Las semillas de tomate se desinfectaron superficialmente en hipoclorito de sodio al 1% con Tween 20 al 0,05% (Sigma) durante 10 minutos y luego se lavaron tres veces en agua destilada estéril como lo describe Zavala *et al.* (2015). Finalmente, se sembraron semillas de tomate sobre las cajas Petri. Después de 5 días de germinación, las placas con las plántulas se inocularon con las cepas de *P. chlamydosporia* y *Trichoderma spp.* Se incubaron entonces a 25 °C en la oscuridad durante 3 días y luego en una cámara de

crecimiento durante 5 días más a la misma temperatura y un fotoperiodo de 16/8 h (luz / oscuridad) como lo describe Zavala *et al.* (2015).

Las plántulas se retiraron de las placas 10 días después de la inoculación (Dai) y se registraron el número de raíces secundarias (NRS) y el peso total fresco (TFW) por planta. Se colocaron cuatro semillas de tomate por placa en medio de cultivo y se utilizaron placas sin hongo como controles. Se utilizaron tres placas por tratamiento y el experimento se llevó a cabo dos veces. Las raíces de tomate de todos los tratamientos se utilizaron para observar la colonización por microscopía óptica.

#### 4.7 Microscopía Óptica

Para este paso se recolectaron las muestras de los tratamientos anteriores y se siguió la metodología descrita por (Gherbi *et al.*, 2008) con modificaciones para la preparación de las muestras.

##### 4.7.1 Preparación de las muestras

Fijación: las muestras se fijaron con una solución de formaldehído al 10% durante 24 horas a 4°C. Después de haber transcurrido el tiempo de fijación se lavaron las muestras con agua destilada hasta eliminar los residuos de formaldehído.

Deshidratación: las muestras se colocaron en casetes y se deshidrataron haciéndose pasar por alcohol a diferentes concentraciones (Apéndice J).

Incrustación de tejido: posteriormente se sumergieron en paraplast 1 por 6 horas a 58°C y paraplast 2 durante 2 horas a 58°C.

Inclusión: Las muestras se colocaron en moldes metálicos de manera vertical y horizontal, y se añadió parafina caliente al molde desde el dispensador (Tissue Embedding center KD- BM II) y se dejaron solidificar durante 12 horas a temperatura ambiente. Cuando la cera se haya enfriado completamente y se endurece el bloque de parafina se retira del molde.

Seccionamiento: Los tejidos se seccionaron utilizando un micrótopo (Leica RM2235), se hicieron cortes de 5µm. Flotar los cortes en un baño de agua a temperatura de

38°C para extenderlos durante 1 minuto y se adhirieron a portaobjetos recubiertos con gelatina. Una vez colocados los cortes en los portaobjetos se pasaron a una incubadora (Felisa) a 58°C durante dos horas para iniciar con la desparafinación.

La Desparafinación se realizó de acuerdo a lo descrito en el apéndice

Tinción: los frotis se tiñeron con azul de toluidina al 0.1 % durante 30 segundos y safranina al 1% por 5 segundos, se enjuagan con agua destilada entre la aplicación de cada colorante. Las imágenes microscópicas de las raíces se observaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse Ti .

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Ensayos de actividad enzimática de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

Se realizaron los ensayos de actividad enzimática de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* inducidos en diferentes fuentes de carbono, como fue descrito en la metodología para cada una de las enzimas. Se prepararon las mezclas de reacción con los sobrenadantes obtenidos de la fermentación para cada uno de los carbohidratos usados y a cada uno de los tiempos considerados para el análisis. A continuación se detallan los resultados para cada actividad analizada.

#### 5.1.1 Sustrato 0.1% ácido poligalacturónico (APG)

Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de azúcares reductores (DNS). En la figura 5-1 se puede observar que existe un incremento de actividad poligalacturonasa con respecto al tiempo y que el APG a su vez induce enzimas proteolíticas. Los valores graficados son promedios obtenidos de 3 réplicas para cada punto de la cinética.

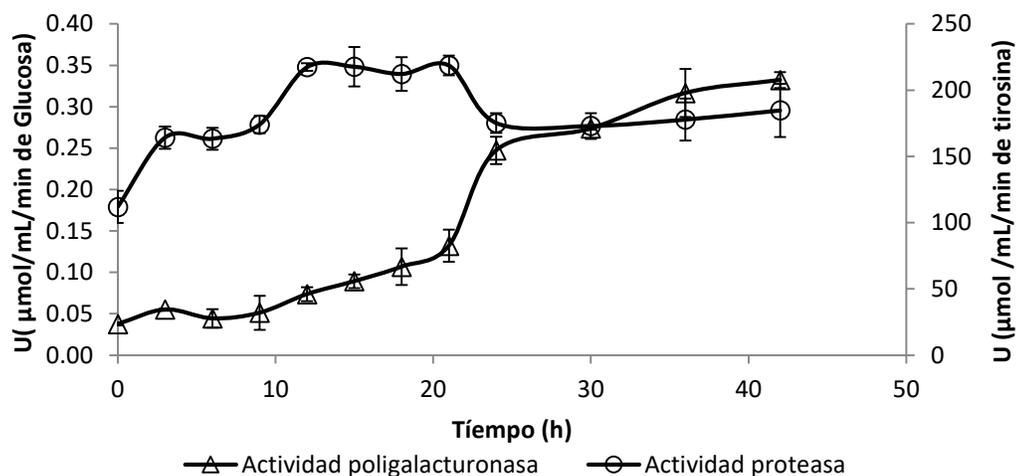


FIGURA 5-1 Actividad Poligalacturonasa y proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* (Pcat) que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de ácido poligalacturónico como fuente de carbono.

### 5.1.2 Sustrato 0.1% de carboximetilcelulosa (CMC)

Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de azúcares reductores (DNS) y son mostrados en la figura 5-2.

Se observó que *P. chlamydosporia* Pcat produce endoglucanasas y proteasa cuando es inducido en carboximetilcelulosa como fuente de carbono.

En la figura 5-2 se puede observar que existe un incremento de actividad endoglucanasa con respecto al tiempo y que el CMC a su vez induce enzimas proteolíticas.

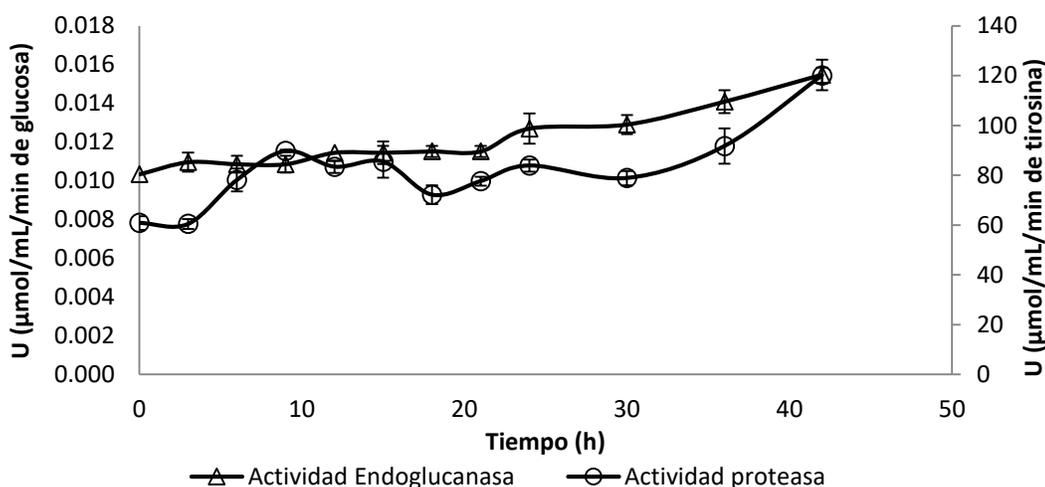


FIGURA 5-2. Actividad Endoglucanasa y Proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de carboximetilcelulosa, como fuente de carbono.

### 5.1.3 Sustrato laminarina 0.1%

Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de azúcares reductores (DNS) y son mostrados la figura 5-3.

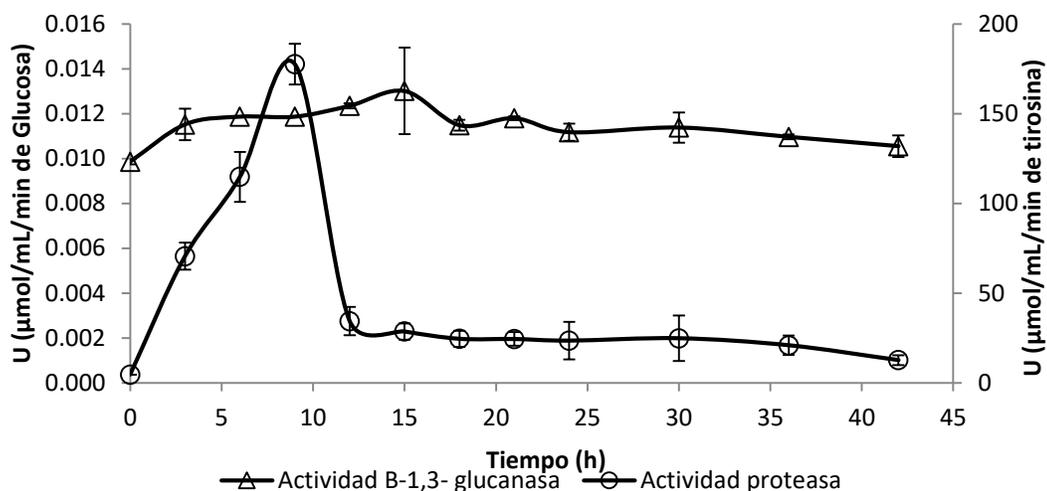


FIGURA 5-3. Actividad  $\beta$ -1,3- glucanasa y Proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de laminarina, como fuente de carbono.

#### 5.1.4 Sustrato Quitina 0.1%

Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de azúcares reductores (DNS) y son mostrados la figura 5-4

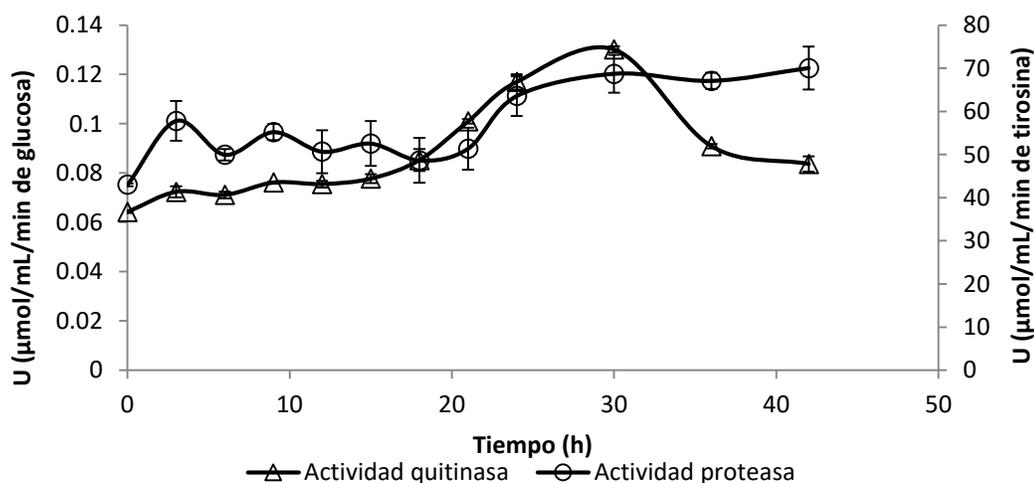


FIGURA 5-4. Actividad Quitinasas y Proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de quitina, como fuente de carbono.

### 5.1.5 Sustrato Quitosano 0.1%

Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de azúcares reductores (DNS).

En la figura 5-5 se puede observar la conducta de la actividad quitosanasa con respecto al tiempo y que a su vez el quitosano induce enzimas proteolíticas.

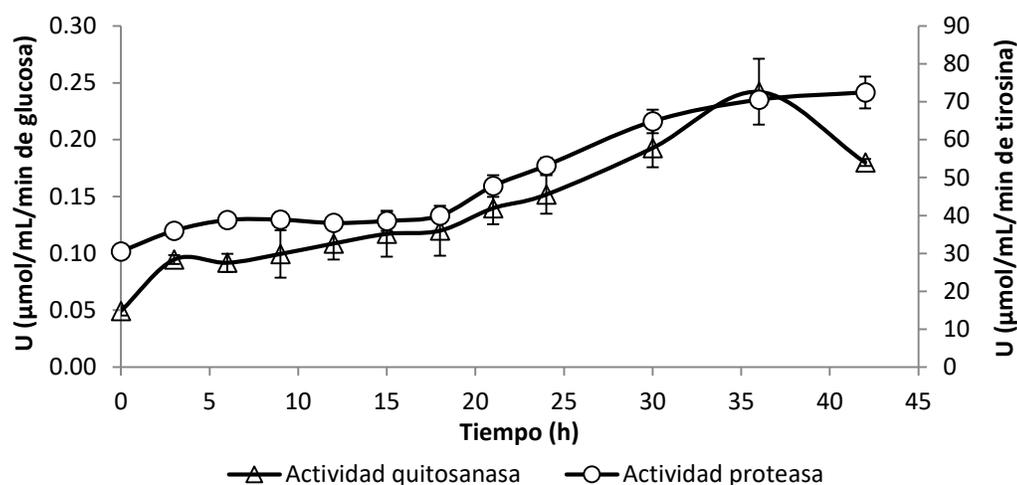


FIGURA 5-5. Actividad Quitosanasa y Proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de quitosano, como fuente de carbono.

### 5.1.6 Sustrato Tween 0.1%

Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de p-Nitrofenol y son mostrados en la figura 5-6.

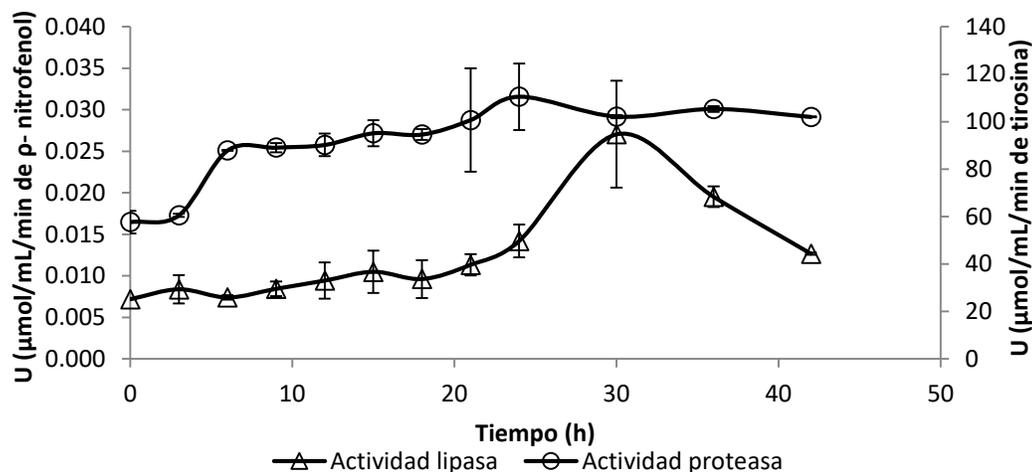


FIGURA 5-6. Actividad lipolítica y proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (v / v) de tween, como fuente de carbono.

### 5.1.7 Sustrato Caseína 0.1%

Se realizó el experimento de acuerdo a lo especificado en la metodología y las mezclas resultantes fueron medidas en un espectrofotómetro. Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de absorbencia para las reacciones de liberación de Tirosina y son mostrados en la figura 5-7.

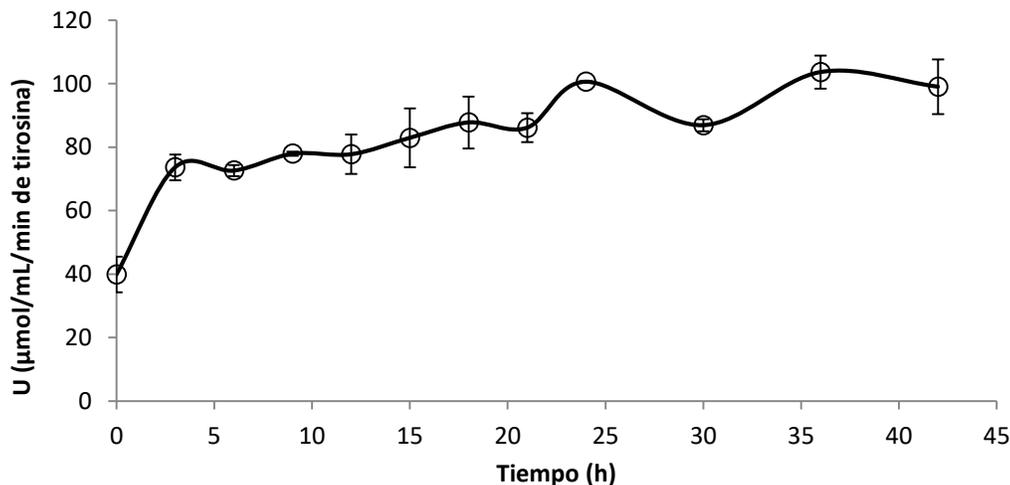


FIGURA 5-7. Actividad Proteasa determinada en sobrenadantes de cultivo de *Pochonia chlamydosporia* Pcat que crecen durante 42 h en medio mínimo suplementado con 0,1% (p / v) de caseína, como fuente de carbono.

En todos los medios inductores se observó la producción de enzimas proteolíticas, en la figura 5-8 se observan el comportamiento cinético de la producción de proteasas.

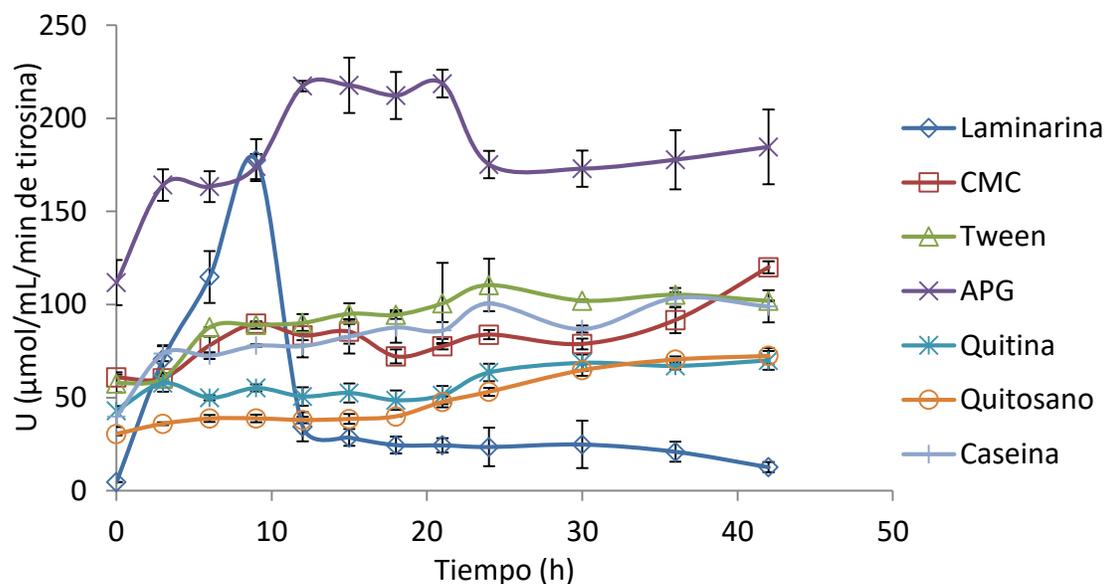


FIGURA 5-8. Comparación de la actividad proteasa en los diferentes medios inductores, como fuente única de carbono.

Se ha mostrado que la producción de enzimas extracelulares por *P. chlamydosporia* durante 42 h de crecimiento en medios líquidos variaron según la fuente de carbono (ácido poligalacturónico, carboximetilcelulosa quitina, quitosano, laminarina, caseína y Tween 20). De los experimentos de inducción, se reporta que *P. chlamydosporia* var. *Catenulata* produjo enzimas proteolíticas para cada uno de los sustratos evaluados.

En estos estudios se encontró que usar caseína inducía una menor actividad proteolítica que usando Acido poligalacturónico (Figura 10).

Rubio, *et al.*, (2008) encontraron que cuando se usa aceite de oliva como fuente de carbón para *T. harzanium* se inducen una mayor producción de cutinasas que usando cutina o pectina como fuente de carbono. Moreira, *et al.*, (2005) mostraron que el hongo fitopatogénico *Myrothecium verrucaria* producía una mayor

cantidad de proteasas cuando crecía sobre xilosa ( $45.9 \text{ U mg}^{-1}$ ), glucosa ( $81.4 \text{ U mg}^{-1}$ ), maltosa ( $58.1 \text{ U mg}^{-1}$ ), lactosa ( $89.0 \text{ U mg}^{-1}$ ) y aceite de oliva ( $69.55 \text{ U mg}^{-1}$ ) que cuando crecía sobre caseína ( $33.4 \text{ U mg}^{-1}$ ) u ovoalbúmina ( $43.4 \text{ U mg}^{-1}$ ).

Esteves *et al.*, (2009) reportaron que *Pochonia chlamydosporia* producía una mayor cantidad de proteasas al crecer sobre medio mínimo que al crecer sobre un medio que contiene gelatina.

De acuerdo con Larriba *et al.*, (2012) las proteasas VCP1 y P32 son los principales factores de virulencia en estos hongos secretadas durante la patogénesis de huevos de nematodos. López Llorca *et al.*, (2010) encontró que la proteasa VCP1 participa también en la fase endófitica del hongo.

Estos datos que hemos encontrado en las cinéticas de *P. chlamydosporia* var. *Catenulata* muestran que el hongo es capaz de producir enzimas específicas cuando crece en el medio correspondiente y que, además, también puede producir enzimas proteolíticas en presencia de sustratos que parecieran no ser naturalmente inductores de dicha actividad hidrolítica.

Las enzimas extracelulares, tales como las proteasas que son segregadas por *P. chlamydosporia* pudieran estar relacionadas con lo reportado por Lopez Llorca (2010) y Larriba (2012) que las proteasas participan en la vida triotrofica de *P. chlamydosporia* a pesar de la composición de los huéspedes sean diferentes. Aunque estos resultados no son suficientes para establecer los mecanismos de acción, aportan nueva información sobre la producción de enzimas en *P. chlamydosporia* y sugieren que los mecanismos que regulan el cambio trófico en este hongo son complejos y dependen de varios factores.

De acuerdo a los estudios de Rosso *et al.*, (2011) sobre el análisis de transcriptoma de *P. chlamydosporia* en presencia o ausencia de huevos de nematodos han revelado una reprogramación transcripcional significativa con diferencias en la expresión de genes específicos implicados en funciones metabólicas, transporte celular y desintoxicación.

## 5.2 Producción de IAA en PDB suplementado con triptófano

En este estudio, todos los aislados evaluados in-vitro, utilizando el triptófano como precursor, fueron capaces de sintetizar IAA (Tabla 3). Todos los aislados de presentaron diferentes capacidades para producirlo. La máxima producción la obtuvo el aislado VSL 20 (77,3  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido de VSL 14, VSL 19 y VSL 47 con una producción de 39,2, 37,9 y 37  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Esta capacidad ha sido ampliamente descrita en microorganismos promotores del crecimiento, entre los cuales se encuentran algunas bacterias y hongos endófitos.

TABLA 5-1. Producción de ácido Indolacético por diferentes aislados de *Trichoderma* spp. y *P. chlamydosporia*.

| Cepa   | $\mu\text{g/mL}$ de IAA | $\sigma$  | Cepa    | $\mu\text{g/mL}$ de IAA | $\sigma$  |
|--------|-------------------------|-----------|---------|-------------------------|-----------|
| VSL 14 | 39,2                    | $\pm 3,0$ | VSL 81  | 14,0                    | $\pm 1,4$ |
| VSL19  | 37,6                    | $\pm 7,3$ | VSL 86  | 9,5                     | $\pm 1,2$ |
| VSL 20 | 77,3                    | $\pm 5,9$ | VSL 104 | 7,8                     | $\pm 0,9$ |
| VSL 23 | 30,4                    | $\pm 2,1$ | VSL119  | 5,4                     | $\pm 1,3$ |
| VSL 29 | 18,0                    | $\pm 0,1$ | VSL178  | 4,7                     | $\pm 2,0$ |
| VSL 37 | 15,4                    | $\pm 2,9$ | VSL 185 | 12,3                    | $\pm 1,4$ |
| VSL 47 | 37,0                    | $\pm 2,4$ | VSL 188 | 35,8                    | $\pm 2,4$ |
| VSL57  | 20,9                    | $\pm 9,8$ | VSL 190 | 11,3                    | $\pm 1,2$ |
| VSL 58 | 7,6                     | $\pm 2,6$ | VSL 214 | 15,1                    | $\pm 1,6$ |
| VSL 60 | 6,3                     | $\pm 2,3$ | VSL 217 | 11,2                    | $\pm 0,2$ |
| VSL 66 | 12,7                    | $\pm 2,1$ | 9N      | 22,7                    | $\pm 2,5$ |
| VSL67  | 34,5                    | $\pm 1,1$ | Pcat    | 22,3                    | $\pm 2,4$ |
| VSL 70 | 8,8                     | 0,0       | EAZG47  | 14,6                    | $\pm 1,9$ |
| VSL 76 | 9,8                     | $\pm 0,2$ | F16     | 8,2                     | $\pm 0,2$ |
| VSL 79 | 15,7                    | $\pm 0,7$ | F17     | 3,4                     | $\pm 0,6$ |
| VSL 80 | 5,0                     | $\pm 0,5$ |         |                         |           |

Moncaleán *et al.*, (2002) indican que el aumento del crecimiento de las plantas se debe principalmente a los reguladores del crecimiento, el IAA. Cattelan *et al.*, (1999) y Tanimoto (2005) muestran que algunos microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas y que producen IAA pueden promover el alargamiento de las raíces y por lo tanto disparar el crecimiento.

Varios estudios han demostrado que la producción de hormonas por *Trichoderma* es clave para su capacidad de estimulación del crecimiento de las plantas y que el IAA tiene un efecto positivo en el desarrollo de los plantas.

Sin embargo, algunos informes publicados por otros autores (Zavala, 2015) mostraron una mayor cantidad de IAA que el presente estudio.

Diferentes especies de *Trichoderma*, diferentes medios de cultivo, la presencia y cantidad de triptófano podrían tener diferentes efectos sobre la cuantificación de IAA (Zhang *et al.*, 2012). Los resultados mostrados anteriormente pueden estar relacionados con el medio utilizado; por lo que no pueden ser comparados con otros estudios, sin embargo la producción de IAA puede ser comparado entre aislados.

### 5.3 Índice de solubilización de fosfatos

En este estudio, respecto a la solubilización de fosfato, no todos los aislados presentaron la capacidad de solubilizar el fosfato mineral en placas de Petri con medio de cultivo suplementado con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Solo los aislados VSL 47 y Pcat se pudo observar la capacidad de solubilizar el fosfato mineral.

Sin embargo la solubilización de fosfatos por Pcat difiere con lo reportado por Zavala (2015) esto puede deberse a que se utilizó un medio diferente descrito anteriormente.

TABLA 5-2. Índice de solubilización de fosfatos por diferentes aislados de *Trichoderma* spp. y *P. chlamydosporia*.

| Cepa          | 1-C/H              | Cepa        | 1-C/H              |
|---------------|--------------------|-------------|--------------------|
| VSL 14        | N S                | VSL 81      | N S                |
| VSL19         | N S                | VSL 86      | N S                |
| VSL 20        | N S                | VSL 104     | N S                |
| VSL 23        | N S                | VSL119      | N S                |
| VSL 29        | N S                | VSL178      | N S                |
| VSL 37        | N S                | VSL 185     | N S                |
| <b>VSL 47</b> | <b>0,25 ± 0,01</b> | VSL 188     | N S                |
| VSL57         | N S                | VSL 190     | N S                |
| VSL 58        | N S                | VSL 214     | N S                |
| VSL 60        | N S                | VSL 217     | N S                |
| VSL 66        | N S                | 9N          | N S                |
| VSL67         | N S                | <b>Pcat</b> | <b>0,39 ± 0,01</b> |
| VSL 70        | N S                | EAZG47      | N S                |
| VSL 76        | N S                | F16         | N S                |
| VSL 79        | N S                | F17         | N S                |
| VSL 80        | N S                |             |                    |

NS, no solubiliza. Solubilización de fosfato por diferentes aislados en el medio de crecimiento NBRIP del Instituto Botánico Nacional de Investigación Los datos son medias de tres repeticiones.

Nautiyal (2000) demostró que NBRIP tiene una eficiencia 3 veces mayor que el PVK. Los resultados indicaron que el criterio para la solubilización de fosfato basado en la formación de halo / zona visible en placas de agar no es una técnica fiable, ya que muchos aislamientos que no presentaban ninguna zona clara en placas de agar solubilizaban fosfatos inorgánicos insolubles en medio líquido. Se puede concluir que los microorganismos del suelo deben ser analizados en el ensayo de caldo NBRIP para la identificación de los solubilizadores de fosfato más eficientes.

#### 5.4 Efecto de los aislados de *Trichoderma* y *P. chlamydosporia* sobre el crecimiento de plántulas de tomate

De acuerdo a los resultados de producción de IAA se seleccionaron un aislado de *Trichoderma spp.* altamente productora de IAA y una de baja producción; y *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*.

Se evaluó la capacidad de la cepa VSL 20, VSL104, Pcat y la combinación de las especies de *Trichoderma* y *P. chlamydosporia* para promover el crecimiento en plántulas de tomate de 8 días después de la inoculación (ddi), sobre el Número de Raíces Secundarias (NRS).

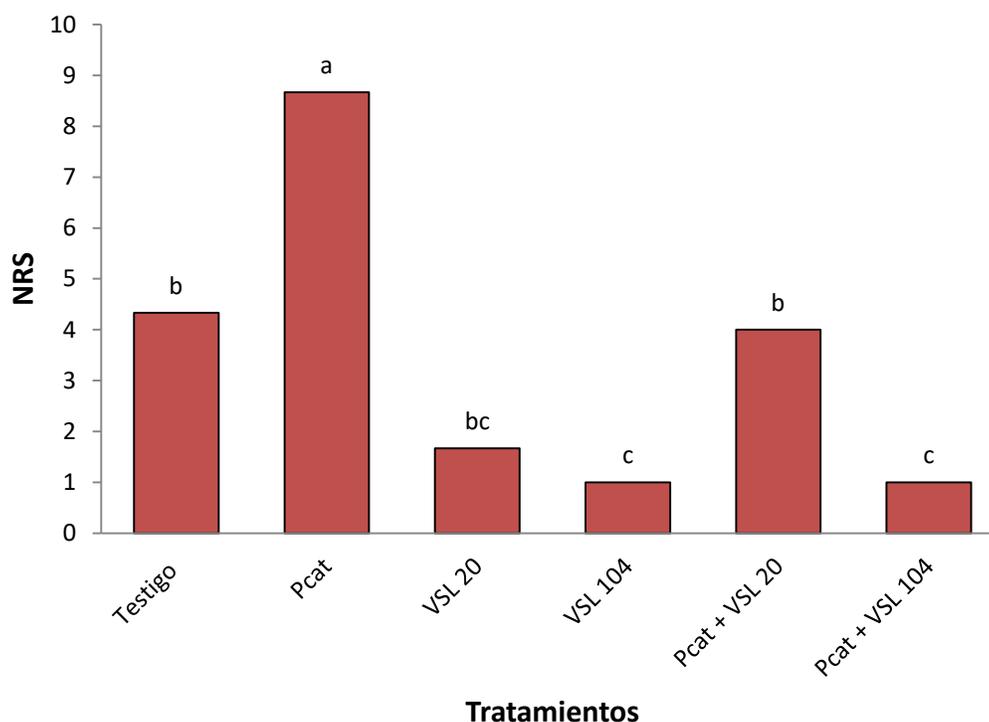


FIGURA 5-9. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el número de raíces secundarias (15 días después de la siembra) de plántulas de tomate. Los valores en las columnas indican la media de  $n=24$  plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P \leq 0,001$ .

Respecto al número de raíces secundarias, los resultados muestran que las plántulas inoculadas con el aislado Pcat, incremento significativamente ( $P < 0.001$ ) el

número de raíces secundarias respecto al tratamiento testigo (Figura 5-9), siendo este el que promovió el mayor desarrollo de raíces secundarias (el doble de raíces que el testigo). Por lo contrario, los aislados VSL 104 y la combinación con Pcat disminuyeron la formación de raíces secundarias a razón de 0.23 veces el número de raíces del tratamiento testigo. Las plántulas inoculadas con los aislados VSL 20 y en combinación con Pcat no presentaron diferencia significativa respecto a las plántulas testigo. En estos resultados se puede observar que *P. chlamydosporia* es un hongo mutualista que promueve el crecimiento de la parte aérea (incremento en peso fresco) y de la parte radicular (número de raíces secundarias) de las plántulas de tomate. La producción de un mayor número de raíces secundarias sugiere que existe algún estímulo similar a los ya documentados en otros hongos como *Trichoderma virens* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) o el endófito *Piriformospora indica* que incrementan el número de raíces secundarias de *A. thaliana* y de plantas ornamentales (Druege *et al.*, 2007). Otro mecanismo involucrado es la producción de auxinas (IAA), estas fitohormonas están involucradas en diferentes etapas del desarrollo de las plantas como son la germinación y el desarrollo de raíces secundarias (Tsavkelova *et al.*, 2007).

Rodríguez *et al.*, (2007) mencionan que los hongos endófitos presentan diferentes estilos de vida que van desde parásitos a mutualistas, algunos hongos pueden presentar ambos estilos de vida dependiendo del huésped al que colonizan o de las condiciones ambientales. Este efecto se observa en los resultados obtenidos en este estudio, debido a que en condiciones con limitaciones de nutrientes algunos de los aislados utilizados disminuyeron el crecimiento o peso fresco de las plántulas de tomate, mostrando un comportamiento parasítico.

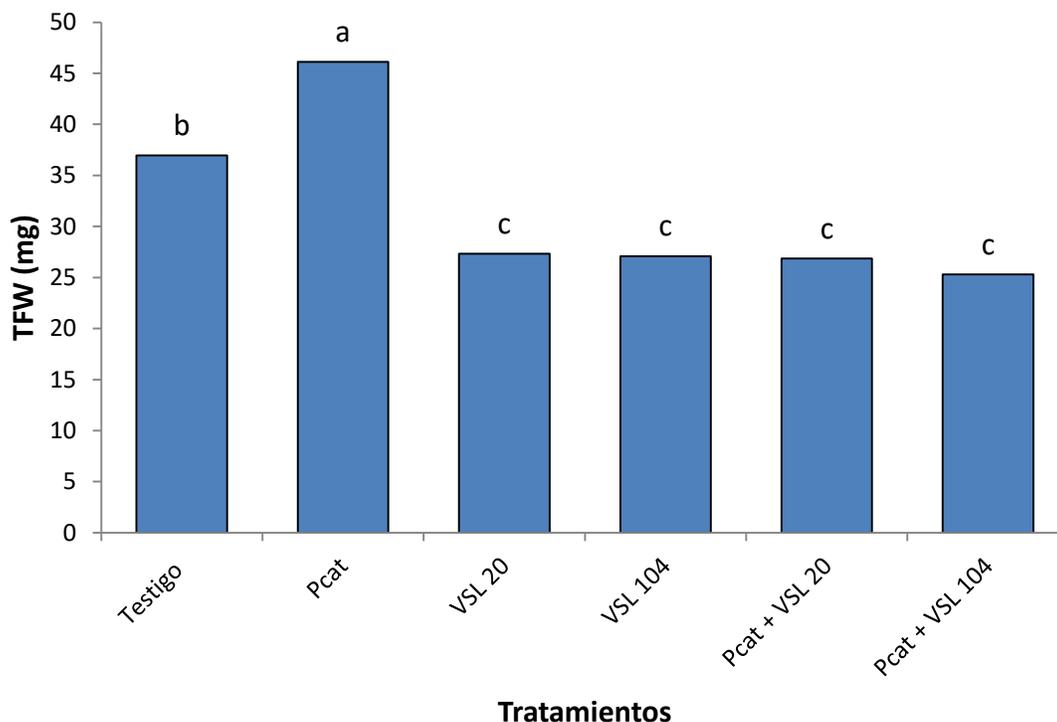


FIGURA 5-10. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso fresco total de raíces secundarias 15 días después de la siembra (dds) de plántulas de tomate. Los valores en las columnas indican la media de  $n=24$  plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P \leq 0,001$ .

El aislado Pcat por si solo incremento el peso fresco de las plántulas de tomate con respecto a las plántulas testigo con un nivel de significancia  $P < 0.0001$  (Figura 5-10). Mientras que los aislados VSL 20 y VSL 104, y la combinación de estos con Pcat disminuyeron el crecimiento o peso fresco de las plántulas de tomate, mostrando un comportamiento parasítico. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos con los aislados VSL20, VSL104, VSL20 + Pcat y VSL104 +Pcat. . Zavala *et al.*, (2015) reporta que las plántulas inoculadas con Pcat no mostraron diferencias significativas en el peso fresco respecto al testigo.

### 5.5 Efecto de los aislados de *Trichoderma* y *P. chlamydosporia* sobre el crecimiento de plántulas de cacao

Se evaluó la capacidad de la cepa VSL 20, VSL104, Pcat y la combinación de las especies de *Trichoderma* y *P. chlamydosporia* para promover el crecimiento en plántulas de cacao de 8 ddi.

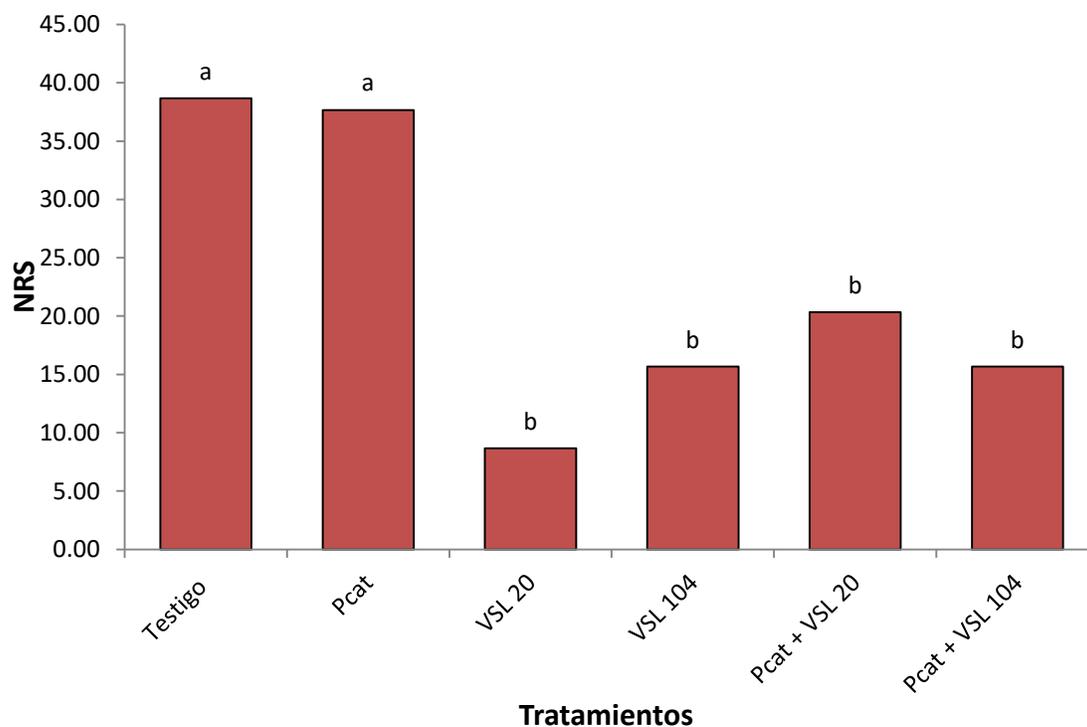


FIGURA 5-11. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el número de raíces secundarias (13 días después de la siembra) de plántulas de cacao. Los valores en las columnas indican la media de  $n=24$  plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P \leq 0,001$ .

Con respecto al número de raíces secundarias, los resultados muestran que no hubo incremento el número de raíces secundarias respecto al tratamiento testigo, por el contrario, los aislados VSL 20 y VSL 104 y la combinación con Pcat disminuyeron la formación de raíces secundarias.

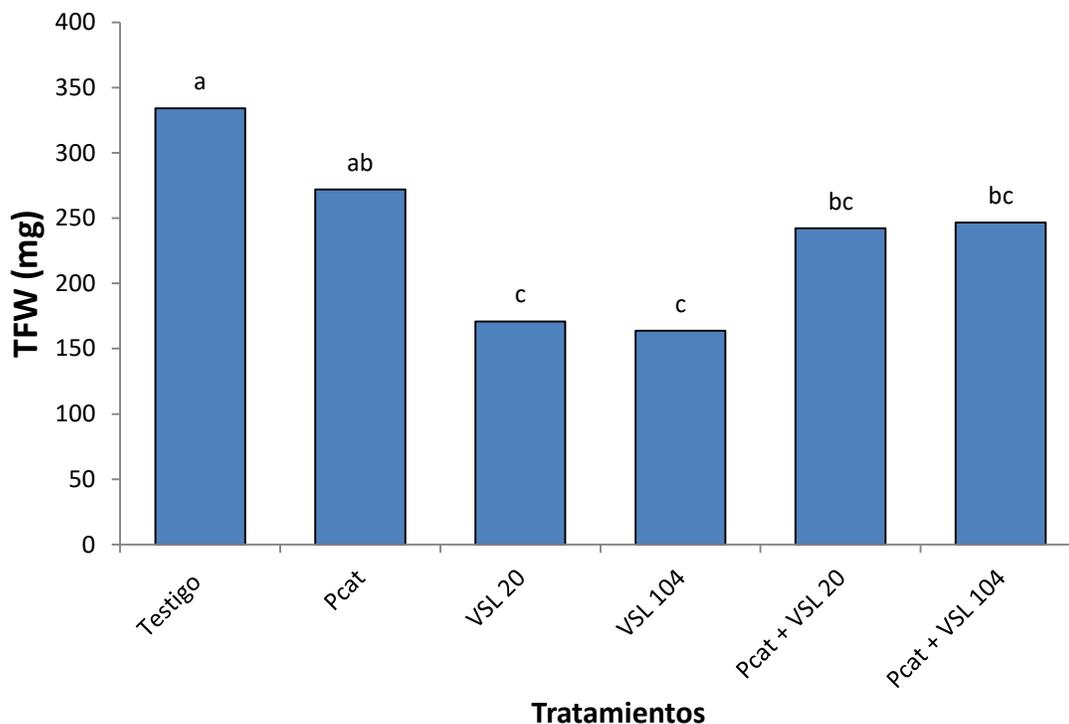


FIGURA 5-12. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso fresco total (13 días después de la siembra) de plántulas de cacao. Los valores en las columnas indican la media de  $n=24$  plántulas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P \leq 0,001$ .

Del mismo modo que el NRS se observó que Pcat no aumentó el TFW de las plántulas de cacao con respecto a las plántulas testigo. Mientras que los aislados VSL 20 y VSL 104, y la combinación de estos con Pcat disminuyeron el crecimiento o peso fresco de las plántulas de cacao, mostrando un comportamiento parasítico. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos con los aislados VSL20, VSL104, VSL20 + Pcat y VSL104 +Pcat.

De acuerdo a Sharon *et al.*, (2011) la competencia entre *Trichoderma* y otros microorganismos podría interferir con la colonización de las raíces y los procesos de biocontrol. También se ha demostrado la sinergia entre los hongos micorrízicos y *Trichoderma*. Las mezclas de diferentes agentes de biocontrol colonizadores de las raíces pueden proporcionar mejores resultados que cualquier otro agente utilizado

por su cuenta. Sin embargo, las capacidades de las combinaciones de microorganismos beneficiosos para colonizar las raíces para mejorar el rendimiento de las plantas han sido examinadas inadecuadamente en ecosistemas manejados o naturales.

Podría decirse que las interacciones de diferentes aislados de *Trichoderma* con otros organismos y microorganismos en los sistemas ecológicos y los posibles efectos sobre los procesos de biocontrol y endofitismo no han sido profundamente investigados.

### 5.6 Micrografías de plántulas de tomate

Para verificar la colonización de la raíz, las raíces fueron visualizadas utilizando microscopía óptica. Los resultados muestran que los microorganismos fueron capaces de penetrar las raíces de tomate sin causar modificaciones en la estructura.

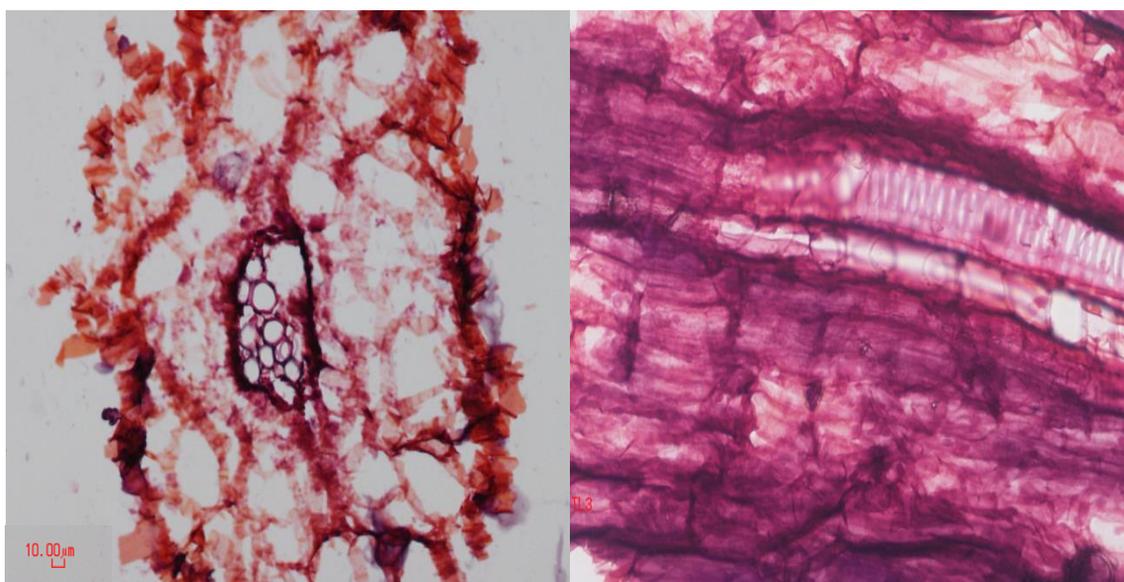


FIGURA 5-13 Fragmento de raíz de tomate sin tratamiento. Se observan las estructuras de la raíz intactas. Esto nos sirve para observar algún cambio estructural debido a la colonización por los hongos endófitos. Tamaño de escala, 10  $\mu\text{m}$ .

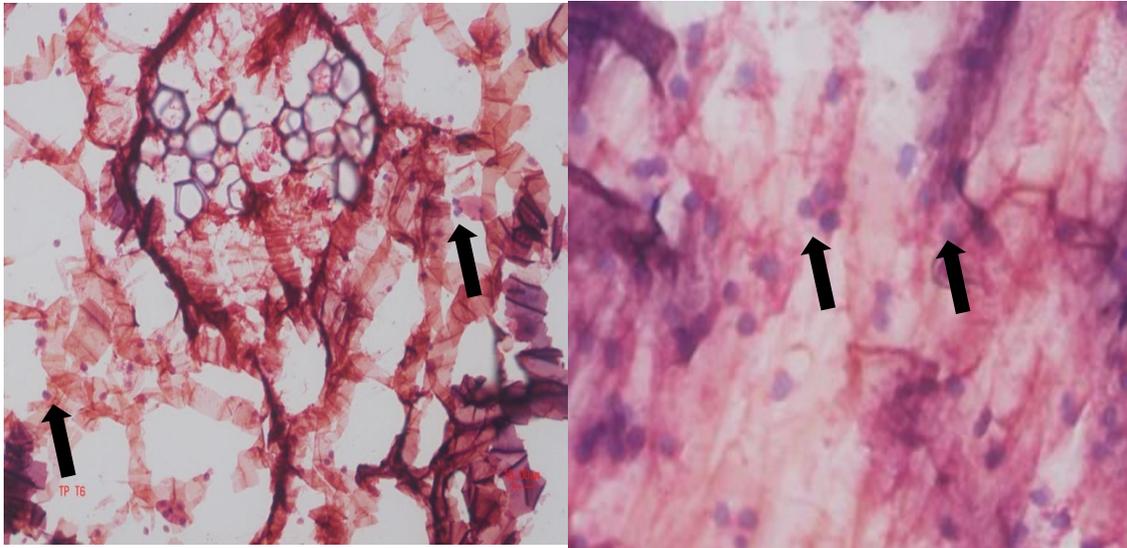


FIGURA 5-14 Fragmento de raíz de tomate 8 días después de la inoculación con *P. chlamydosporia* (Pcat) Las flechas indican la aparición de clamidosporas en el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10  $\mu$ m.

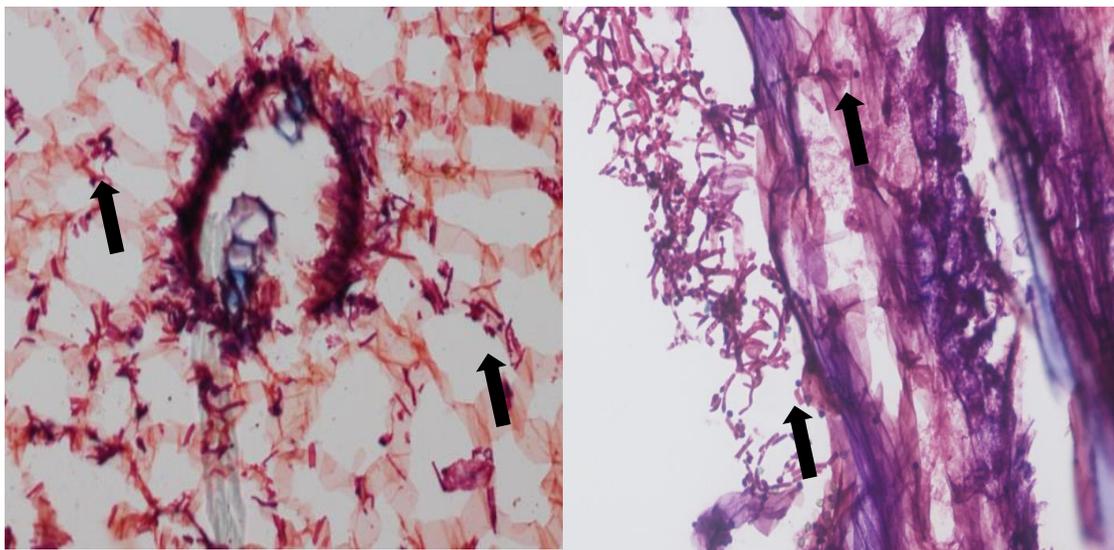


FIGURA 5-15 Fragmento de raíz de tomate 8 días después de la inoculación con *Trichoderma* spp. (VSL20). Las flechas indican la aparición de hifas y esporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10  $\mu$ m.

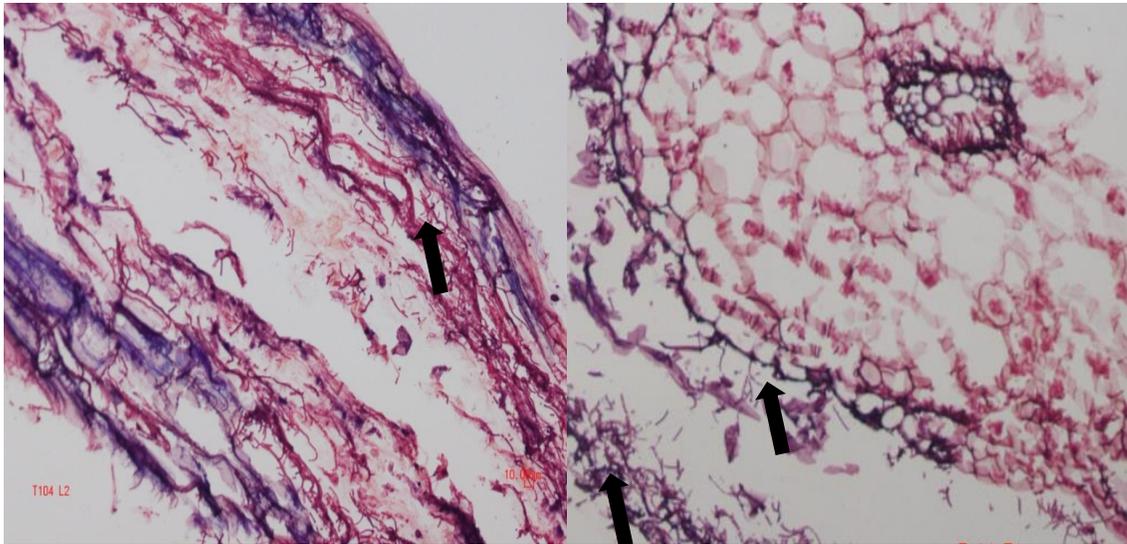


FIGURA 5-16 Fragmento de raíz de tomate 8 ddi con *Trichoderma spp.* (VSL104). Las flechas indican la aparición de hifas y esporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 µm.

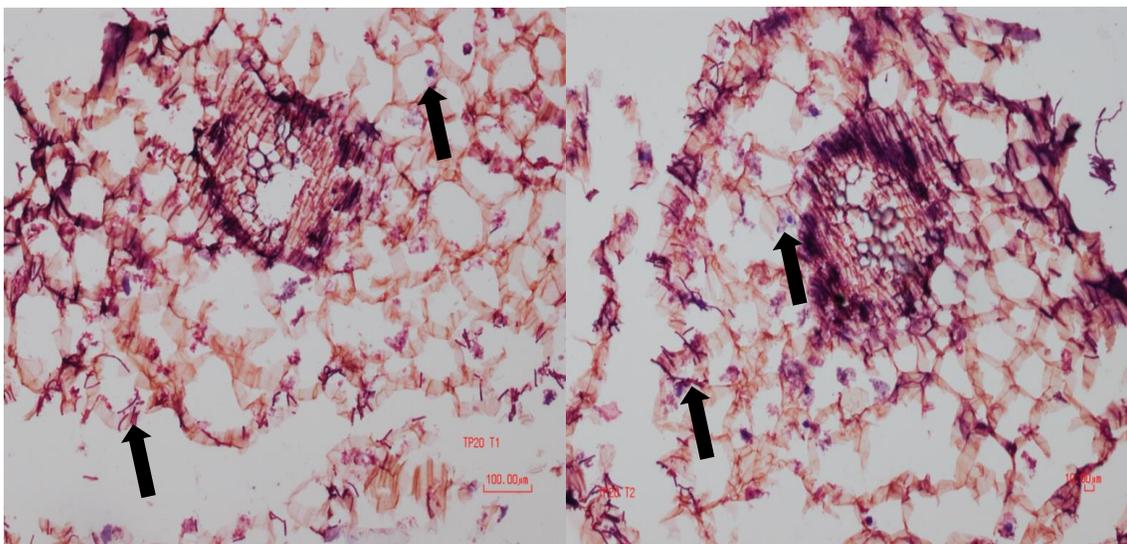


FIGURA 5-17 Fragmento de raíz de tomate 8 ddi con *Trichoderma spp.* (VSL20) y *Pochonia chlamydosporia* (Pcat). Las flechas indican la aparición de hifas, esporas y clamidosporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 µm.

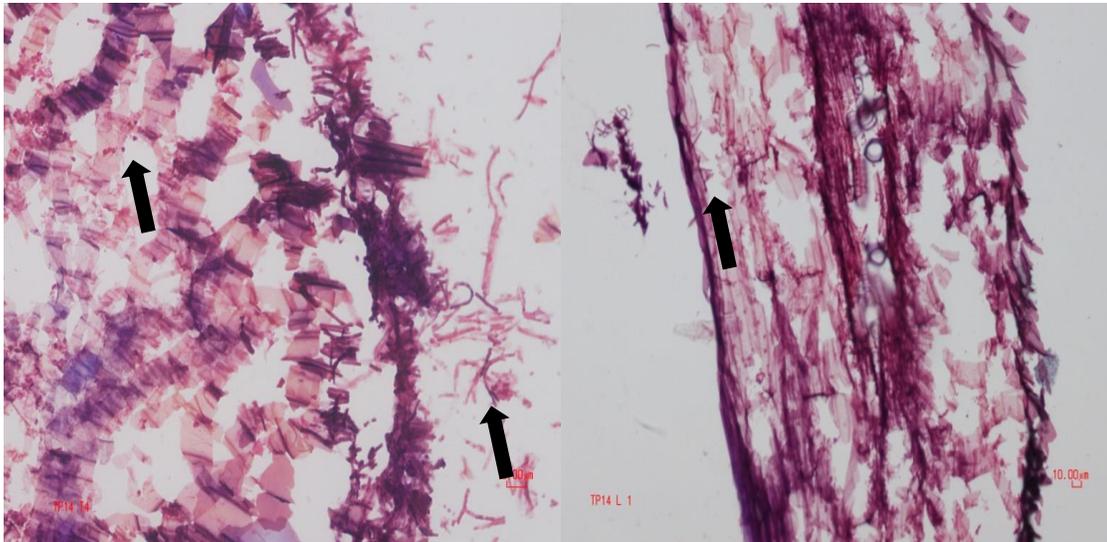


FIGURA 5-18 Fragmento de raíz de tomate 8 ddi con *Trichoderma spp.* (VSL104) y *Pochonia chlamydosporia* (Pcat). Las flechas indican la aparición de hifas, esporas y clamidosporas en la superficie y el interior de la raíz. Tamaño de escala, 10 µm.

Estudios previos demostraron que estos microorganismos pueden colonizar las raíces de plantas. *P. chlamydosporia* coloniza las raíces de cebada y tomate endofíticamente, lo que podría ser un instrumento para promover el crecimiento de las plantas (Macía *et al.*, 2009, Zavala *et al.*, 2015). La inoculación de *T. virens* aumenta la respuesta de auxina en las plántulas de *Arabidopsis* (Contreras *et al.*, 2009). Otros estudios han demostrado que estos microorganismos son capaces de colonizar endofíticamente las raíces de diversas plantas (Bordallo *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2008, Contreras, *et al.*, 2009, Hermosa, *et al.* 2012)

En este trabajo, se demuestra que *P. chlamydosporia* y los aislados de *Trichoderma* fueron capaces de colonizar las raíces de plántulas de tomate, lo cual sugiere que son endófitos de la planta.

## 6 CONCLUSIONES

En base a los resultados de actividades enzimáticas se concluye de manera general que *P. chlamydosporia* produce enzimas poligalacturonasas, endoglucanasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, quitosanasas, lipasas y proteasas que constituyen enzimas líticas que pudieran tener un papel importante en el endofitismo.

Durante la inducción de enzimas se observó se observa que hubo producción de Proteasas en los diferentes medios inductores.

No todas las cepas del genero *Trichoderma* son productoras potenciales de IAA. La cepa que tuvo mayor producción fue la VSL20.

La ausencia del halo en el medio de cultivo sólido en las cepas del genero *Trichoderma*, parece indicar que no fueron capaces de solubilizar, solo la cepa VSL 47 y Pcat se pudieron observar halos de solubilización. Se recomienda realizar las determinaciones en medio líquido.

Para las condiciones del ensayo para evaluar el efecto sobre el crecimiento, solo la planta de tomate inoculada con Pcat muestra una relación positiva en el incremento de NRS y peso con respecto al testigo.

No se vieron beneficiadas las plántulas de tomate tratadas con VSL 20 y VSL104, por el contrario se redujeron la cantidad de NRS con respecto al testigo.

La combinación de las cepas *Trichoderma* con *P. chlamydosporia* no tienen efecto sobre el número de raíces secundarias y peso de plantas de tomate.

Para el caso del cacao no se observó un incremento en el NRS y el peso en ninguno de los tratamientos por lo tanto ninguno de los tratamientos tuvo efecto benéfico en las plantas.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Antoun, H. y Prévost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. pp. 1-38. En “*PGPR: Biocontrol and Biofertilization*”, (Ed. Z. A. Siddiqui). Springer, India.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L. y Bailey, B. A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* **60** (11): 3279–3295.
- Bordallo, J. J., Lopez, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J., Persmark, L. y Asensio, L. 2001. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist* **154**: 491-499.
- Cattelan, A. J., P. G. Hartel, y Fuhrmann, J. J. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* **63**: 1670–1680.
- Contreras, H. A., Macias, L., Cortés, C., López, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **149**(3): 1579-1592.
- De Leij, F. A. A. M., y Kerry, B. R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue nematol* **14**: 157-164.
- De Souza, J.T.; Bailey, B.A.; Pomella, A.W.V.; Erbe, E.F.; Murphy, C.A.; Bae, H.; Hebbar, P.K. 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control* **46** 36–45.
- Druege, U., Baltruschat, H. Franken, P. 2007. *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Scientia Horticulturae*, 112(4), 422-426.
- Escudero, N. y Lopez L. V. 2012. Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis* **57**(1): 33-42.
- Esteves, I. , Peteira, B., Atkins, S. D., Magan, N. y Kerry, B. R. 2009. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological research* **113**: 867 – 876.

- Gherbi, H., Markmann, K.; Svistoonoff, S., Estevan, J., Autran, D., Giczey, G., Auguy, F., Péret, B., Laplaze, L., Franche, C., Parniske, M., Bogusz, D. 2008. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankia bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (12): 4928–4932.
- Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 1968–1977.
- Moreira, F. G., Reis, S. D., Ferreira, M. A., De Souza, C. G. M. y Peralta, R. M. 2005. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium Verrucaria* in submerged cultures. *Brazilian Journal of Microbiology* **36**: 7-11.
- Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y., Zhang, L.X. y Sun, P.H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, **29**: 66–72.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, **158**: 17–25.
- Kerry, B. R. y Hirsch P. R. 2011. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the Rhizosphere at the Population, Whole Organism and Molecular Scales. pp. 171-182. En “Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular mechanisms”, (Ed. Davies K. G. y Spiegel Y.) Springer, London.
- Kokalis, N., Vavrina, C.S., Roskopf, E.N. y Shelby, R.A. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil*, **238**: 257–266.
- Kunitz, M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *The Journal of General Physiology*: 291-310.
- Larriba, E., Nieto, J. M. y Lopez, L. V. 2012. Gene cloning, molecular modeling, and phylogenetics of serine protease P32 and serine carboxypeptidase SCP1 from nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia*. *Canadian Journal of Microbiology* **58**: 815–827.
- Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Carbonell, J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, J., Martín, J., Lopez, L. V. 2014. Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology* **65**: 69–80.
- Lopez, L. V., Olivares, C., Salinas, J., Jansson, H. B. y Kolattukudy, P. E. 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycological Research* **106** (4): 499-506.

- Lopez Llorca, Luis Vicente, y Walter M. Robertson. 1992. Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. *Experimental mycology* **16** , 261-267.
- Macia, J. G., Rosso, L.C., Ciancio, A., Jansson, H. B. y Lopez L.V. 2009. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology* **155**, 391-401.
- Martínez, A., Alguacil, M. D. M., Pascual, J. A., y Van Wees, S.C.M. 2014. Phytohormone Profiles Induced by *Trichoderma* Isolates Correspond with Their Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity on Melon Plants. *Journal of Chemical Ecology* **40**, 804–815.
- Masoud, W. y Jespersen, L. 2006. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa." *International Journal of Food Microbiology* **110**, 291–296.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.
- Moncaleán, P., Rodríguez, A., y Fernández, B. 2002. Plant growth regulators as putative physiological markers of developmental stage in *Prunus persica*. *Plant Growth Regulation*, 2002: 1–3.
- Monfort, E., Lopez, L. V., Jansson, H. B. y Salinas, J. 2006, In vitro soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. *Mycological Progress* **5** (1): 18-23.
- Monreal, J. y Reese, E. T. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*. **15**, 689-696.
- Morton, C. O., Hirsch, P. R., Peberdy, J. P. y Kerry, B. R. 2003. Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research* **107** (1): 38-46.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 265-270.
- Nawani, N.y Kaur, J. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry* **206**, 91–96.
- Nobe, R., Sakakibara, Y., Fukuda, N., Yoshida, N., Ogawa K., and Suiko, M. "Purification and characterization of laminaran hydrolases from *Trichoderma viride*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (2003): 1349-1357.
- Nobe, R., Sakakibara, Y., Fukuda, N., Yoshida, N., Ogawa K. y Suijo, M. 2003. Purification and characterization of laminaran hydrolases from *Trichoderma viride*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1349-1357.

- Pieterse, C.M.J., Leon, A., Van der Ent, S. y Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**, 308–316.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E. y Redman, R. S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**, 314–330.
- Rosso, L.C, Finetti, M.M., Hirsch, P.R., Ciancio, A., Kerry, B.R. y Clark, I.A. 2011. Transcriptome analysis shows differential gene expression in the saprotrophic to parasitic transition of *Pochonia chlamydosporia*. *Applied Microbiology and Technology* **90**, 1981-1994.
- Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., Gutiérrez, S., y Monte, E. 2008. Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics* **54**, 301–312.
- Sachs, J. 1875. "Text- Book of Botany Morphological and physiological." Macmillan and Co., London, pp. 2-3.
- Segers, R., Butt, T. M., Kerry, B. R., Beckett, A. y Peberdy, J. F. 1996. The role of the proteinase VCPI produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycological Research* **100**, 421-428.
- Sharon, E., Chet, I., y Spiegel, Y.. 2011. *Trichoderma* as a Biological Control Agent. pp. 183-202. En "Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes:Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular mechanisms", Ed. Davies K. G. y Spiegel Y.) Springer, London.
- SHCP, Secretaria de Hacienda y Credito Publico. 2014."Panorama Jitomate."
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. "Atlas Agroalimentario 2016". México, D.F.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017."Jitomate."
- Siddiqui, I. A., y Shaukat, S. S. 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. *Journal of Phytopathology* **151**, 215–222.
- Siddiqui, Z. A. y Akhtar, M. S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Australasian Plant Pathology* **38**, 22–28.
- Tanimoto, E. 2005. Regulation of root growth by plant hormones-roles for auxin and gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 249–265.
- Torres, C. y Ramirez, M. 2016. Expression of Hydrolytic Enzymes During Interaction of *Moniliophthora roreri*, Causal Agent of Frosty Pod Rot and *Theobroma cacao* Pods. *Plant Pathology Journal* **15**, 49-56.

- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Klimova, S. Y., Shestakov, A. I., Botina, S. G. y Netrusov, A. I. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology* **188**(6): 655-664.
- Van Wees, S.C.M, Van der Ent, S. y Pieterse, C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 443–448.
- Vargas, W. A., J. C. Mandawe, and C. M. Kenerley. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol* **151**, 792–808.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**, 571–586.
- Viterbo, A. y Chet, I. 2006. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* **7**, 249–258.
- Ward, E., Kerry, B. R., Manzanill, R. H., Mutua, G., Devonshire, J., Kimenju, J., Hirsch, P. R. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene vcp1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. *PLoS One* **7**(4): e35657.
- Whipps, J.M. 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* **26**, 1–134.
- Yun, S., Jeong, C., Chung, D., y Choi, H. 2001. Purification and Some Properties of a  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma harzianum* Type C-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2028-2032.
- Zavala, E. A.; Escudero, N.; Lopez, F.; Ricaño, J.; Naranjo, M. A.; Ramirez, M.; Lopez, L. V. 2015. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology*. 1-12.
- Zhang, F.; Yuan, J.; Yang, X.; Cui, Y.; Chen, L. ; Ran, W. ; Shen, Q. 2012. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. *Plant Soil* **368**, 433–444
- Zhou, W., Yuan, H., Wang J., y Yao J. 2008. Production, purification and characterization of chitosanase produced by *Gongronella* sp. JG. *Letters in Applied Microbiology* **46**, 49–54.

## 8 APENDICES

### APENDICE A

#### PREPARACIÓN DE QUITINA COLOIDAL (MONREAL Y REESE, 1969)

Se mezcló 10 g de quitina coloidal comercial (Sigma, C-9213) y 100 mL de ácido fosfórico al 85% (Baker). Se almacenó la mezcla durante 24 h a una temperatura de 4 °C agitándola ocasionalmente. Posteriormente, la quitina se precipitó con exceso de agua destilada, el precipitado se separó por filtración a través de 2 capas de gasa y se lavó hasta eliminar la acidez. La pasta se esterilizó y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

### APENDICE B

Determinación De Azúcares Reductores Liberados

(Método modificado del ácido 3,5-dinitrosalicílico, Miller *et al.*, 1959) (Miller 1959)

#### **Solución DNS:**

Adicionar:

1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y

30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado a

16 mL de NaOH al 10 % (p/v).

Adicionar 50 mL de agua destilada.

Calentar para disolver, enfriar y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL.

Completar en volumen con agua destilada.

#### **Curva Patrón.**

La curva patrón se construyó con soluciones de glucosa en un rango de 0.1 mg/mL hasta 1.5 mg/mL.

100µL de las soluciones de glucosa desde 0.1 hasta 1.5 mg/mL se adicionaron a tubos de 1.5mL y 100µL de Solución DNS.

Se colocan los tubos en agua hirviendo (100°C) durante 5 minutos. Enfríe rápidamente en un baño de hielo. Pasar 150 µL de la mezcla de reacción.

Determinar la DO a 540 nm usando agua como blanco reactivo para ajustar a cero el espectrofotómetro. (El blanco reactivo se prepara de la misma forma que las concentraciones de glucosa, a diferencia de que se sustituye la glucosa por 100µL de agua destilada).

**Procedimiento:**

Coloque 100 µL de muestra en un tubo Eppendorf y adicione 100 µL de reactivo DNS. Coloque los tubos en agua hirviendo durante 5 minutos. Enfríe rápidamente en un baño de hielo. Diluya las muestras si es necesario.

Determine la D.O. a 570 nm usando un blanco reactivo para ajustar a cero el espectrofotómetro (El blanco se prepara usando 100µL de agua destilada, en lugar de 100µL de la solución problema).

### APENDICE C

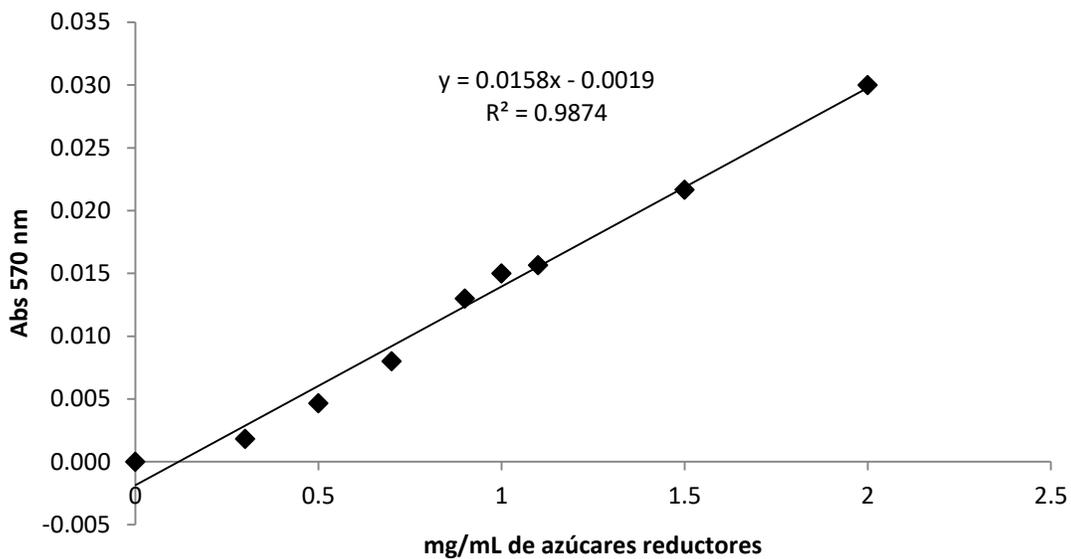


FIGURA 8-1 Curva estándar de glucosa para actividad poligalacturonasa.

### APENDICE D

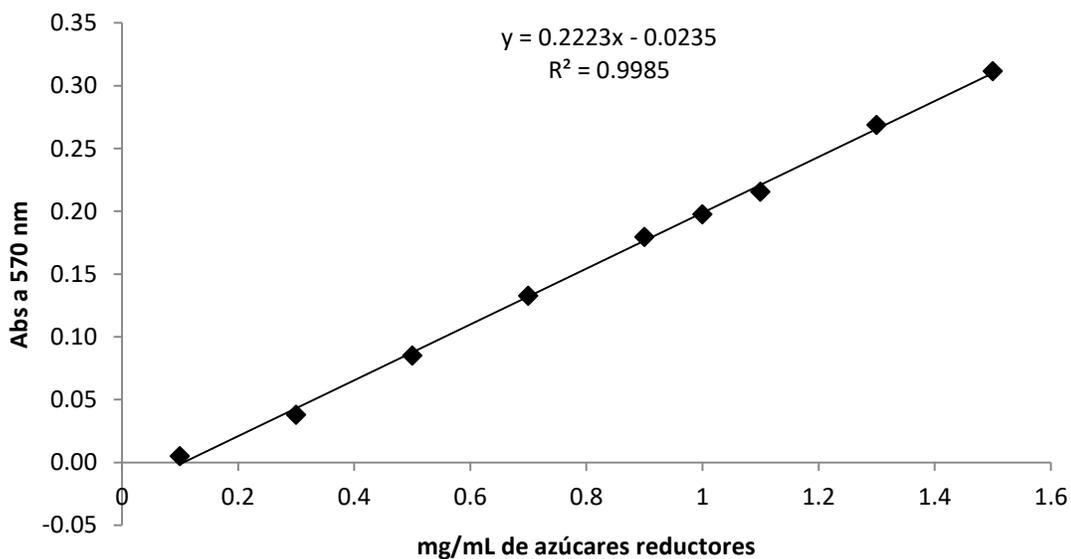


FIGURA 8-2 Curva estándar de glucosa para actividad endoglucanasa y  $\beta$ -1,3-Glucanasa.

## APENDICE E

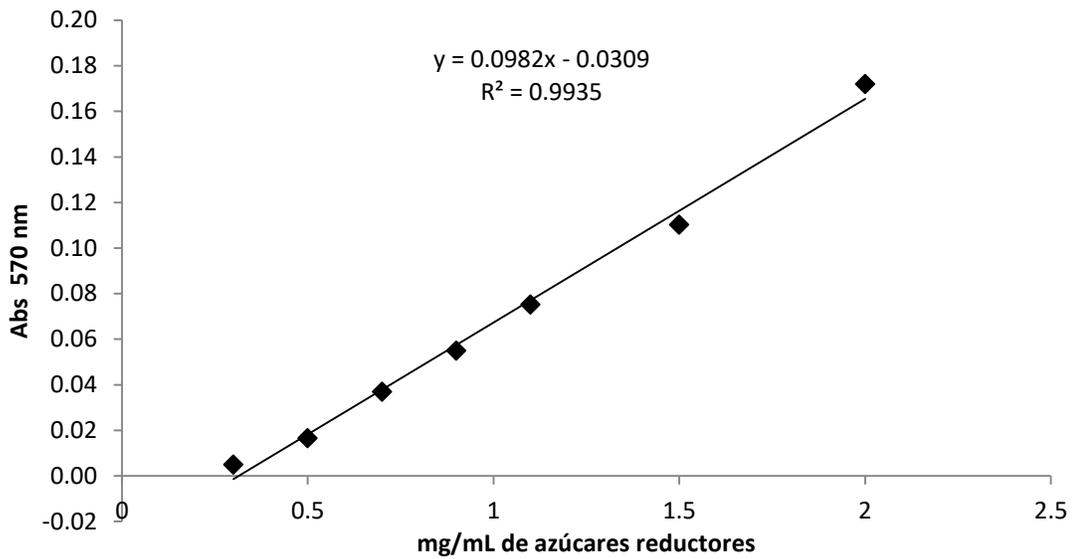


FIGURA 8-3 Curva estándar de glucosa para la actividad quitinasa.

## APENDICE F

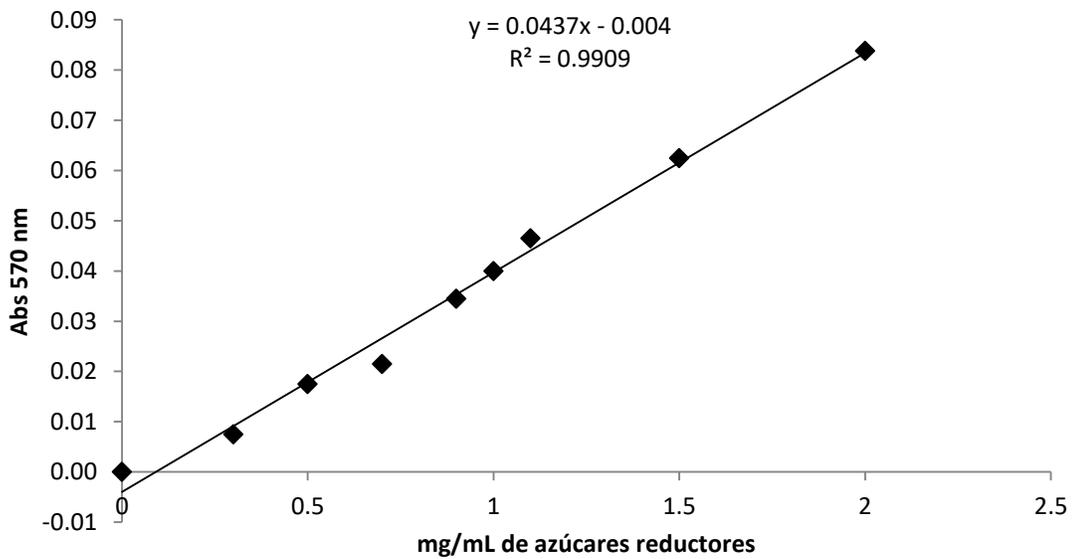


FIGURA 8-4 Curva estándar de glucosa para la actividad Quitosanasas.

## APENDICE G

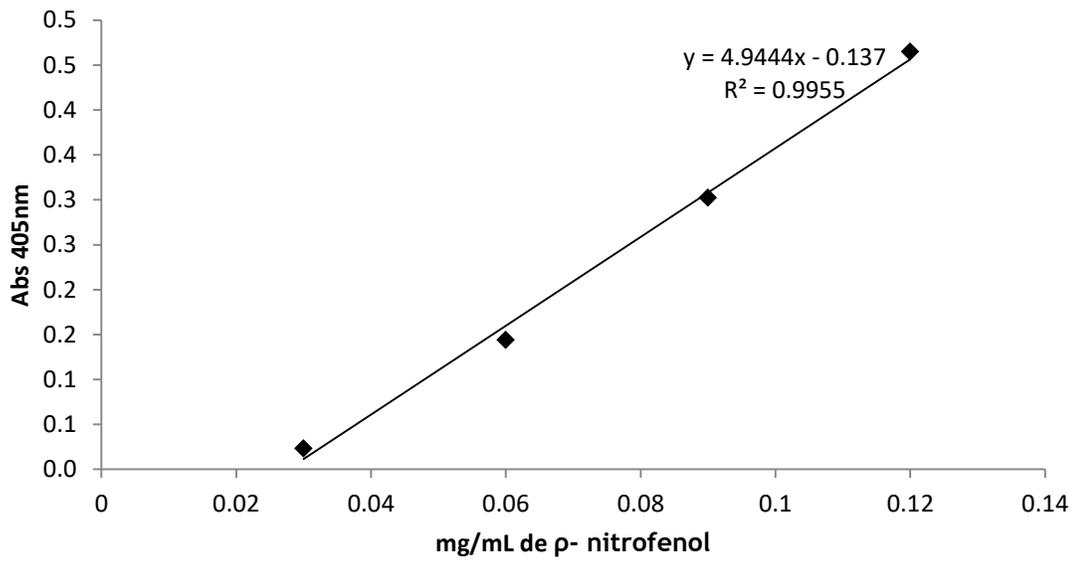


FIGURA 8-5. Curva estándar de p- nitrofenol para actividad lipasa.

## APENDICE H

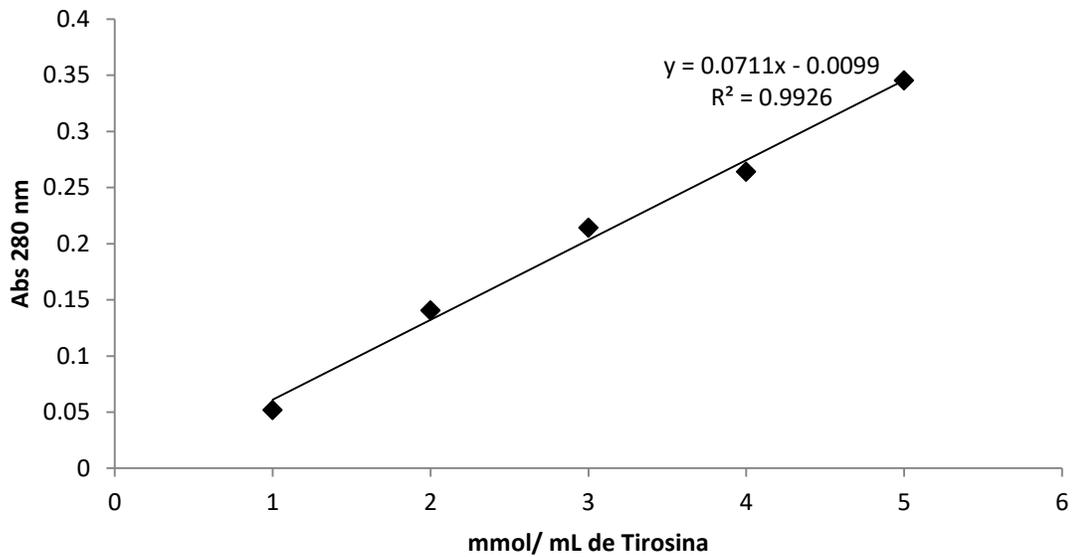


FIGURA 8-6 Curva de estándar de Tirocina para actividad Proteasa

## APENDICE I

Medio MS (Murashige & Skoog); Medio Basal con Vitaminas

TABLA 8-1. Composición del medio MS

| Formula   | (mg/L) |
|---|--------|
| Nitrato de amonio                                 | 1650   |
| Ácido bórico                                      | 6.2    |
| Cloruro de calcio, anhidro                        | 332.2  |
| Cloruro de cobalto •6H <sub>2</sub> O             | 0.025  |
| Sulfato cúprico •5H <sub>2</sub> O                | 0.025  |
| Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O            | 37.26  |
| Sulfato ferroso •7H <sub>2</sub> O                | 27.8   |
| Sulfato de magnesio anhidro                       | 180.7  |
| Sulfato de manganeso •H <sub>2</sub> O            | 16.9   |
| Ácido Molíbdico (Sal de Sodio) •2H <sub>2</sub> O | 0.25   |
| Yoduro de potasio                                 | 0.83   |
| Nitrato de potasio                                | 1900   |
| Fosfato de potasio, Monobásico                    | 170    |
| Sulfato de Zinc •7H <sub>2</sub> O                | 8.6    |
| Glicina (Base Libre)                              | 2      |
| Mio-inositol                                      | 100    |
| Ácido nicotínico (ácido libre)                    | 0.5    |
| Piridoxina •HCl                                   | 0.5    |
| Tiamina •HCl                                      | 0.1    |

## APENDICE J

Tiempos de deshidratación para la preparación de muestras para microscopía óptica: las muestras se colocaron en casetes y se deshidrataron haciéndose pasar por alcohol a diferentes concentraciones, como se muestra a continuación.

TABLA 8-2. Soluciones y tiempos de deshidratación.

| Solución             | Tiempo           |
|----------------------|------------------|
| Etanol 30%           | 15 min           |
| Etanol 40%           |                  |
| Etanol 50%           |                  |
| Etanol 60%           |                  |
| Etanol 70%           |                  |
| Etanol 80%           |                  |
| Etanol 90%           |                  |
| Etanol 100%          | 15 min (2 veces) |
| Alcohol- xilol (2:1) | 10 min           |
| Alcohol- xilol (1:1) |                  |
| Alcohol- xilol (1:2) |                  |
| Xilol                |                  |

Desparafinación: los frotis se sumergieron por las siguientes soluciones y en los tiempos indicados a continuación:

TABLA 8-3. Soluciones y tiempos para la desparafinación

| Solución   | Tiempo |
|------------|--------|
| Xilol 100% | 20 min |
| Etanol 96% |        |
| Etanol 70% |        |
| Etanol 25% |        |