
Evaluación del control biológico de *Fusarium* spp. mediante fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* e inducción de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Mauricio Estuardo Villarroel Utreras¹

¹Ingeniería en Biotecnología, Ciencias de la vida, Universidad de las Fuerzas Armada – ESPE, Quito, Ecuador.
E-mail: mauvil87@hotmail.com

RESUMEN: En la actualidad, existen grandes pérdidas en los cultivos debido a la presencia de fitopatógenos que reducen la producción a causa de enfermedades. Últimamente se ha identificado a plagas que son resistentes a químicos y pesticidas, que aparte de degradar la microbiota del suelo, son tóxicos para los seres humanos ya que se bioacumulan en el organismo y causan enfermedades peligrosas. Los hongos del género *Trichoderma* se destacan como controladores biológicos en la agricultura, así como inductores de crecimiento de plantas, por lo que en la presente investigación se utilizaron a cepas nativas del Ecuador, *T. harzianum* y *T. asperellum* para mediante fusión de protoplastos obtener variantes genéticas que posean dichas características en una sola cepa. De este modo, se obtuvieron 26 cepas, a las que se las caracterizó mediante evaluación de su capacidad antagónica frente a *Fusarium* spp., tanto en cultivos duales como con sus filtrados fúngicos. Adicionalmente, se estudió su efecto en el crecimiento de *A. thaliana*, junto con los parentales. En el estudio se determinó que cuatro cepas fusionadas mostraron hiperparasitismo frente al fitopatógeno *Fusarium* spp. ($p < 0.0001$), y que únicamente el parental *T. harzianum* fue capaz de controlarlo con la producción de metabolitos secundarios volátiles ($p < 0.0001$). Interesantemente se determinaron a nueve cepas que indujeron el crecimiento del patógeno ($p < 0.0001$). Además, los filtrados fúngicos de *Trichoderma* resultaron ser tóxicos para *A. thaliana*, en contraste con tres cepas que indujeron su crecimiento significativamente ($p < 0.0001$). En consecuencia, se obtuvieron dos cepas que biocontrolaron a *Fusarium* spp. e indujeron el crecimiento de *A. thaliana*.

PALABRAS CLAVE: Fusión de protoplastos, *Trichoderma* spp., control biológico, *Fusarium* spp., *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT: Nowadays, major losses in crops are caused due to the presence of pathogens which reduce the yield and cause diseases. Recently resistant pests to chemical pesticides had been found, these pesticides kill the soil microbiota, and become toxic to humans owing to bioaccumulation in the body, causing dangerous diseases. Fungi of the genus *Trichoderma* highlighted as biological control stand in agriculture as well as inducers of plant growth. In the current study native strains of Ecuador were used, *T. harzianum* and *T. asperellum* in order to obtain genetic variants by protoplast fusion, with characteristics of both, in a single strain. 26 strains obtained and characterized by the assessment of the antagonistic capacity against *Fusarium* spp. Dual culture and fungal filtrations were used for the evaluation. Additionally, we studied their effect on the growth of *A. thaliana*, along with parental. We found that four fused strains showed hyperparasitism against the pathogen *Fusarium* spp. ($p < 0.0001$), and only the parental *T. harzianum* was able to control the growth of *Fusarium* spp. by the production of volatile secondary metabolites ($p < 0.0001$). Interestingly nine strains were determined which induced the growth of the pathogen ($p < 0.0001$). Furthermore, the fungal *Trichoderma* filtrates proved to be toxic to *A. thaliana*, in contrast with three strains that induced growth significantly ($p < 0.0001$). Accordingly, two strains of *Trichoderma* genetic variants obtained, biocontrolled the growth of *Fusarium* spp. and induced the growth of *A. thaliana*.

KEY WORDS: Protoplast fusion, *Trichoderma* spp., biological control, *Fusarium* spp., *Arabidopsis thaliana*.

INTRODUCCIÓN:

Desde el inicio de la domesticación de las plantas por parte de los seres humanos, hace aproximadamente 10.000 años atrás, los fitopatógenos han causado grandes pérdidas en los cultivos y sembríos (Pereira, 2007). En la actualidad, los agricultores utilizan una gran cantidad de productos químicos para mantener

la fertilidad del suelo y combatir a patógenos que atacan a los cultivos, provocando así, contaminación en el suelo y en sistemas de aguas, tanto superficiales como subterráneas. Los compuestos agrotóxicos generalmente presentan consecuencias indeseables, puesto que al poseer sustancias altamente venenosas,

se bioacumulan en el organismo de los seres humanos, siendo capaces de causar enfermedades peligrosas tales como cáncer y mutaciones genéticas (Muñoz, 2012; Pereira, 2007). Muñoz en el año 2012 menciona que con el tiempo, la persistencia de estos compuestos agroquímicos han ido provocando que las plagas y patógenos se vuelvan más resistentes a sus compuestos activos, por lo que, los agricultores se han visto obligados a utilizar dosis más altas de plaguicidas, eliminando también a la microbiota normal del suelo. Estos químicos, no solo causan la erosión del suelo, sino que alteran la actividad de los microorganismos benéficos lo que afecta directamente a la producción agrícola. Por lo que el desafío para los productores modernos es controlar las enfermedades sin utilizar compuestos químicos tóxicos, lo que posiblemente se consiga con microorganismos del suelo (Muñoz, 2012; Pereira, 2007).

Gomes (2002) señala que entre los microorganismos benéficos del suelo se encuentran hongos del género *Trichoderma*. Este género está constituido por un gran número de especies, que se emplean en diferentes áreas. Algunas producen enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, y son utilizadas para el control biológico de fitopatógenos que se encuentran principalmente en la raíz de las plantas, mientras que otras son utilizadas en la inducción de crecimiento de plantas, en la biodegradación de compuestos clorofenólicos y en la biorremediación de suelos. Lamentablemente, muchas de las especies de *Trichoderma* no han sido bien caracterizadas con respecto a su función. Mui en el año 1999 afirma que hongos de la especie *Trichoderma* poseen una variabilidad genética muy amplia, teniendo así, algunas especies con amplio espectro de actividad biológica, mientras que otras pueden solamente controlar a ciertos patógenos en específico, así como también existen algunas cepas que tienen poca o nula eficiencia en el control biológico de fitopatógenos.

Debido a la importancia de las especies de este género en las diversas áreas de interés, existe la necesidad de obtener nuevos linajes superiores que presenten características deseables para utilizarlas a nivel industrial y comercial (Gomes, 2002; Mui, 1999; Pereira, 2007). La gran mayoría de especies existentes han sido aisladas del ambiente, y no han sido mejoradas genéticamente, motivo por el cual los procesos de recombinación podrían ser utilizados para obtener mayor variabilidad de estas cepas y así poder controlar una gran gama de enfermedades (Gomes, 2002; Mui, 1999; Pereira, 2007). En el Ecuador, el sector agrícola posee gran importancia económica y social, ya que aporta con grandes ingresos económicos para el país, por lo que es importante mejorar los modelos agrícolas, que sean eficientes, económicamente viables, que se adapten a la realidad de la sociedad, y que sean adecuados

para conservar el ambiente (Altiere, *et al.*, 1994). Dada la importancia de *Trichoderma* en el biocontrol de fitopatógenos, existe la necesidad de producir cepas, que tengan la capacidad de generar metabolitos secundarios, producir enzimas, y además, que posean una capacidad de micoparasitismo superior a las cepas nativas de suelos del Ecuador, tales como *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum*. Así como también que sean capaces de inducir el crecimiento en plantas, para incrementar la producción agrícola y reducir el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas. Un método alternativo para combinar las características de diferentes hongos que no pueden someterse a recombinación sexual, es la fusión de protoplastos, la misma que permite la transferencia de rasgos complejos sin tener que conocer los genes implicados; dichas fusiones se han realizado con especies de *Trichoderma* para combinar características tales como la descomposición de la celulosa, la producción de etanol y para mejorar la competencia en la rizósfera (Hanson, & Howell, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Evaluación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. a través de cultivos duales

Inocular discos de PDA de alrededor de siete mm de diámetro, tanto del antagonista como del patógeno, en los extremos de la caja Petri, colocándolos unos frente del otro y en forma equidistante del centro de la misma. Las cajas Petri se incubaron durante un período de siete días a (27 ± 2 °C), evaluándose y registrándose su crecimiento a los cuatro y siete días. Para el control se inocularon discos de PDA de alrededor de siete mm de diámetro del patógeno, y se incubaron bajo las mismas condiciones (Rasu, Sevugapperumal, Thiruvengadam, & Ramasamy, 2012).

Evaluación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. a través de filtrados fúngicos

Inocular discos de PDA de *Trichoderma* de alrededor siete mm de diámetro, en matraces erlenmeyers que contenían 50 ml de potato dextrose broth (PDB). A continuación, se los incubó con agitación, durante un período de siete días a 28 °C y 150 rpm (Mata, 2005). Transcurrido dicho período, se filtraron independientemente, al vacío, con la ayuda de papel filtro auto clavado, para separar el micelio del extracto obtenido. Se utilizaron filtros millipore de 0.22 μ m para obtener los metabolitos secundarios, los cuales se adicionaron a medio PDA esterilizado, a una concentración del 30%, para ser dispensados en cajas Petri (Muñoz, 2012). Posteriormente, cuando se solidificó el medio, se

inoculó en el centro de la caja Petri un disco de PDA, de alrededor de siete mm de diámetro del patógeno *Fusarium* spp. Las cajas Petri se incubaron durante un período de siete días a (27 ± 2 °C), evaluándose y registrándose su crecimiento a los cuatro y siete días. Para el control se inocularon discos de PDA de alrededor de siete mm de diámetro del patógeno, y se incubaron bajo las mismas condiciones (Mata, 2005).

Evaluación *in vitro* del efecto de los filtrados fúngicos de las cepas parentales de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Para el ensayo, primero se desinfectaron las semillas de la línea Col-0, las mismas que se depositaron en tubos eppendorf abiertos, y se colocaron en un desecador que se encontraba en una campana de gases, donde un vaso de precipitación contenía 120 ml de cloro al 5% y HCl al 23%. Inmediatamente se selló el desecador, y se mantuvieron en esas condiciones durante 22 horas (Becerra, 2006). Para evaluar el efecto de los filtrados fúngicos de las cepas de *Trichoderma*, se procedieron a inocular sus discos de PDA de alrededor de siete mm de diámetro, en matraces erlenmeyers que contenían 50 ml de potato dextrose broth (PDB). A continuación, se los incubó con agitación, durante un período de siete días a 28 °C y 150 rpm. Transcurrido dicho período, se filtraron independientemente, al vacío, con la ayuda de papel filtro auto clavado, para separar el micelio del extracto obtenido. Se utilizaron filtros millipore de 0.22 μ m para obtener los metabolitos secundarios, los cuales se adicionaron al medio Murashige & Skoog esterilizado, a una concentración del 30%, para ser dispensados en cajas Petri. Una vez que se solidificó el medio, se esparcieron semillas estériles de la línea Col-0 de *Arabidopsis thaliana* en la caja Petri. Dichas cajas se sometieron a refrigeración durante un período de cuatro días a 4 °C, posteriormente fueron expuestas a condiciones ambientales de laboratorio y fotoperiodo continuo durante siete días, para evaluarlas. Para el control se sembraron semillas de la línea Col-0 de *A. thaliana* en medio Murashige & Skoog esterilizado, y se sometieron bajo las mismas condiciones.

Aislamiento de protoplastos

Para el aislamiento, se inocularon independientemente en cajas Petri con PDA, a discos de PDA de alrededor de cuatro mm de diámetro, tanto de *Trichoderma harzianum* como de *T. asperellum*. Las cajas Petri se incubaron durante un período de 48 horas a (27 ± 2 °C). Posteriormente, se procedieron a inocular sus discos de PDA de alrededor de siete mm de diámetro, en matraces erlenmeyers independientemente, que contenían 50 ml de potato dextrose broth (PDB). A continuación, se los

incubó con agitación, durante un período de 24 h a 28 °C y 150 rpm (Hanson, & Howell, 2002). Una vez transcurrido dicho período, se filtraron al vacío y se recogieron por separado las hifas de ambas especies de *Trichoderma*, para lavarlas con agua destilada estéril. Las hifas de cada especie se suspendieron en 5 ml de 0.1 M fosfato de potasio buffer (pH 6.4) estéril, con 0.6 M de sorbitol (KPS), y fueron digeridas por 3 h a 30 °C con 6 mg ml⁻¹ de enzima de *T. harzianum* (Sigma) y 2 mg ml⁻¹ de celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma) (Hanson, & Howell, 2002). Los protoplastos se filtraron independientemente, al vacío, con la ayuda de papel filtro auto clavado, se recogieron, y se centrifugaron a 100 g durante 10 min a 26 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron los protoplastos con agua destilada estéril, a continuación se resuspendieron en KPS para ser almacenados a 4 °C durante 24 h (Hanson, & Howell, 2002).

Fusión de protoplastos

Para la fusión se utilizó aproximadamente la misma cantidad de protoplastos entre las especies, y se suspendieron en 30% (p/v) de polietilenglicol (PEG, peso molecular 6000) con 0.1 M fosfato de potasio buffer (pH 6.4), el mismo que contenía 10 mM CaCl₂.2H₂O. A los protoplastos, se los incubó a 28 °C durante 30 min, y posteriormente se los centrifugó a 100 g durante 10 min a 26 °C, y resuspendieron en KPS. Posteriormente se observaron en microscopio a 100X (Hanson, & Howell, 2002).

Estabilización y regeneración

Los protoplastos fusionados se inocularon en PDA (potato dextrose broth [PDB] con 12 g l⁻¹ agar), con 0.6 M sorbitol (SPDA), para determinar la viabilidad de los mismos. Las cajas Petri se incubaron durante un período de cinco días a (27 ± 2 °C), examinándolas cada dos días. A los cinco días, discos de SPDA de alrededor de siete mm de diámetro de los supuestos fusionados se transfirieron a PDA (Hanson, & Howell, 2002).

Evaluación *in vivo* del efecto de las cepas parentales de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*

Sembrar semillas de la línea Col-0, en semilleros que contenían una mezcla de turba y arena (1:1) esterilizada. Los semilleros se sometieron a refrigeración durante un período de cuatro días a 4 °C, posteriormente fueron expuestos a condiciones ambientales de laboratorio y fotoperiodo continuo durante siete días (Segarra, Van der Ent, Trillas, & Pieterse, 2008). Después de dicho período se transfirieron a invernadero, donde se inocularon independientemente las esporas, tanto de *T. harzianum* como de *T. asperellum*. Los conidios se

recolectaron de las cajas Petri de PDA, a los siete días de haberlos inoculado, con la ayuda de 15 ml de tween 80 al 0.08%. Con agua destilada estéril se suspendieron a una concentración de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 ufc ml^{-1} , utilizando la cámara de Neubauer y el método seriado de diluciones (Muñoz, 2012). La inoculación se realizó a los siete días de haber germinado las semillas de *A. thaliana*, con una densidad de 3.33×10^5 ufc g^{-1} sustrato. El bioensayo constó de cuatro tratamientos para cada parental, los cuales fueron distribuidos al azar en los semilleros, el diseño experimental fue completamente al azar (DCA), donde, para cada tratamiento correspondía una concentración específica de esporas indicada anteriormente. Para el control se sembraron plantas sin la aplicación de *Trichoderma*, y se mantuvieron bajo las mismas condiciones.

Evaluación *in vivo* del efecto de filtrados fúngicos de *T. harzianum* sobre el crecimiento de *A. thaliana*

Sembrar semillas de la línea Col-0, en semilleros que contenían una mezcla de turba y arena (1:1) esterilizada. Los semilleros se sometieron a refrigeración durante un período de cuatro días a 4 °C, posteriormente fueron expuestos a condiciones ambientales de laboratorio y fotoperiodo continuo durante siete días (Segarra, Van der Ent, Trillas, & Pieterse, 2008). A continuación, se transfirieron a invernadero, donde se dosificaron distintas concentraciones de los filtrados de *T. harzianum* al suelo. Los metabolitos secundarios se recolectaron, tras haber inoculado un disco de PDA de alrededor de siete mm de diámetro, en matraz erlenmeyer que contenían 50 ml de potato dextrose broth (PDB), y haberse incubado en agitación, durante un período de siete días a 28 °C y 150 rpm. Después de haber transcurrido dicho período, se filtraron al vacío, con la ayuda de papel filtro auto clavado, para separar el micelio del extracto obtenido. Se utilizaron filtros millipore de 0.22 μm para obtener los metabolitos secundarios. La aplicación de la dosificaciones de metabolitos secundarios se realizó a los siete días de haber germinado las semillas de *A. thaliana*, con concentraciones al 10%, 20%, 30%, 40%. El bioensayo constó de cuatro tratamientos, los cuales fueron distribuidos al azar en los semilleros, el diseño experimental fue completamente al azar (DCA), donde, para cada tratamiento correspondía una concentración específica de metabolitos secundarios. Para el control se sembraron plantas sin la aplicación de metabolitos secundarios, y se mantuvieron bajo las mismas condiciones.

Evaluación *in vivo* del efecto de las cepas fusionadas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*

Sembrar semillas de la línea Col-0, en semilleros que contenían una mezcla de turba y arena (1:1) esterilizada. Los semilleros se sometieron a refrigeración durante un período de cuatro días a 4 °C, posteriormente fueron expuestos a condiciones ambientales de laboratorio y fotoperiodo continuo durante siete días (Segarra, Van der Ent, Trillas, & Pieterse, 2008). Después de dicho período se transfirieron a invernadero, donde se inocularon independientemente las esporas de las 26 nuevas cepas obtenidas como resultado de la fusión de protoplastos. Los conidios se recolectaron de las cajas Petri de PDA, a los siete días de haberlos inoculado, con la ayuda de 15 ml de tween 80 al 0.08%. Con agua destilada estéril se suspendieron a una concentración de 1×10^3 ufc ml^{-1} , concentración obtenida del screening previo de los parentales, utilizando la cámara de Neubauer y el método seriado de diluciones (Muñoz, 2012). La inoculación se realizó a los siete días de haber germinado las semillas de *A. thaliana*, con una densidad de 3.33×10^5 ufc g^{-1} sustrato. El bioensayo constó de 26 tratamientos, los cuales fueron distribuidos al azar en los semilleros, el diseño experimental fue completamente al azar (DCA), donde, para cada tratamiento correspondía una cepa fusionada. Para el control se sembraron plantas sin la aplicación de *Trichoderma*, y se mantuvieron bajo las mismas condiciones.

RESULTADOS:

Evaluación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. a través de cultivos duales

En su gran mayoría las cepas fusionadas inhibieron al patógeno (en relación con el control), inclusive más que *T. harzianum* y *T. asperellum*. En general, la inhibición fue entre un 59% y 84%, aunque un pequeño grupo presentó una inhibición entre 88% y 92%. Se determinó a una sola cepa con un comportamiento inhibitorio menor, del 52.63%. Frente a cuatro de las cepas fusionadas el crecimiento de *Fusarium* spp. fue mínimo, entre el 7.89% y 11.84%, por lo que dicho grupo fue considerado el mejor, ya que inhibe el crecimiento mucho más que el parental *T. asperellum*. Siendo la cepa 2.e la mejor, ya que casi no permite el desarrollo del patógeno, con un porcentaje de crecimiento de *Fusarium* spp. del 7.89%, en comparación con el 100% de crecimiento del control (Fig. 3.1).

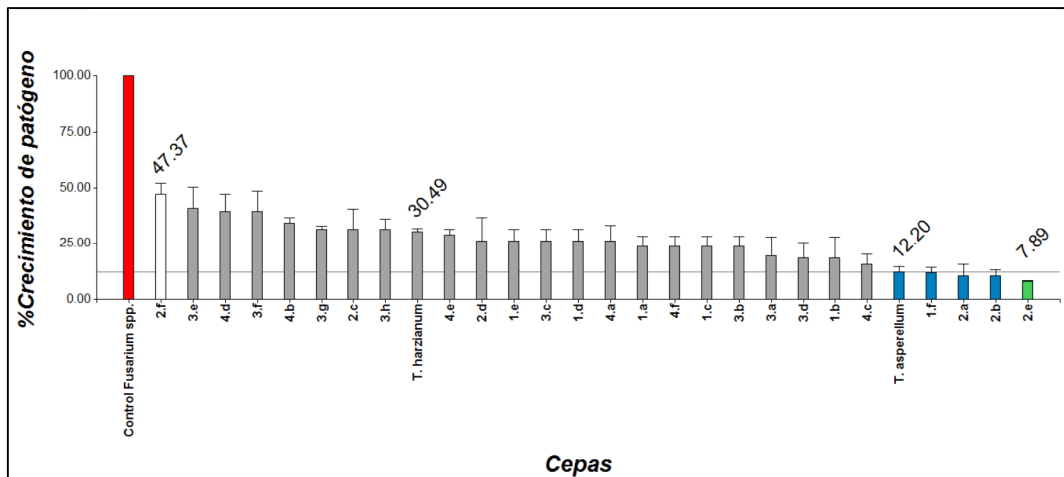


Figura 3.1: Gráfica de evaluación de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma* (Villarroel, 2014).

Evaluación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. a través de filtrados fúngicos

Se determinó que la gran mayoría de cepas presentaba menor inhibición que el parental *T. harzianum*, cepa que debido a la producción de metabolitos secundarios posee el mejor biocontrol del patógeno en este ensayo. Además, se observó que en los filtrados de nueve cepas fusionadas, el patógeno se desarrolló más que el control, entre un 101.20% y 113.25%. Sin embargo, existieron tres cepas que produjeron inhibición mayor que el parental *T. asperellum*. Las cepas fusionadas que presentaron la mejor inhibición de *Fusarium* spp., lo hicieron entre 34.94% y 43.98%, mientras que en las demás se encontraron entre 2.41% y 33.13%.

En la mayoría de tratamientos, se observó que *Fusarium* spp. se desarrollaba de manera similar, y su inhibición era muy escasa por parte de los filtrados fúngicos. Además, se logró identificar que algunas cepas aparentemente inducían el crecimiento del patógeno, en lugar de controlarlo, tal es el caso de 4.d, 4.e, 2.b, 2.e, 2.f, 4.b, 3.a, 4.f, 3.g. De entre los cuatro grupos que se determinaron, a la cepa *T. harzianum* se la clasificó como la principal al momento de generar filtrados inhibidores de *Fusarium* spp., puesto que en su presencia, tan solo se desarrolla en un 20.56%, con respecto al 100% del control (Fig. 3.2).

Evaluación *in vitro* del efecto de los filtrados fúngicos de las cepas parentales de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Se determinó que, en presencia de los metabolitos de ambos parentales, el crecimiento de la planta se vio afectado negativamente, en comparación con el control. Observándose, que el tamaño promedio de planta en *T. harzianum*, *T. asperellum*, y el control *A. thaliana* fue de 0.18 cm, 0.22 cm, y 0.72, respectivamente (Fig. 3.3).

Evaluación *in vivo* del efecto de los filtrados fúngicos de *T. harzianum* sobre el crecimiento de *A. thaliana*

Al momento de evaluar el crecimiento de *A. thaliana in vivo*, a través de los bioensayos en invernadero, bajo la influencia de los filtrados de *T. harzianum* a concentraciones del 10%, 20%, 30%, y 40%, se determinó que mientras mayor era la concentración proporcionada al suelo, el crecimiento de las plantas se veía afectado negativamente, en comparación con el control. Las diferencias entre el control de *A. thaliana* y los tratamientos fueron concluyentes, puesto que el tamaño de las plantas a la concentración de filtrados al 10%, 20%, 30%, y 40% fueron de 2.49 cm, 2.18 cm, 1.86 cm, y 1.65 cm respectivamente, con relación al control que fue de 3.29 cm (Fig. 3.4).

Evaluación *in vivo* del efecto de las cepas parentales de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*

Cuando se evaluó el crecimiento de *A. thaliana in vivo*, a través de los bioensayos en invernadero con los tratamientos de esporas de ambos parentales, a concentraciones de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 ufc ml^{-1} , se determinó que, con las suspensiones de *T. harzianum* a concentraciones bajas las plantas presentaron un mayor desarrollo que las inoculadas con concentraciones altas de esporas, con respecto al control; mientras que con las suspensiones de *T. asperellum* el crecimiento de plantas en la mayoría de tratamientos aumentó.

Con respecto al parental *T. harzianum*, se determinó que únicamente a concentraciones de 1×10^2 y 1×10^3 ufc ml^{-1} , las plantas crecieron un tanto más que el control (3.58 cm y 3.40 cm respectivamente), pero no de manera significativa.

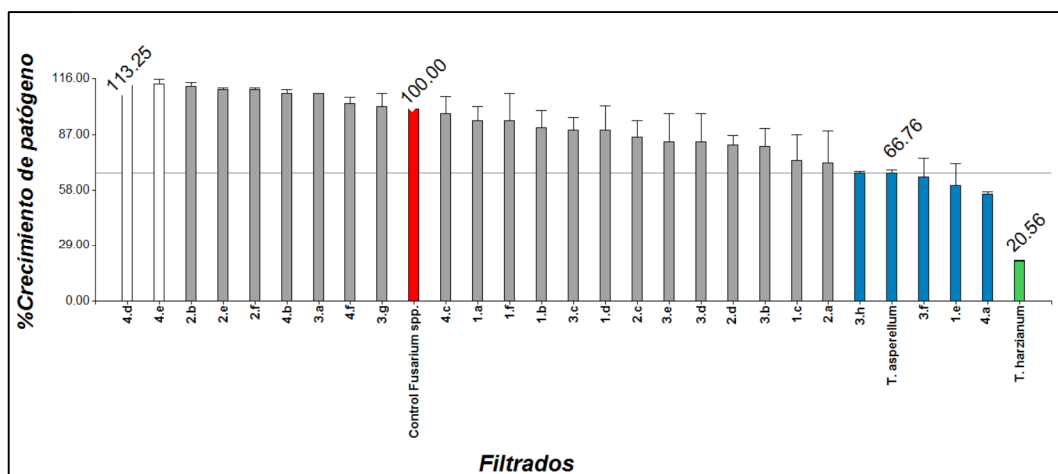


Figura 3.2: Gráfica de evaluación de filtrados fúngicos de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de filtrados de las cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma* (Villarroel, 2014).

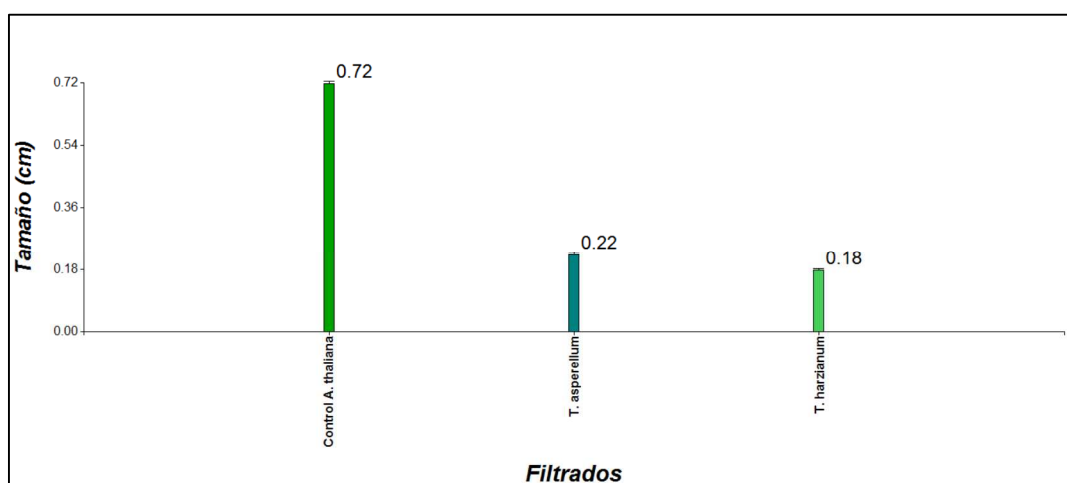


Figura 3.3: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de cepas parentales de *Trichoderma*. Tamaño de plantas en cm, sembradas en medio MS (Villarroel, 2014).

En cuanto a los tratamientos con *T. asperellum*, se determinó que, existieron diferencias significativas entre las suspensiones de esporas a concentraciones de 1×10^3 , 1×10^6 , 1×10^5 ufc ml^{-1} , y el control. Se observaron valores de tamaño de planta de 3.89 cm, 3.67 cm, 3.65 cm, respectivamente; por lo que a dichas concentraciones, la cepa indujo el crecimiento de *A. thaliana* (Fig. 3.5).

Aislamiento de cepas como resultado de la fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum*

Se logró aislar 26 nuevas cepas del medio de cultivo SPDA, las mismas que se inocularon en medio PDA para su conservación y proliferación (Fig. 3.7). A las cepas se las nombró de acuerdo al sitio de origen del aislamiento de la cepa en la caja Petri. Los datos se detallan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Nomenclatura de las cepas aisladas como resultado de la fusión de protoplastos (Villarroel, 2014).

Cepa No.	Caja Petri No.	Región aislada	Código
1	1	a	1.a
2	1	b	1.b
3	1	c	1.c
4	1	d	1.d
5	1	e	1.e
6	1	f	1.f
7	2	a	2.a
8	2	b	2.b
9	2	c	2.c
10	2	d	2.d
11	2	e	2.e
12	2	f	2.f
13	3	a	3.a
14	3	b	3.b

Cepa No.	Caja Petri No.	Región aislada	Código
15	3	c	3.c
16	3	d	3.d
17	3	e	3.e
18	3	f	3.f
19	3	g	3.g
20	3	h	3.h
21	4	a	4.a
22	4	b	4.b
23	4	c	4.c
24	4	d	4.d
25	4	e	4.e
26	4	f	4.f

La evidencia de la fusión se pudo capturar con microscopio óptico (Fig. 3.6).



Figura 3.6: Fotografía de la fusión de protoplastos vista en 100X (Villarroel, 2014).

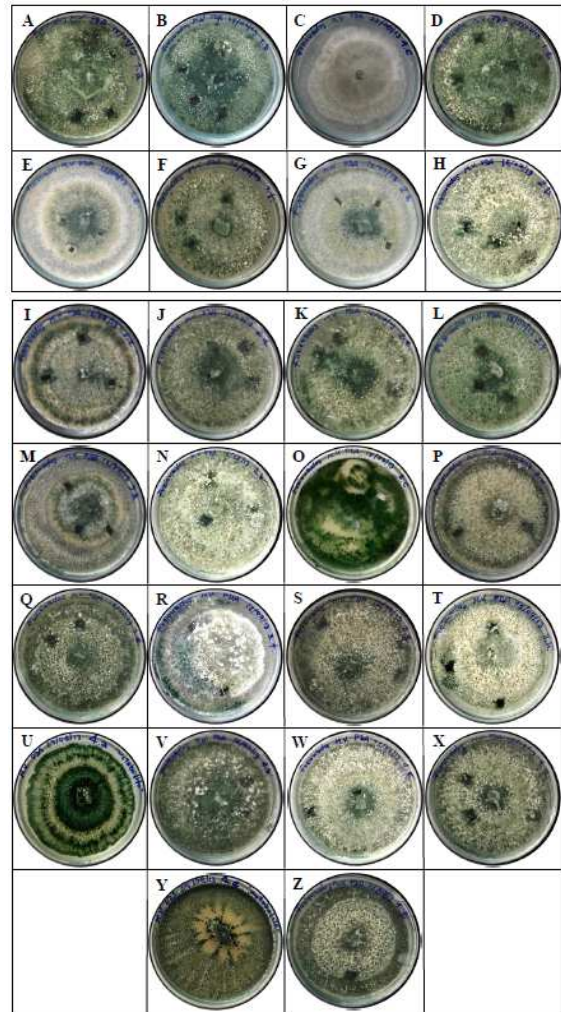


Figura 3.7: Fotografías de las cepas fusionadas de *Trichoderma*. A) 1.a B) 1.b C) 1.c D) 1.d E) 1.e F) 1.f G) 2.a H) 2.b I) 2.c J) 2.d K) 2.e L) 2.f M) 3.a N) 3.b O) 3.c P) 3.d Q) 3.e R) 3.f S) 3.g T) 3.h U) 4.a V) 4.b W) 4.c X) 4.d Y) 4.e Z) 4.f (Villarroel, 2014).

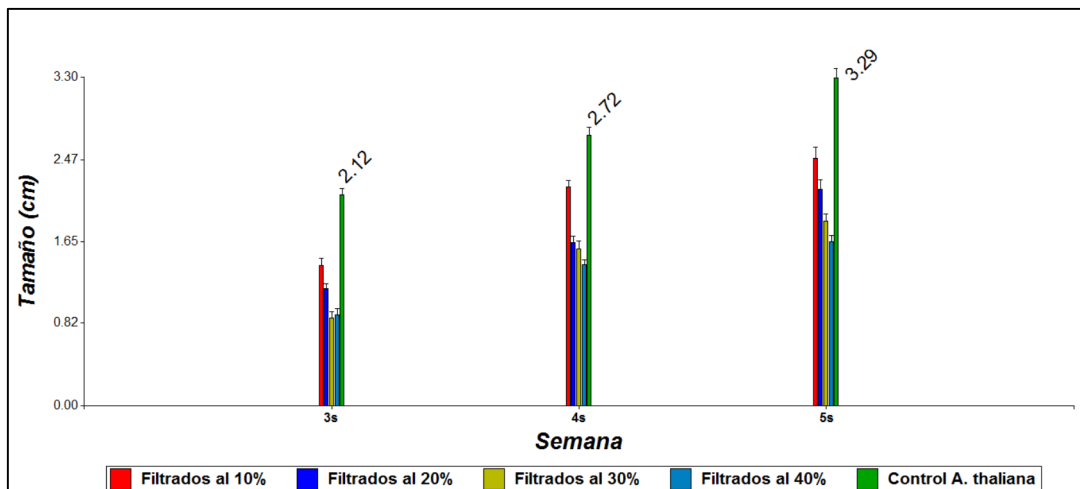


Figura 3.4: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de *T. harzianum*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la tercera, cuarta, y quinta semana, en función de las concentraciones de filtrados fúngicos (Villarroel, 2014).

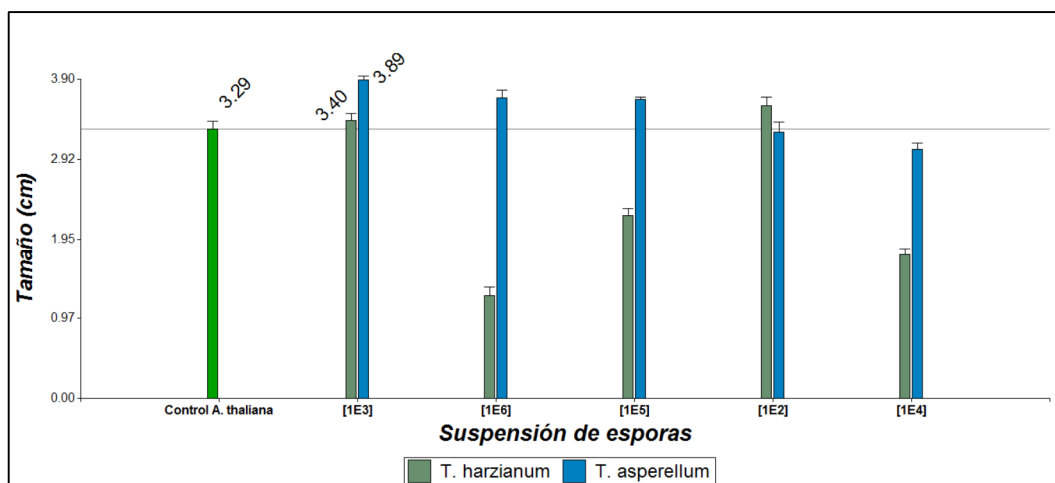


Figura 3.5: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de cepas parentales de *Trichoderma*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la quinta semana, en función de concentraciones de esporas de *T. harzianum* y *T. asperellum* (Villarroel, 2014).

Evaluación *in vivo* del efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*

Se determinó que 16 de las cepas fusionadas indujeron el crecimiento de las plantas de *A. thaliana*, mientras que el resto aparentemente inhibió su desarrollo ya que el tamaño de plantas fue menor que las del control. Las mejores cepas que ayudaron al desarrollo de las plantas fueron 3.b y 1.b. Con la 3.b el tamaño promedio de *A. thaliana* fue de 3.99 cm. Se determinó que el tratamiento menos efectivo fue con la cepa 3.c ya que el tamaño fue de 2.44 cm, con relación al control (3.32 cm) (Fig. 3.8).

Posterior al análisis de las cepas fusionadas en cada uno de los ensayos, se logró identificar a dos cepas que además de inducir el crecimiento de *A. thaliana*, mejoraron los mecanismos de acción de micoparasitismo y en la producción de metabolitos secundarios. Se observó un mejor biocontrol del patógeno *Fusarium* spp. en los ensayos de cultivos duales como en los de filtrados fúngicos, con relación a los parentales. Las cepas identificadas fueron la 1.e y 4.a (Fig. 3.9).

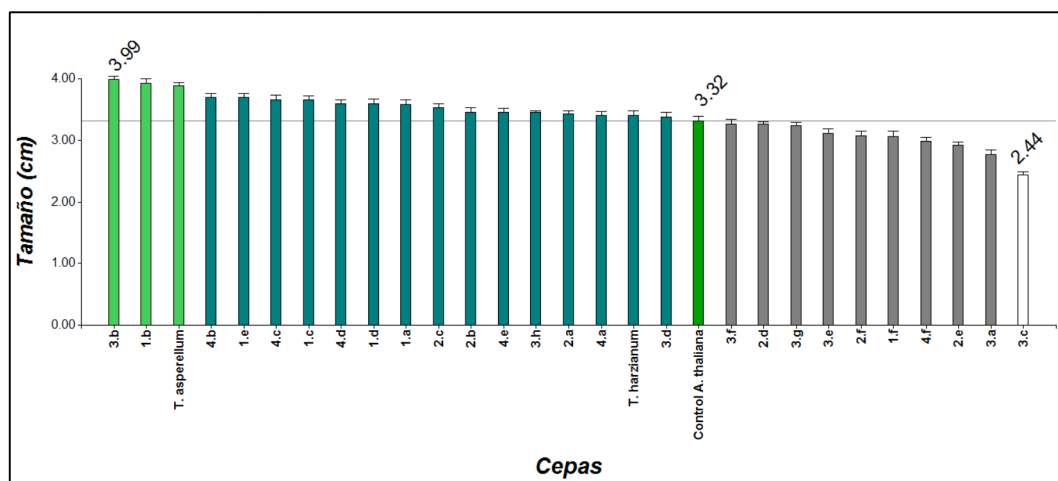


Figura 3.8: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de cepas de *Trichoderma*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la quinta semana, en función de esporas de cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma* (Villarroel, 2014).

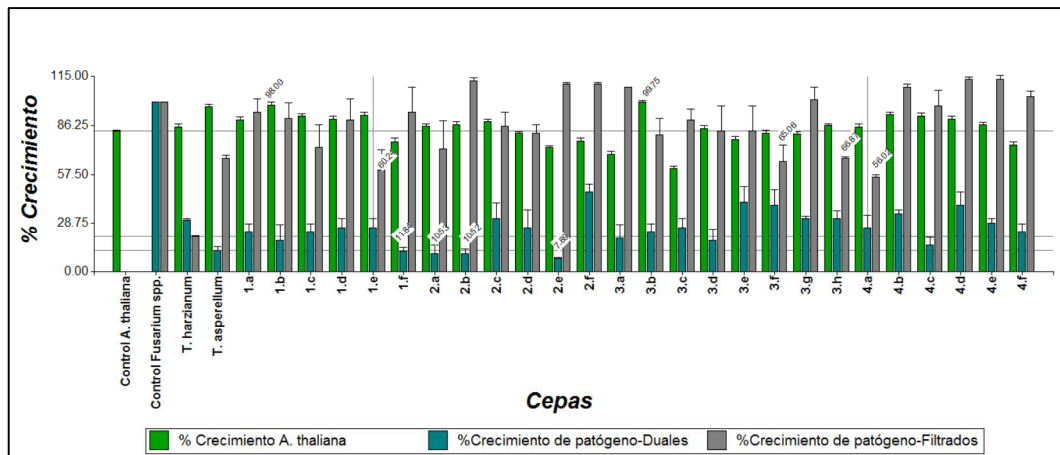


Figura 3.9: Gráfica de evaluación de las cepas fusionadas de *Trichoderma*. Evaluación de las cepas fusionadas con relación a los parentales en los ensayos de cultivos duales, filtrados fúngicos y bioensayos con *A. thaliana* (Villarreal, 2014).

DISCUSIÓN:

Control biológico de cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp.

Luego de la evaluación de los resultados obtenidos de las cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma* en las pruebas de cultivos duales *in vitro* frente a *Fusarium* spp., se puede mencionar que en su totalidad las cepas presentaron un gran control del patógeno, puesto que la actividad antagonista se encontró entre el 52% y 92%. Para las cepas 1.f, 2.a, 2.b, 2.e el micoparasitismo fue muy marcado, ya que colonizaron el medio donde se desarrollaban, impidiendo de esa manera el crecimiento del patógeno; coincidiendo con los reportes de Cervantes y colaboradores en el 2010, donde se observaron a ciertas especies de *Trichoderma* inhibir el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*.

Las cepas que presentaron micoparasitismo, en las cuales se observó el mejor biocontrol fueron las resultantes de la fusión de protoplastos. Estas cepas al parecer presentaron una mejor producción de ácidos, proteínas, antibióticos, y enzimas hidrolíticas. Rasu y colaboradores (2012) mencionan la presencia de una quitinasa que cumple una función clave en el micoparasitismo, debido a que degrada la pared celular del patógeno. Posiblemente debido a esto, *Trichoderma* puede ingresar con facilidad al interior de *Fusarium* spp.

La actividad antagonista observada en los cultivos duales con las cepas en mención, podría deberse a que *Trichoderma* posee un mecanismo por el cual compite por espacio y nutrientes que se encuentre a su alrededor; por lo que al parecer la colonización también pudo ser potencializada, o a su vez la reorganización de genes ayudó a que el sinergismo de los mecanismos mejoró, y que las cepas fusionadas presenten dichas características relevantes (Tovar, 2008).

El efecto observado en el ensayo de cultivos duales con las mejores cepas muestra el éxito antagonista. El

efecto posiblemente se deba a un reordenamiento de genes con respecto al parental *T. asperellum*, ya que éste posee un parasitismo marcado. La inhibición dada por los transformantes es superior incluso al del parental mencionado. En estudios similares realizados con cepas nativas por Guigón & González (2004) se obtienen inhibiciones máximas del 51%, mientras que en la presente investigación se pudo observar un control del patógeno de hasta un 92%. Posterior a la evaluación de los resultados obtenidos de las cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma* en las pruebas de filtrados fúngicos frente a *Fusarium* spp., se puede mencionar que, en la gran mayoría de transformantes no se observó inhibición considerable del patógeno con relación a los parentales. Posiblemente ésta inhibición se deba a que las cepas fusionadas no poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios tóxicos. Dos Santos (2008), menciona que *Trichoderma* produce ciertas sustancias tales como antibióticos y enzimas líticas capaces de inhibir la propagación del fitopatógeno.

Al evaluar los filtrados de todas las cepas estudiadas, la única cepa que presentó una inhibición considerable de *Fusarium* spp. fue el parental *T. harzianum*, debido a que posiblemente dicha cepa tiene la capacidad de producir gran cantidad de metabolitos secundarios, cuya naturaleza volátil de algunos de ellos, como las pironas, confiere la ventaja de controlar microorganismos que en ocasiones se encuentren físicamente distantes. Motivo por el cual, la esporulación del patógeno en cuestión fue mínima en los medios que contenían filtrados de *T. harzianum*, datos que se corroboran con los obtenidos por Dos Santos en el 2008.

En referencia a las cepas que tuvieron una escasa inhibición, se puede sugerir que fueron incapaces de producir y liberar sustancias con actividad antibiótica, debido a que el patógeno creció casi con normalidad. Sin embargo, los filtrados de nueve transformantes no inhibieron en absoluto al patógeno, al contrario se observó que estimularon su

crecimiento. Braga, Grigoletti, & García (2001) en sus estudios obtuvieron resultados similares, y hacen énfasis en que puede deberse a que los metabolitos no volátiles de *Trichoderma* estimulan significativamente el crecimiento del patógeno, mientras que los volátiles inhiben el crecimiento del micelio.

En relación a los resultados obtenidos con los filtrados fúngicos de todas las cepas, se asume que la única que produjo metabolitos secundarios de tipo volátiles fue *T. harzianum*, mientras que *T. asperellum* y todos los transformantes produjeron metabolitos de tipo no volátiles o no produjeron, puesto que los únicos que controlan la proliferación de patógenos son los volátiles (Braga, *et al.*, 2001).

Obtención de cepas fusionadas de *Trichoderma*

Por medio de la metodología empleada se logró exponer a una considerable cantidad de protoplastos a condiciones de fusión, tanto por medios enzimáticos como químicos, donde las enzimas y celulasas rompieron las paredes celulares para que posteriormente el PEG pueda combinar a los protoplastos de ambas cepas parentales. Se obtuvieron 26 cepas aparentemente fusionadas como resultado de un proceso muy al azar, ya que muchas fusiones ocurren entre protoplastos de las mismas cepas, o simplemente no ocurre dicho proceso, como lo describe Migheli y colaboradores en el año 1995. Según los ensayos realizados en esta investigación, los transformantes obtenidos muestran una variabilidad genética, que según Hanson & Howell (2002) muchas de las veces no puede ser únicamente determinada por medio de características fenotípicas. Sin embargo, se logró determinar a cepas que presentaban características morfológicas muy específicas, aunque algunas eran similares al parental *T. asperellum*.

A pesar de las similitudes observadas entre uno de los parentales y las fusionadas, el comportamiento frente al fitopatógeno fue distinto, lo cual puede ocurrir debido a que a pesar de producir pigmentos y esporular similarmente, la producción de enzimas o metabolitos secundarios varía, o a su vez los requerimientos nutricionales no son los mismos. Debido a lo mencionado, se aislaron conidios semejantes de manera al azar para caracterizarlos posteriormente, como lo sugiere Hanson & Howell en el año 2002.

Al analizar la morfología de las colonias resultantes del proceso de fusión de protoplastos, se observó que una gran proporción pertenecía al parental *T. asperellum*, mientras que la mínima tenía relación con *T. harzianum*. Gomes (2002) sugiere que, lo mencionado se debe a que en la fusión, el núcleo del parental no prevalente es degradado y que pequeñas porciones de su genoma son incorporadas en el núcleo del parental prevalente, de esa manera se

generan los recombinantes con características de los parentales.

Efecto de *Trichoderma* sobre *A. thaliana*

En los ensayos con los filtrados de las cepas parentales de *Trichoderma*, sobre el crecimiento de *A. thaliana*, tanto *in vitro* como *in vivo*, se determinó que la presencia de metabolitos secundarios en las plantas tienen un efecto negativo sobre su crecimiento, mas no sobre su germinación. Ezziyyani y colaboradores en el año 2004 coinciden y mencionan además que los filtrados de *T. harzianum* aplicados a tomate y pepino afectan directamente al crecimiento y desarrollo de radículas de semillas.

Tijerino (2010) hace énfasis que *T. harzianum* además libera fuertes inhibidores, tales como trichotecenos y trichodermina, motivo por el cual las plantas no se desarrollaron con normalidad, pero aun así superaron el tamaño del control, ya que dichas sustancias son fitotóxicas. Con respecto al desarrollo de *A. thaliana* en los bioensayos a diferentes concentraciones de metabolitos, se observó que a mayor concentración mayor fue el daño y la inhibición en la planta, relacionándose con estudios similares realizados por Tijerino en el año 2010, en donde se registró que a muy bajas dosis los metabolitos secundarios tienen un efecto estimulante sobre el desarrollo de las plantas. Los ensayos realizados *in vivo* con las suspensiones de esporas de las cepas parentales, mostraron que tanto *T. harzianum* como *T. asperellum* a la suspensión de 1×10^3 ufc ml^{-1} inducían el crecimiento de *A. thaliana*. En el caso de *T. harzianum* ocurre que a mayores concentraciones resulta dañina para las plantas debido a la liberación y acumulación de sustancias fitotóxicas, mientras que con *T. asperellum* se muestra lo contrario, debido a que ésta cepa pone a disposición los nutrientes y los transfiere a la planta a través de las raíces, motivo por el cual se observó un mayor desarrollo y vigorosidad, lo cual concuerda con lo citado por Cano (2011).

Al analizar el efecto de todas las cepas sobre el crecimiento de *A. thaliana*, se determinó que la gran mayoría de cepas promovió su crecimiento, observándose mayor tamaño de hojas y tallo. En estudios realizados al respecto por Tijerino (2010), se hace énfasis en que dependiendo de las especies de *Trichoderma*, éstas pueden mantener una relación con las plantas y proporcionar beneficios que van desde un mejor desarrollo, incremento en la producción hasta estimulación de sus defensas.

Ezziyyani y colaboradores en el año 2004 mencionan que los cambios que *Trichoderma* puede ocasionar en las plantas varían dependiendo del tipo de planta, sustrato y los microorganismos que se encuentren en el suelo, aunque es probable que los exudados de las raíces varíen con el sustrato y que dicha variación tenga efecto sobre la promoción. Estos resultados se

constataron en la presente investigación puesto que los resultados obtenidos variaban entre cepas, a pesar de provenir de los mismos parentales de *Trichoderma*.

De todas las cepas evaluadas, aparentemente la gran mayoría provienen del parental con mayor prevalencia *T. asperellum*, como se mencionó anteriormente. En base a estos resultados se determinaron dos cepas (3.b y 1.b) con mejor comportamiento que el parental en cuanto a promoción de crecimiento se refiere. Estos resultados coinciden con los trabajos de Casanova y colaboradores (2008) que mencionan a *T. asperellum* como un microorganismo eficaz en la promoción, puesto que se ha observado incremento de tamaño y biomasa de 2.5 veces en plantas de pimiento.

En ensayos realizados *in vivo* con *A. thaliana* también se determinaron cepas que inhibieron el crecimiento de las plantas. Al parecer las cepas no poseían la habilidad de solubilizar los nutrientes de las plantas mediante mecanismos quelantes y reductores, lo cual concuerda con lo citado por Guigón & González en el año 2004, donde menciona que algunas cepas producen sustancias fitotóxicas que generan un escaso desarrollo de las plantas.

CONCLUSIONES:

En la presente investigación, a través de la producción de metabolitos secundarios fitotóxicos de naturaleza volátil de los ensayos con filtrados fúngicos, se logró determinar que el parental *T. harzianum* es el biocontrolador más eficiente contra el fitopatógeno *Fusarium* spp. ($p < 0.0001$).

Los filtrados fúngicos de las cepas nativas de *Trichoderma* resultaron ser tóxicos para las plantas, observándose inhibición del crecimiento de *A. thaliana* a medida que aumentaba la concentración en el suelo ($p < 0.0001$).

Se aislaron 26 cepas híbridas como resultado de la fusión de protoplastos entre las cepas nativas *T. harzianum* y *T. asperellum*, las mismas que mostraron distintos comportamientos en los ensayos sometidos con *Fusarium* spp. y *A. thaliana*.

En base a las variantes morfológicas observadas, las cepas fusionadas mostraron mayor similitud con *T. asperellum* debido posiblemente a que éste parental fue prevalente en la recombinación génica.

Se logró identificar a 1.f, 2.a, 2.b, y 2.e como cepas fusionadas debido a las características de hiperparasitismo que mostraron ($p < 0.0001$), ya que inhibieron significativamente al fitopatógeno *Fusarium* spp., entre un 88% y 92% en los ensayos de cultivos duales.

La gran mayoría de cepas fusionadas no mejoraron genéticamente la producción de metabolitos secundarios, puesto que el biocontrol fue limitado frente a *Fusarium* spp. en los ensayos con filtrados fúngicos ($p < 0.0001$).

La variabilidad genética de las cepas fusionadas muestra un comportamiento poco común, puesto que se logró identificar nueve cepas que indujeron el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp. ($p < 0.0001$).

Las fusionadas 3.b y 1.b son cepas que mostraron una significativa inducción de crecimiento de *A. thaliana* ($p < 0.0001$), por lo que se las considera como posibles agentes biológicos promotores de crecimiento.

Finalmente podemos mencionar que las cepas fusionadas 1.e y 4.a son las mejores cepas para el biocontrol del fitopatógeno, debido a que además de ser capaces de inducir el crecimiento de plantas, pueden controlar a *Fusarium* spp. de manera eficiente. Estas cepas al parecer presentan un mejoramiento promedio en los mecanismos de acción característico de cada parental ($p < 0.0001$).

BIBLIOGRAFÍA:

- Álvarez, E., Azuara, E., Camacho, M., Castañón, M., Frías, S., López, C., y otros. (2010). *Arabidopsis thaliana*: un “pequeño” gran genoma. Boletín cuatrimestral del Posgrado en Ciencias Genómicas.
- Becerra, C. (2006). Genes implicados en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana* (L.): Caracterización de los genes *AtAnkTm*. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. Colombo, 43, 123-138.
- Braga, N., Grigoletti, A., & Garcia, C. (2001). Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate.
- Cano, M. (2011). A review of interaction of beneficial microorganisms in plants: Mycorrhizae, *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 14, 15-31.
- Casanova, E., Sánchez, P., Segarra, G., Borrero, C., Avilés, M., & Trillas, M. (2008). Beneficios del uso en la agricultura de agentes de control biológico. *Trichoderma asperellum* cepa T34.
- Cervantes, L., Moreno, J., Pulido, A., Ceceña, C., Gonzáles, D., & Grimaldo, O. (2010). Uso de *Trichoderma* sp. para el biocontrol de la pudrición radicular en cebolla.
- Cholango, L. (2009). Selección de cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro*, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Iasa I, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Dos santos, H. (2008). *Trichoderma* spp. como promotores de crecimiento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum*. Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Ezziyiani, M., Pérez, C., Sid, A., Requena, M., & Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de

- Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- Fahmi, A., Al-Talhi, A., & Hassan, M. (2012). Protoplast fusion enhances antagonist activity in *Trichoderma* sp. *Nature and Science*, 10, 100-106.
- François, O., Blum, M., Jakobsson, M., & Rosenberg, N. (2008). Demographic history of european populations of *Arabidopsis thaliana*. *PloS Genetics*, 4, 1-15.
- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6, 7-25.
- Gomes, F. (2002). Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudokoningii*. Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Guigón, C., & Gonzáles, P. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici leoniana* y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 117-124.
- Hanson, L., & Howell, C. (2002). Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. *Mycol. Res*, 106, 321-328.
- López, C., & González, P. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici leoniana* y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.).
- López, C. (2012). Fusión de protoplastos: aplicaciones. Estación Experimental La Mayora (CSIC).
- Mata, X. (2005). Metabolitos secundarios y enzimas secretadas por aislados nativos de hongos del género *Trichoderma* y efectos sobre el agente que causa la pudre del corazón (*Phytophthora nicotianae* var *parasitica*) en el cultivo de Piña (*Ananas comosus*).
- Migheli, Q., Whipps, J., Budge, S., & Lynch, J. (1995). Production of Inter- and Intra-strain Hybrids of *Trichoderma* spp. by Protoplast Fusion and Evaluation of Their Biocontrol Activity Against Soil-borne and Foliar Pathogens. *J. Phytopathology*, 143, 91-97.
- Mui, W. (1999). Enhancement of biocontrol activities of *Trichoderma harzianum* rifai through protoplast fusion. Faculty of Agriculture, Universiti Putra Malaysia, Malaysia.
- Muñoz, J. (2012). Caracterización molecular y funcional de *Trichoderma* spp. recolectadas en fincas orgánicas de la región sierra del Ecuador. Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Ochoa, F. (2008). Efecto *in vitro* y en invernadero de cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. en el control de *Rhizoctonia solani* (kühn). Escuela de Agronomía, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Ogawa, K., Yoshida, N., Gesnara, W., Omumasaba, C., & Chamuswarng, C. (2000). Hybridization and Breeding of the Benomyl Resistant Mutant, *Trichoderma harzianum* Antagonized to Phytopathogenic Fungi by Protoplast Fusion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 833-836.
- Pereira, M. (2007). Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em Maracujazeiro amarelo. *Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil*.
- Pérez, E., Milanés, P., & García, G. (2010). *Trichoderma harzianum*, una alternativa ecológica.
- Ploetz, R. (2005). *Fusarium*-Induced diseases of tropical, perennial crops. *The American Phytopathological Society*, 96, 648-652.
- Polci, P., & Friedrich, P. (2010). Hibridación somática.
- Prabavathy, V., Mathivanan, N., Sagadevan, E., Murugesan, K., & Lalithakumari, D. (2006). Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. *Elsevier*, 97, 2330-2334.
- Rasu, T., Sevugapperumal, N., Thiruvengadam, R., & Ramasamy, S. (2012). *Trichoderma asperellum*, Identified as a Novel Fungal Biocontrol Agent for the Control of Plant Pathogen. *International Conference on Bioscience, Biotechnology and Healthcare Sciences (ICBBHS'2012)*.
- Saito, L., Souza, L., Martinckoski, L., Royer, R., De Ramos, M., & Reffatti, T. (2009). Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, 2, 203-208.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 787-799.
- Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., & Pieterse, J. (2008). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, 11, 90-96.
- Tijerino, A. (2010). Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum*. Departamento de microbiología y genética, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Tovar, J. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C, Colombia.
- Toyama, H., Yamaguchi, K., Shinmyo, A., & Okada, H. (1984). Protoplast Fusion of *Trichoderma reesei*, Using Immature Conidia. *Applied and Environmental Microbiology*. 47, 363-368.