



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: MAURICIO ESTUARDO VILLARROEL UTRERAS

**TEMA: 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***

DIRECTORA: KARINA PROAÑO Ph.D

CODIRECTOR: ING.-MAT. PEDRO ROMERO

SANGOLQUÍ, FEBRERO DE 2014

CERTIFICACIÓN

Karina Proaño, Ph.D

Ing-Mat. Pedro Romero Saker

Certifican:

Que el trabajo titulado “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*”, realizado por el Sr. MAURICIO ESTUARDO VILLARROEL UTRERAS, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE, en el reglamento de estudiantes de la misma.

Debido a que fue realizada de manera muy responsable, confiable, y con resultados interesantes para la ciencia, si recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto, el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (PDF). Autorizan a VILLARROEL UTRERAS MAURICIO ESTUARDO que lo entregue a Dra. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ LARREA, en su calidad de Coordinadora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Sangolquí, Febrero de 2014

Karina Proaño, Ph.D
DIRECTORA

Ing-Mat. Pedro Romero Saker
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Mauricio Estuardo Villarroel Utreras

Declaro que:

El proyecto de grado titulado “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*”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan en el escrito correspondiente, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente el presente trabajo de investigación es de mi autoría.

En virtud de ésta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Febrero de 2014

Mauricio Estuardo Villarroel Utreras

AUTORIZACIÓN

Yo, Mauricio Estuardo Villarroel Utreras

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “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*”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Febrero de 2014

Mauricio Estuardo Villarroel Utreras

DEDICATORIA

A mis padres, Ruth y Luis, que con sabiduría y ejemplo han sabido inculcarme valores y principios para enfrentar la vida, ambos han sido participes para que mi formación, tanto académica como personal sea la mejor, mi madre siendo para mí la persona más importante en mi vida, y mi padre un ejemplo de vida para nuestra familia, a mi hermana que es como mi segunda madre que de una u otra manera ha estado presente en mi vida para apoyarme en todo.

Con mucho amor Mauricio Estuardo Villarroel Utreras

AGRADECIMIENTO

A mi familia por apoyarme en todo lo que ha sido necesario para formarme, y a todas las personas que intervinieron para que la realización de la investigación se lleve a cabo.

A los excelentes profesionales y seres humanos que formaron parte de la enseñanza en mi vida estudiantil en la ahora Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Al laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito por acogerme y proporcionarme todo lo necesario para la realización de la investigación.

Al Dr. Antonio León-Reyes por brindarme la oportunidad de mostrarme como investigador, y por ser un gran ser humano que siempre estuvo para apoyarme con soluciones viables.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y de la universidad que formaron parte de esta interesante etapa de mi vida.

A la Dra. Karina Proaño y al Ing-Mat. Pedro Romero por el admirable apoyo en la culminación de esta importante etapa de mi vida.

Mauricio Estuardo Villarroel Utreras

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	I
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	II
AUTORIZACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
LISTADO DE TABLAS.....	IX
LISTADO DE FIGURAS.....	X
LISTADO DE ANEXOS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema.....	3
1.3. Objetivos de la investigación.....	7
1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos.....	7
1.4. Marco teórico.....	8
1.4.1. Género <i>Trichoderma</i>	8
1.4.1.1. Morfología y taxonomía.....	8
1.4.1.2. Ecología.....	11
1.4.2. Aplicaciones de <i>Trichoderma</i>	12
1.4.3. Mecanismos de acción en biocontrol.....	13
1.4.3.1. Antibiosis.....	14
1.4.3.2. Competencia.....	15
1.4.3.3. Micoparasitismo.....	16
1.4.3.4. Promoción de crecimiento.....	17
1.4.3.5. Inducción de resistencia.....	17
1.4.4. Importancia de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.4.5. Generalidades de <i>Fusarium</i> spp.....	20
1.4.6. Fusión de protoplastos.....	21
1.4.6.1. Tipos de híbridos somáticos.....	22
1.5. Hipótesis.....	23

2.	CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1.	Participantes.....	25
2.2.	Zona de estudio.....	25
2.3.	Duración de la investigación.....	25
2.4.	Diseño experimental.....	26
2.5.	Metodología.....	33
2.5.1.	Material biológico.....	33
2.5.1.1.	Biocontrolador.....	33
2.5.1.2.	Fitopatógeno.....	33
2.5.1.3.	Material vegetal.....	34
2.5.2.	Evaluación <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp.....	34
2.5.2.1.	Pruebas antagónicas a través de cultivos duales.....	34
2.5.2.2.	Pruebas antagónicas a través de filtrados fúngicos.....	36
2.5.3.	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los filtrados fúngicos de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.5.4.	Técnica de fusión de protoplastos.....	39
2.5.4.1.	Aislamiento de protoplastos.....	39
2.5.4.2.	Fusión de protoplastos.....	40
2.5.4.3.	Estabilización y regeneración.....	40
2.5.5.	Bioensayos.....	41
2.5.5.1.	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	41
2.5.5.2.	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de filtrados fúngicos de <i>T. harzianum</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	43
2.5.5.3.	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de las cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	44
	CAPÍTULO III: RESULTADOS	47
3.1	Evaluación <i>in vitro</i> de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp.....	47
3.1.1	Pruebas antagónicas a través de cultivos duales.....	47
3.1.2	Pruebas antagónicas a través de filtrados fúngicos.....	48
3.2	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los filtrados fúngicos de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
3.3	Aislamiento de cepas como resultado de la fusión de protoplastos de cepas nativas de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. asperellum</i>	52
3.4	Evaluación <i>in vitro</i> de las cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp.....	56
3.4.1	Pruebas antagónicas a través de cultivos duales.....	56

3.4.2	Pruebas antagónicas a través de filtrados fúngicos.....	58
3.5	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de los filtrados fúngicos de <i>T. harzianum</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	59
3.6	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	62
3.7	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de las cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	66
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....		71
4.1	Control biológico de cepas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp.....	71
4.2	Obtención de cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i>	74
4.3	Efecto de <i>Trichoderma</i> sobre <i>A. thaliana</i>	75
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....		78
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....		80
BIBLIOGRAFÍA.....		81
ANEXOS.....		86

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1: Nomenclatura de las cepas aisladas como resultado de la fusión de protoplastos (Villaruel, Mauricio).....	53
---	----

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Clasificación molecular del género *Trichoderma*. Árbol filogenético muestra la clasificación molecular, tras un análisis filogenético de las secuencias de genes de la subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*), el factor de elongación de transcripción 1-a (*tef1*) y espaciadores de transcripción interna ITS1 e ITS2 (Tijerino, 2010).....10
- Figura 1.2:** Tipos de híbridos somáticos. Destino del material genético nuclear y extranuclear, producto de la fusión de protoplastos (Polci, & Friedrich, 2010).....23
- Figura 2.1:** Fotografía de prueba antagónica. Cultivo dual entre *Trichoderma harzianum* y *Fusarium* spp. (Villarroel, Mauricio).....35
- Figura 2.2:** Fotografía de prueba antagónica. Filtrados fúngicos de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium* spp. (Villarroel, Mauricio).....37
- Figura 2.3:** Fotografía de filtrados fúngicos de *T. asperellum* en *A. thaliana*. Crecimiento de planta en medio Murashige & Skoog con filtrados fúngicos de cepa parental *T. asperellum* (Villarroel, Mauricio).....39
- Figura 2.4:** Fotografía de bioensayo en plantas de *A. thaliana*. Bioensayo con cepas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* para inducción de crecimiento (Villarroel, Mauricio).....42
- Figura 2.5:** Fotografía de bioensayo en plantas de *A. thaliana*. Bioensayo con filtrados fúngicos de *Trichoderma harzianum*, a concentraciones del 10%, 20%, 30%, 40% (Villarroel, Mauricio).....44
- Figura 2.6:** Fotografía de bioensayo en plantas de *A. thaliana*. Bioensayo con cepas fusionadas para inducción de crecimiento (Villarroel, Mauricio).....46

- Figura 3.1:** Fotografías de evaluación de cultivos duales de cepas parentales. A1) *T. harzianum* vs. *Fusarium* spp. A2) *T. harzianum* libera metabolitos B1) *T. asperellum* vs. *Fusarium* spp. B2) *T. asperellum* no libera metabolitos C1,C2) Controles de *Fusarium* spp. (Villarroel, Mauricio).....47
- Figura 3.2:** Gráfica de evaluación de cepas parentales de *Trichoderma* en cultivos duales frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de *T. harzianum* y *T. asperellum* (Villarroel, Mauricio).....48
- Figura 3.3:** Fotografías de evaluación de filtrados fúngicos de cepas parentales frente a *Fusarium* spp. A) Filtrados de *T. harzianum* B) Filtrados de *T. asperellum* C) Control de *Fusarium* spp. (Villarroel, Mauricio).....49
- Figura 3.4:** Gráfica de evaluación de filtrados fúngicos de las cepas parentales de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de filtrados de *T. harzianum* y *T. asperellum* (Villarroel, Mauricio).....50
- Figura 3.5:** Fotografías de evaluación de crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de cepas parentales de *Trichoderma*. A) Filtrados de *T. harzianum* B) Filtrados de *T. asperellum* C) Control *A. thaliana* (Villarroel, Mauricio).....51
- Figura 3.6:** 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, Mauricio).....51
- Figura 3.7:** Fotografías con vista superior de cajas Petri de las regiones donde se aislaron las cepas fusionadas. A) Caja Petri 1 B) Caja Petri 2 C) Caja Petri 3 D) Caja Petri 4 (Villarroel, Mauricio).....52
- Figura 3.8:** Fotografías con vista inferior de cajas Petri de las regiones donde se aislaron las cepas fusionadas. A) Caja Petri 1 B) Caja Petri 2 C) Caja Petri 3 D) Caja Petri 4 (Villarroel, Mauricio).....52

- Figura 3.9:** 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 (Villarroel, Mauricio).....54
- Figura 3.10:** Fotografías de las cepas fusionadas de *Trichoderma*. 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, Mauricio).....55
- Figura 3.11:** Fotografía de la fusión de protoplastos vista en 100X (Villarroel, Mauricio).....56
- Figura 3.12:** 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, Mauricio).....57
- Figura 3.13:** 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, Mauricio).....59
- Figura 3.14:** Fotografías de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de *T. harzianum* a diferentes concentraciones. A) Vista lateral de plantas en los tratamientos B) Vista superior de plantas en los tratamientos C) Control *A. thaliana* (Villarroel, Mauricio).....60
- Figura 3.15:** 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, Mauricio).....61
- Figura 3.16:** Fotografías de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas a diferentes concentraciones de las cepas parentales de *Trichoderma*. A) Vista superior y lateral de plantas en los tratamientos con *T. harzianum* B) Vista superior y lateral de plantas en los tratamientos con *T. asperellum* (Villarroel, Mauricio)....63

- Figura 3.17:** Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de *T. harzianum*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la tercera, cuarta, y quinta semana, en función de las concentraciones de esporas (Villarroel, Mauricio).....64
- Figura 3.18:** Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de *T. asperellum*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la tercera, cuarta, y quinta semana, en función de las concentraciones de esporas (Villarroel, Mauricio).....65
- Figura 3.19:** 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, Mauricio).....66
- Figura 3.20:** Fotografías de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de cepas fusionadas de *Trichoderma*. Plantas que presentaron el mayor y menor tamaño con la presencia de las cepas fusionadas en relación al control (Villarroel, Mauricio).....67
- Figura 3.21:** 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, Mauricio).....69
- Figura 3.22:** 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* (Villarroel, Mauricio).....70

LISTADO DE ANEXOS

A: ANOVA de la evaluación <i>in vitro</i> de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp. a través de cultivos duales.....	86
B: ANOVA de la evaluación <i>in vitro</i> de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp. a través de filtrados fúngicos.....	87
C: ANOVA de la evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los filtrados fúngicos de las cepas parentales de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
D: ANOVA de la evaluación <i>in vitro</i> de las cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp. a través de cultivos duales.....	89
E: ANOVA de la evaluación <i>in vitro</i> de las cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i> spp. a través de filtrados fúngicos.....	90
F: ANOVA de la evaluación <i>in vivo</i> del efecto de los filtrados fúngicos de <i>T. harzianum</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	91
G: ANOVA de la evaluación <i>in vivo</i> del efecto de <i>T. harzianum</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	92
H: ANOVA de la evaluación <i>in vivo</i> del efecto de <i>T. asperellum</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	93
I: ANOVA de la evaluación <i>in vivo</i> del efecto de las cepas fusionadas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	94

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*.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

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.

Se ha observado que *Trichoderma* presenta buenos resultados contra patógenos del suelo, como: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*,

Fusarium spp. y *Pythium* spp., además se ha determinado que el crecimiento de algunas de sus cepas se ve influenciado por las condiciones ambientales. 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).

1.2 Justificación del problema

El control biológico de enfermedades de plantas ofrece grandes beneficios para el manejo de patógenos, en donde los agentes biológicos pueden llegar a controlar dichas enfermedades, las mismas que ni con el uso de agentes químicos se las puede manejar con tal efectividad como se las maneja con los microorganismos benéficos. Además, dicho control evita que se dé una resistencia por parte de los patógenos frente a los químicos tradicionalmente utilizados, disminuyendo de esta manera los riesgos y enfermedades causadas por pesticidas (Hanson & Howell, 2002).

El suelo posee algunos patógenos tales como, *R. solani*, *P. ultimum* y *F. oxysporum*, que ocasionan cuantiosas pérdidas económicas en muchos cultivos. Ante estos patógenos, habitualmente se da tratamiento con pesticida para controlar dichas

enfermedades. Sin embargo, dichos plaguicidas son caros y perjudiciales para la salud humana, además que, controlar de esa manera a las enfermedades es complicado. El uso de agentes microbianos para control biológico es más eficaz, menos costoso y más seguro para la salud humana (Fahmi, Al-Talhi, & Hassan, 2012).

Muñoz (2012) afirma que los plaguicidas tienen graves efectos que son perjudiciales para la salud, tanto de los trabajadores como de los consumidores, vinculándolos con una larga lista de enfermedades y diferentes tipos de cáncer, incluso se menciona que algunos químicos permitidos, provocan problemas de salud si no son utilizados bajo las debidas condiciones de seguridad.

En la búsqueda de alternativas al uso de químicos, está el control biológico, el cual da la oportunidad a fitopatólogos, micólogos, genetistas, bioquímicos y biólogos moleculares a colaborar y comprender de mejor manera la forma en la que los microorganismos reducen el desarrollo de los fitopatógenos y por ende las enfermedades. Al utilizar hongos en el biocontrol, se interrumpe el ciclo de vida del patógeno influyendo en la prevención de la infección, reducción en la colonización, reducción de esporulación, entre otros (Pereira, 2007).

Uno de los principales fitopatógenos al que se debe tomar especial atención es *Fusarium oxysporum* debido a que causa grandes pérdidas en los cultivos. Este hongo cosmopolita existe en muchas formas patogénicas, y se encuentra parasitando alrededor de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas. Además, *Fusarium* spp. es un microorganismo muy común e importante en plantas superiores,

y se encuentra entre los hongos más ubicuos en los ecosistemas terrestres, puesto que infecta a una gran diversidad de hospederos. Las enfermedades que ocasiona en zonas agrícolas de clima templado han recibido gran atención ya que ha sido responsable de miles de millones de dólares en pérdidas (Garcés, 2001; Ploetz, 2005).

En la agricultura, uno de los agentes de biocontrol más utilizados es *Trichoderma*, para el tratamiento de enfermedades de plantas, causadas por un amplio espectro de hongos fitopatógenos. Este género de hongos benéficos posee la capacidad de producir enzimas hidrolíticas extracelulares, como mecanismo de control biológico hacia hongos patógenos (Prabavathy, Mathivanan, Sagadevan, Murugesan, & Lalithakumari, 2006).

Además, en la mayoría de casos, ha sido investigado ampliamente su efecto en el aumento de crecimiento de las plantas, demostrándose que *Trichoderma harzianum* induce el incremento del crecimiento, independientemente de la presencia de alguna condición de enfermedad en la planta, así como también acelera la germinación, incrementa la estatura y peso de los retoños (Ogawa, Yoshida, Gesnara, Omumasaba, & Chamuswarng, 2000).

Tijerino en el año 2010 señala que ciertas especies de *Trichoderma*, tales como, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. gamsii*, *T. viride* o *T. virens* son utilizadas para el control biológico en la agricultura, en programas de manejo integrado, combinando agentes biológicos con compuestos químicos, para reducir las dosis de éstos, a niveles subletales, gracias al efecto sinérgico de la acción de ambos

tratamientos. Además, que algunas especies de *Trichoderma* también pueden ser utilizadas como fuente de genes, cuya aplicación biotecnológica esté dirigida hacia la obtención de plantas transgénicas, las mismas que posean la capacidad de adquirir resistencia a enfermedades y estreses abióticos.

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 (Altieri, *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).

Mui (1999) y Prabavathy y colaboradores (2006) mencionan que en el caso del control biológico, la fusión de protoplastos es una herramienta de gran utilidad e importancia para la mejora genética y el desarrollo de nuevas cepas híbridas en hongos. Se ha demostrado que, gracias a esta técnica, especies de *Trichoderma* como, *T. reesei*, *T. koningii*, *T. harzianum* han sido mejoradas, dando lugar a una gran variabilidad de cepas para su uso en el control biológico.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el control biológico de *Fusarium* spp. mediante fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* e inducir el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antagónico de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.
- Determinar la capacidad inductora de crecimiento de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. en *Arabidopsis thaliana*.
- Aislar protoplastos de las cepas de *Trichoderma* spp.

- Fusionar protoplastos de las cepas de *Trichoderma* spp.
- Regenerar protoplastos fusionados de las cepas de *Trichoderma* spp.
- Evaluar el efecto antagónico de las cepas fusionadas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.
- Determinar la capacidad inductora de crecimiento de las cepas fusionadas de *Trichoderma* spp. en *Arabidopsis thaliana*.

1.4 Marco teórico

1.4.1. Género *Trichoderma*

1.4.1.1. Morfología y taxonomía

El género *Trichoderma* agrupa hongos que son filamentosos anamórficos o imperfectos (mitóticos), que de forma artificial se han clasificado en la división Deuteromicota, en la clase de los Hifomicetos. Su reproducción es de forma asexual, mediante un ciclo, el mismo que alterna micelios y esporas (conidios), dichas estructuras se forman a partir de células desnudas sin envoltura (Tijerino, 2010).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre una gran diversidad de sustratos y emiten grandes cantidades de conidios verdes, que excepcionalmente tienen una coloración blanca. Además de ser un organismo dominante en la microflora de suelos, lo cual se lo atribuye debido a que posee una gran capacidad metabólica y una naturaleza agresiva, permitiéndole competir y colonizar la rizósfera (Tijerino, 2010; Muñoz, 2012).

Tijerino en el año 2010 se refiere también a que los conidióforos son muy ramificados, están tabicados y sus células contienen más de un núcleo, mientras que los conidios son ovoides, con pared normalmente lisa y con un solo núcleo. Muñoz (2012) coincide y señala que en determinadas condiciones de estrés, sea nutricional o por desecación, se forman estructuras asexuales de resistencia sobre el micelio, conocidas como clamidosporas. Dichas estructuras son globosas a elipsoidales, hialinas, con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo.

Gomes (2002) señala que poco se conoce sobre la biología de muchas especies, como el ciclo de vida, modos de reproducción y recombinación, debido a que las características del hongo *Trichoderma* son muy variables. Sin embargo, Tijerino (2010) menciona que se ha descrito en algunos aislamientos un estado perfecto, sexual o teleomorfo (meiótico), dentro del género *Hypocrea* y en géneros relacionados tales como *Podostroma*, *Sarawakus*, *Aphysiostroma* y *Protocrea*, demostrando que especies de este género son derivados clonales de *Hypocrea*, que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual.

Con respecto a lo mencionado, se ha identificado a *Hypocrea lixii* como el estado teleomorfo de *Trichoderma harzianum*, *H. atroviridis* como teleomorfo de *T. atroviride*, e *H. virens* como teleomorfo de *T. virens*, tres de las especies del género más usadas en el biocontrol (Tijerino, 2010).

Muñoz en el año 2012 hace énfasis que el género *Trichoderma* posee alrededor de 104 especies, las cuales se encuentran divididas en 5 secciones, con varias colecciones. Tijerino (2010) menciona que existen trece grupos o “clades”: ceramica, harzianum, stromaticum, brevicompactum, viride, minutisporum, megalocitrina, lutea, semiorbis, chlorospora, strictipile y longibrachiatum, los mismos que se pueden observar en la figura 1.1.

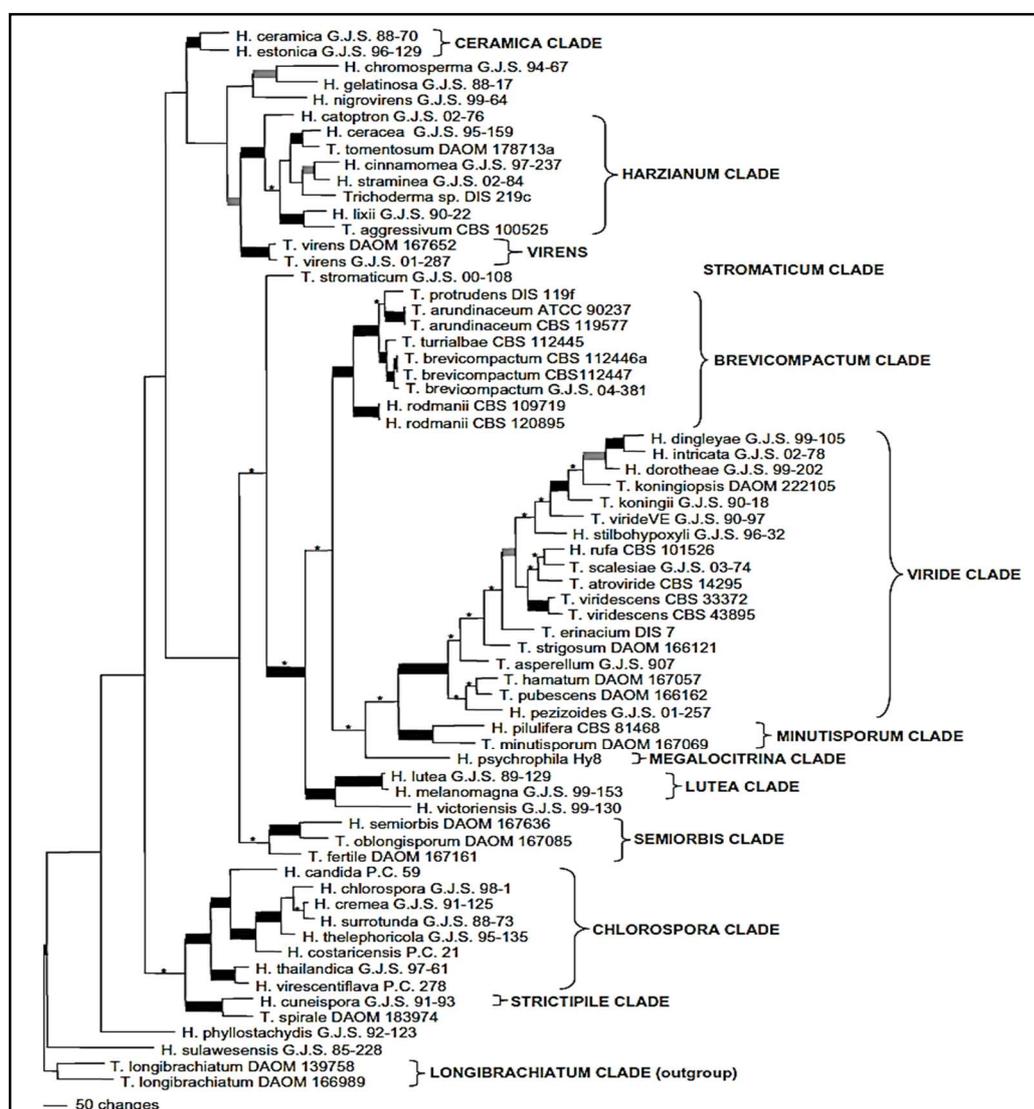


Figura 1.1: Clasificación molecular del género *Trichoderma*. Árbol filogenético muestra la clasificación molecular, tras un análisis filogenético de las secuencias de genes de la subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*), el factor de elongación de transcripción 1-a (*tef1*) y espaciadores de transcripción interna ITS1 e ITS2.

Fuente: (Tijerino, 2010).

1.4.1.2. Ecología

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, que se encuentra habitando normalmente los suelos forestales y agrícolas, principalmente los que son ricos en materia orgánica. Además, se encuentran sobre madera y tejidos vegetales en descomposición, y su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales permiten su rápida colonización (Muñoz, 2012).

Saito y colaboradores (2009) hacen énfasis que de los hongos con gran potencial antagonista, el género *Trichoderma* es uno de los más estudiados. Naturalmente está en el suelo, cumpliendo una importante función ecológica, ya que participa en la descomposición y desmineralización de residuos vegetales, contribuyendo de esta manera con la disponibilización de nutrientes para las plantas. Además es considerado como fungicida natural, puesto que reduce hasta en un 100% el riesgo de que algún hongo ataque al cultivo.

Trichoderma spp. es un exitoso colonizador de hábitats, reflejándose tanto en la eficiente utilización de sustratos, así como por su capacidad para la secreción de metabolitos antibióticos y enzimas. Son capaces de adaptarse a diferentes ambientes tales como, hábitats ricos y biodiversos, así como a la oscuridad y esterilidad de un fermentador biotecnológico; bajo dichas condiciones responden a su entorno, regulando su crecimiento, formando conidios, produciendo enzimas, y por lo tanto, acoplándose a las condiciones, tornándose así, de gran interés biotecnológico (Schuster, & Schmoll, 2010).

Tijerino (2010) menciona que *Trichoderma* en cuanto a los parámetros ambientales necesarios para su crecimiento, puede desarrollarse dentro de un amplio rango de temperaturas, siendo óptima y máxima, entre 26-28°C y 30-32°C, respectivamente. Los sustratos que puede utilizar son muy variados, prefiriendo suelos ácidos y ricos en materia orgánica, siendo el hierro un elemento esencial para su correcto desarrollo. Además, un aspecto muy importante de varias especies de *Trichoderma* es la resistencia relativa a numerosos fungicidas químicos utilizados en la agricultura, tales como los organoclorados de tipo endosulfano y bencimidazoles.

Un factor ambiental importante para su desarrollo es la presencia o ausencia de luz, puesto que según estudios, existen efectos sobre el crecimiento, reproducción, biosíntesis de metabolitos secundarios, así como también sobre la expresión de genes de celulasa (Schuster, & Schmoll, 2010).

1.4.2. Aplicaciones de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* al poseer gran cantidad de características benéficas, ha sido considerado como un organismo de gran interés, tanto comercial como industrial. Entre las cualidades que la caracteriza esta la producción de enzimas celulolíticas, por lo que comercialmente se la utiliza para elaboración de detergentes, alimentos, y en fermentaciones alcohólicas (Schuster, & Schmoll, 2010).

Tijerino en el año 2010 hace énfasis que las especies de este género son fuente de genes, por lo que la aplicación biotecnológica está dirigida hacia la obtención de

plantas transgénicas con resistencia a enfermedades y estreses abióticos. Además, *Trichoderma* poseen la capacidad de secretar proteínas, por lo que es una alternativa en la industria farmacéutica ya que es empleada como una fábrica celular.

Gomes (2002) menciona que especies del género *Trichoderma* son muy comunes en el medio ambiente, y han sido utilizadas para la producción de muchas exoenzimas a escala industrial. Algunas han sido estudiadas y utilizadas para el control biológico en fitopatologías, en procesos de biodegradación de compuestos clorofenólicos, y en biorremediación de suelos.

Algunas especies son importantes en la biorremediación, puesto que ayudan a liberar al suelo de metales pesados, así como también contaminantes hidrocarbúricos; mientras que otras son de gran utilidad en la agricultura como agentes de control biológico, entre las cuales se destacan *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. gamsii*, *T. viride* (Tijerino, 2010).

1.4.3. Mecanismos de acción en biocontrol

Trichoderma es un agente exitoso en el biocontrol, ya que se comporta como hiperparásito frente a fitopatógenos, valiéndose de varios mecanismos de acción que le permiten producir enzimas, antibióticos, competir por luz, espacio y nutrientes. Además, de favorecer la proliferación de otros microorganismos benéficos en la rizósfera (Muñoz, 2012).

Los mecanismos que posee el género *Trichoderma* como agente de biocontrol y en interacción con las plantas son varios: (a) antibiosis, el hongo produce antibióticos volátiles o no volátiles; (b) competencia, por espacio y/o nutrientes en la rizósfera; (c) micoparasitismo, parasita a hongo fitopatógeno excretando enzimas líticas. Y otros mecanismos que han sido poco estudiados tales como, (d) promoción de crecimiento de planta, aumenta la captación de nutrientes; (e) inducción de resistencia, estimula las defensas de la planta frente a patógenos (Mui, 1999; Tijerino, 2010).

Muñoz (2012) hace énfasis en que los mecanismos que presenta este hongo no son excluyentes uno del otro, puesto que pueden actuar de manera sinérgica en el biocontrol, y van a depender de la interacción planta-patógeno-antagonista, así como de las condiciones ambientales en las que se encuentren.

1.4.3.1. Antibiosis

La producción de compuestos antibióticos es característico de muchos hongos utilizados como agentes en control biológico. Muchas especies de *Trichoderma* producen diversos metabolitos secundarios con amplio espectro de actividad antimicrobiana, los mismos que ya son productos comerciales (Pereira, 2007).

Según Cholango en el año 2009 menciona que la antibiosis ocurre debido a que los metabolitos o antibióticos que produce *Trichoderma*, difusibles, de bajo peso molecular, interactúan con el patógeno, resultando tóxicos e impidiendo de esa manera su colonización.

Muñoz (2012) señala que este mecanismo permite que el biocontrolador inhiba al patógeno al liberar metabolitos, sin la necesidad de contacto físico; la producción de antibiótico va a depender de cada especie, así como la cantidad y tipo de compuestos dependerán de las condiciones ambientales.

1.4.3.2. Competencia

La competencia es importante en el control biológico, puesto que ocurre cuando dos o más microorganismos requieren un mismo recurso, sea nutrientes, espacio físico, luz, oxígeno, etc. *Trichoderma* es muy buen competidor, posee gran versatilidad metabólica lo cual le permite crecer en un amplio abanico de fuentes de carbono y nitrógeno. Además, compete por tejido necrótico, exudados vegetales, semillas, y heridas en la planta, evitando de esa manera la infección de los patógenos (Tijerino, 2010; Muñoz, 2012).

El hongo *Trichoderma* compete por los exudados liberados por las semillas, en el proceso de germinación de hongos patógenos en plantas. Además añade que por dichas características, es usado como agente en biocontrol puesto que tiene gran capacidad de desarrollarse en la rizósfera (Saito, *et al.*, 2009).

Según Pereira (2007) los microorganismos de control que tienen la capacidad de competir de forma efectiva por los sitios de infección, y usar los nutrientes disponibles, pueden excluir e impedir de manera eficaz la propagación de la infección por parte de los patógenos.

1.4.3.3. Micoparasitismo

Los primeros relatos que demostraron que los fitopatógenos podían ser parasitados, fueron realizados en la década de los treinta, y la mayoría de los estudios se refieren a especies de *Trichoderma*. Para este tipo de interacción es necesario que los microorganismos estén físicamente próximos (Pereira, 2007).

Tijerino (2010) define al micoparasitismo como una relación en la que un organismo establece con un hongo, resultando solo el hongo beneficiado, normalmente de nutrientes; muchas de las veces causando la muerte al huésped. Cuando esto ocurre se denomina necrotrófico, y se lo diferencia del biotrófico puesto que este último mantiene una relación de células vivas.

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso complejo que involucra eventos secuenciales, tales como, reconocimiento, ataque, penetración, y muerte del huésped. El crecimiento quimiotrófico es a partir de un estímulo químico que proviene del hongo diana, donde actúa una exoquitinasa extracelular, provocando la liberación de oligómeros de la pared de dicho hongo, y de esa manera es reconocido el fitopatógeno y por ende parasitado (Muñoz, 2012; Cholango, 2009).

Cholango en el año 2009 se refiere también a que *Trichoderma* se adhiere a los carbohidratos unidos a la pared del patógeno, lo enrosca, lo apresa, para posteriormente producir antibióticos y enzimas hidrolíticas que faciliten la entrada de las hifas dentro del lumen del hongo fitopatógeno, para de esa manera asimilar el contenido de la pared celular, parasitándolo así por completo.

1.4.3.4. Promoción de crecimiento

Ciertas cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de estimular el crecimiento y desarrollo, tanto de raíces como de plantas. Para explicar esto, se han sugerido mecanismos tales como, producción de factores de crecimiento y vitaminas, conversión de material no utilizable (zinc, hierro, manganeso, cobre) en formas asimilables para la planta. Adicionalmente, se menciona que la absorción de nutrientes y la eficiencia en el uso de nitrógeno se incrementa, así como también se mejoran los procesos de fotosíntesis, respiración y metabolismo de carbohidratos (Tijerino, 2010; Muñoz, 2012).

Muñoz (2012) hace énfasis en que se ha determinado que la presencia de dicho hongo en las plantas, mejora su desarrollo en la raíz, superficie foliar, ayuda en la floración, incrementa la longitud y peso seco de la planta. Se menciona además, que este fenómeno ocurre ya que *Trichoderma* al proteger a la planta de patógenos, permite que la energía se destine únicamente al crecimiento.

1.4.3.5. Inducción de resistencia

Las plantas superiores son capaces de defenderse frente a fitopatógenos, para prevenir el desarrollo de los mismos, a través de la inducción de diversos mecanismos físicos y bioquímicos. Las encargadas de la inducción, son moléculas o agentes inductores que son desencadenados debido a la presencia del biocontrolador (Pereira, 2007).

Trichoderma es un microorganismo que protege a la planta de patógenos de la raíz, sin embargo, se ha demostrado que la asociación de *Trichoderma* con las raíces estimula los mecanismos de defensa de la planta, provocando resistencia a varios fitopatógenos e incluso algunos nemátodos. La respuesta está dada por expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con patogénesis, además de la secreción de peroxidasa y síntesis de fitoalexinas (Tijerino, 2010).

Se ha demostrado que *Trichoderma* es simbiote de plantas oportunistas y que mejora la resistencia sistémica de las mismas, debido a la acción mediada por proteínas de la familia ceratoplatanina. La transducción de señales incluyen a la proteína G heterotrimérica, cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Esta interacción, así como la competencia en la rizósfera, contribuye con la protección de las plantas frente a sustancias tóxicas, puesto que *Trichoderma* muestra resistencia doble a dichas sustancias (Schuster, & Schmoll, 2010).

Tijerino en el año 2010 hace énfasis en otras propiedades que han sido identificadas en *Trichoderma*, tales como la resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico y a cambios nutricionales. Recientes estudios demuestran que algunas cepas pueden regular los niveles de auxinas en la rizósfera, estimular el crecimiento, proteger el sistema radicular e inducir la defensa sistémica frente a patógenos.

1.4.4. Importancia de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es un importante organismo modelo para el estudio de la biología, fisiología, y genética de las plantas. Además, es usada debido a que el tiempo de germinación en laboratorio es corto, produce gran número de semillas, y su reproducción principalmente es por autofecundación (François, *et al.*, 2008).

La comunidad científica, para agilizar los estudios genómicos y moleculares de plantas, ha elegido a *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio. Pertenece a la familia de las crucíferas, relacionada a plantas comestibles tales como brócoli, col, coliflor, coles de Bruselas, nabos, rábanos. Con frecuencia se describe como nativa de regiones de Asia, Europa y el Norte de África, aunque ha sido introducida en Norteamérica y Australia (Álvarez, *et al.*, 2010).

François y colaboradores (2008) mencionan que *A. thaliana* últimamente ha sido parte del grupo de las malas hierbas de Europa, que han invadido otras partes del mundo, como se mencionó anteriormente. Se sabe relativamente poco respecto a la propagación prehistórica de la especie en Europa, debido a que su polen es muy similar a la de otras especies de Brassicaceae.

Esta planta presenta varias ventajas que agilizan su investigación, crece aproximadamente 30 centímetros, por lo que es posible obtener un gran número en espacio reducido. Además, su ciclo de vida es relativamente corto, alrededor de seis a ocho semanas, produciendo alrededor de 10.000 semillas por planta. Es diploide, se

autofertiliza, lo cual facilita mantener las líneas y realizar cruzas controladas; en el mundo existen diferentes variantes o ecotipos, que viven en condiciones ambientales diferentes, lo cual la convierte aún más valiosa puesto que de esa manera se puede estudiar diversas características (Álvarez, *et al.*, 2010).

El genoma se encuentra organizado en cinco cromosomas, siendo uno de los más pequeños que se ha encontrado en plantas, posee 125 Mb, poco más de 20 veces el de *E. coli*, 10 veces el de *S. cerevisiae*, y similar al de *Drosophila melanogaster*, es fácilmente transformable empleando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Además, se estima que codifica para más de 33.000 genes, casi el mismo número de genes que poseemos los humanos (Álvarez, *et al.*, 2010).

1.4.5. Generalidades de *Fusarium* spp.

Uno de los microorganismos que se encuentran comúnmente en plantas superiores es *Fusarium* spp., siendo uno de los hongos más ubicuos en el ecosistemas de la tierra. Son patógenos importantes de plantas, ya que infectan gran diversidad de hospederos, y se encuentran en una incomparable cantidad de hábitats, causando un sinnúmero de enfermedades (Ploetz, 2005).

Debido al gran daño que causa este hongo a las plantaciones, ha recibido enorme cantidad de atención por parte de los agricultores; la mayoría de cultivos que han sido priorizados son los anuales, un buen ejemplo es el trigo. *Fusarium* ha sido

citado como uno de los responsables de las seis enfermedades más importantes de plantas, además de ser responsable de cuantiosas pérdidas económicas (Ploetz, 2005).

1.4.6. Fusión de protoplastos

En la década de 1950-1960 se desarrolló esta técnica, a partir de la observación de que ciertos virus podían inducir fusión de células animales, sin embargo, en la década de 1980-1990 tuvo auge debido a la aparición de métodos químicos y eléctricos apropiados para fusionar células (Polci, & Friedrich, 2010).

López en el año 2012 hace énfasis que la técnica de fusión de protoplastos es una técnica de biotecnología, la cual surge como especialidad a partir de la técnica de aislamiento y cultivo de protoplastos, permitiendo la obtención de células desprovistas de pared celular gracias a la acción de enzimas líticas obtenidas de microorganismos tales como: *Aspergillus* spp., *Trichoderma viride*, *Rhizopus* spp.

Dicha técnica permite la fusión de las membranas, de dos o más células, para dar lugar a un híbrido somático; es ampliamente empleada para introducir variabilidad en las cepas de interés biotecnológico. Comúnmente se realiza con protoplastos vegetales, pero también puede efectuarse en otros taxones, tal es el caso de algunos hongos (Polci, & Friedrich, 2010).

López (2012) menciona que para aumentar la eficiencia en cuanto a la fusión se refiere, es necesario dirigir el proceso mediante sistemas adecuados de inducción,

los cuales pueden ser de dos tipos: *Químicos*, se utilizan sustancias aglutinantes como el polietilenglicol (PEG) o el dimetilsulfóxido (DMSO); y *Físicos*, tales como la electrofusión que utiliza corriente alterna de alta frecuencia para fusionar a las células.

Cabe destacar que el método de fusión de protoplastos no sólo sirve para obtener un mejoramiento genético, e híbridos somáticos, sino que permite además, incorporar de manera apropiada el ADN exógeno, de tal manera que se transfieran caracteres sin necesidad de contar con un conocimiento exacto y detallado de los mecanismos moleculares que determinan su expresión (Polci, & Friedrich, 2010).

1.4.6.1. Tipos de híbridos somáticos

Posterior a la fusión de protoplastos, se obtienen células con el aporte de cromosomas de dos o más núcleos; si los protoplastos fusionados proceden de distintos parentales forman heterocariones, y si provienen del mismo parental originan homocariones. Cuando en el heterocarión ocurre fusión de los núcleos (cariogamia), el producto es una célula híbrida (Polci, & Friedrich, 2010).

Según Polci & Friedrich (2010), un organismo puede regenerarse a partir de una célula híbrida, que contenga dos genomas completos, y dependiendo de cuál haya sido el destino del material genético nuclear, pueden ser de tres tipos, los cuales se los puede observar en la figura 1.2:

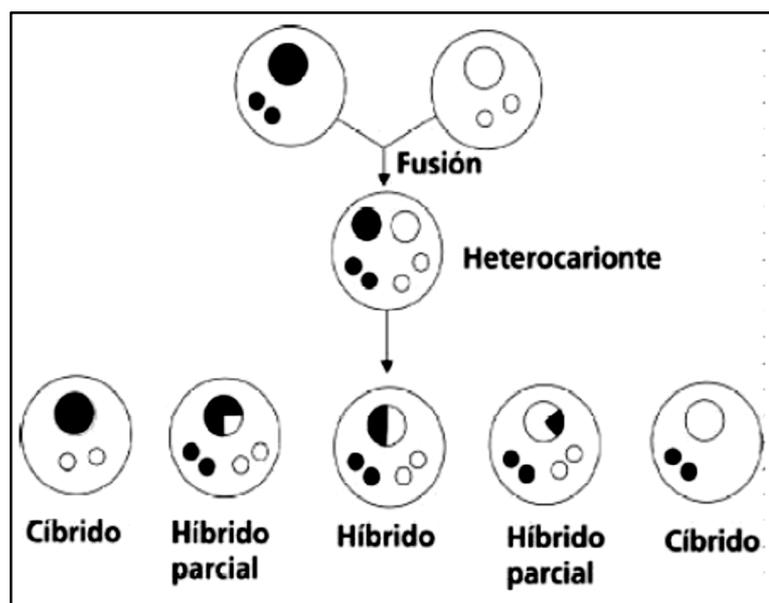


Figura 1.2: Tipos de híbridos somáticos. Destino del material genético nuclear y extranuclear, producto de la fusión de protoplastos.

Fuente: (Polci, & Friedrich, 2010).

- Híbrido simétrico, posee el genoma nuclear completo de los parentales.
- Híbrido asimétrico, posee el genoma nuclear completo de un parental, y una parte del otro parental.
- Cíbrido, posee el genoma nuclear completo de un parental, y sólo el material genético extracelular del otro parental.

1.5 Hipótesis

La fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* da como resultado nuevas cepas que inhiben en forma significativa el crecimiento de *Fusarium* spp. e inducen el crecimiento de *A. thaliana*.

Cultivos duales

H₀: No existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp. sometido a cultivos duales con cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

H_A: Existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp. sometido a cultivos duales con cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

Filtrados fúngicos

H₀: No existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp. sometido a los filtrados fúngicos de cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

H_A: Existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp. sometido a los filtrados fúngicos de cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

Promoción de crecimiento

H₀: No existe diferencia significativa en el tamaño de *A. thaliana* tratada con cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

H_A: Existe diferencia significativa en el tamaño de *A. thaliana* tratada con cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE con la dirección de la Dra. Karina Proaño, Ph.D. y la codirección del Ing-Mat. Pedro Romero Saker, junto con la Universidad San Francisco de Quito con el apoyo del Dr. Antonio León-Reyes, Ph.D., son los participantes del presente proyecto.

2.2 Zona de estudio

El presente proyecto de investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología Agrícola y de Alimentos, y en el de Control de Plagas, del Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición de la Universidad San Francisco de Quito, ubicada en la Av. Diego de Robles y Vía Interoceánica. Cumbayá, provincia de Pichincha, 0°11'46"S 78°26'08"O.

2.3 Duración de la investigación

El tiempo aproximado para culminar la presente investigación fue de 9 meses.

2.4 Diseño experimental

Para analizar la inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp., y la inducción de crecimiento de *A. thaliana*, por parte de las cepas de *Trichoderma*, se establecieron fases para el diseño experimental.

2.4.1 Fase uno

Estudio de la factibilidad de las cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*, para inhibir el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp.

2.4.1.1 Diseño experimental

El diseño experimental que se empleó fue un diseño completamente al azar (DCA), ya que se analizaron los crecimientos radiales del patógeno, tanto en los cultivos duales como en los controles, para determinar el porcentaje de inhibición de las cepas de *Trichoderma* frente *Fusarium* spp.

2.4.1.2 Tratamientos

Se llevaron a cabo 28 tratamientos, debido a que se evaluaron a los dos parentales y a las 26 nuevas cepas producto de la fusión de protoplastos, además de los controles de *Fusarium* spp.

2.4.1.3 Repeticiones

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

2.4.1.4 Unidad experimental

Las unidades experimentales para seleccionar a las mejores cepas como controladores biológicos de *Fusarium* spp. fueron cajas Petri. Se obtuvieron un total de 84 unidades experimentales.

2.4.1.5 Variables

Variable de respuesta: La variable de respuesta fue el radio (cm) del crecimiento de *Fusarium* spp. en la caja Petri, después de siete días de incubación a $(27 \pm 2$ °C).

2.4.1.6 Modelo estadístico

Para el modelo estadístico lineal completamente al azar, el diseño está dado por:

$$Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, r$$

Donde Y_{ij} es la observación del j -ésimo tratamiento, μ_i es la media del i -ésimo tratamiento, ε_{ij} es el error experimental de la unidad ij .

El análisis estadístico consistió en efectuar un análisis de varianza (ANOVA), prueba de significancia según el método de Tukey para diferenciar entre tratamientos.

2.4.1.7 Error aleatorio y experimental

Se consideró error aleatorio a la variabilidad producida por la temperatura y humedad, mientras que el error experimental se consideró a la variabilidad debido a la manipulación de las unidades experimentales durante el proceso, por parte de mi persona como investigador.

2.4.2 Fase dos

Estudio de la factibilidad de los filtrados fúngicos de las cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*, para inhibir el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* spp.

2.4.2.1 Diseño experimental

El diseño experimental que se empleó fue un diseño completamente al azar (DCA), ya que se analizaron los crecimientos radiales del patógeno, tanto en los cultivos de filtrados fúngicos como en los controles, para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento por parte de los filtrados de las cepas de *Trichoderma*.

2.4.2.2 Tratamientos

Se llevaron a cabo 28 tratamientos, debido a que se evaluaron a los dos parentales y a las 26 nuevas cepas producto de la fusión de protoplastos, además de los controles de *Fusarium* spp.

2.4.2.3 Repeticiones

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

2.4.2.4 Unidad experimental

Las unidades experimentales para seleccionar a las mejores cepas como controladores biológicos de *Fusarium* spp. fueron cajas Petri. Se obtuvieron un total de 84 unidades experimentales.

2.4.2.5 Variables

Variable de respuesta: La variable de respuesta fue el radio (cm) del crecimiento de *Fusarium* spp. en la caja Petri, después de siete días de incubación a (27 ± 2 °C).

2.4.2.6 Modelo estadístico

Para el modelo estadístico lineal completamente al azar, el diseño está dado por:

$$Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, r$$

Donde Y_{ij} es la observación del j -ésimo tratamiento, μ_i es la media del i -ésimo tratamiento, ε_{ij} es el error experimental de la unidad ij .

El análisis estadístico consistió en efectuar un análisis de varianza (ANOVA), prueba de significancia según el método de Tukey para diferenciar entre tratamientos.

2.4.2.7 Error aleatorio y experimental

Se consideró error aleatorio a la variabilidad producida por la temperatura y humedad, mientras que el error experimental se consideró a la variabilidad debido a la manipulación de las unidades experimentales durante el proceso, por parte de mi persona como investigador.

2.4.3 Fase tres

Estudio de la factibilidad de las cepas parentales y fusionadas, para inducir el crecimiento de *A. thaliana*.

2.4.3.1 Diseño experimental

El diseño experimental que se empleó fue un diseño completamente al azar (DCA), ya que se analizaron los tamaños de planta, tanto de las que fueron inoculadas con *Trichoderma*, como de los controles, para determinar el porcentaje de inducción de crecimiento por parte de las cepas de *Trichoderma*.

2.4.3.2 Tratamientos

Se llevaron a cabo 28 tratamientos, debido a que se evaluaron a los dos parentales y a las 26 nuevas cepas producto de la fusión de protoplastos, además de los controles de *Fusarium* spp.

2.4.3.3 Repeticiones

Para este ensayo se realizaron diez repeticiones por cada tratamiento.

2.4.3.4 Unidad experimental

Las unidades experimentales para seleccionar a las mejores cepas como inductores de crecimiento, fueron plantas de *A. thaliana* de la línea Col-0, que estuvieron en semilleros de plástico. Se obtuvieron un total de 280 unidades experimentales.

2.4.3.5 Variables

Variable de respuesta: La variable de respuesta fue el tamaño de planta (cm) en los semilleros de plástico, después de cinco semanas de haber germinado.

2.4.3.6 Modelo estadístico

Para el modelo estadístico lineal completamente al azar, el diseño está dado por:

$$Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, r$$

Donde Y_{ij} es la observación del j -ésimo tratamiento, μ_i es la media del i -ésimo tratamiento, ε_{ij} es el error experimental de la unidad ij .

El análisis estadístico consistirá en efectuar un análisis de varianza (ANOVA), prueba de significancia según el método de Tukey para diferenciar entre tratamientos.

2.4.3.7 Error aleatorio y experimental

Se consideró error aleatorio a la variabilidad producida por la luz, agua, nutrientes, mientras que el error experimental se consideró a la variabilidad debido a la manipulación de las unidades experimentales durante el proceso, por parte de mi persona como investigador.

2.4.4 Interpretación

Se interpretaron los resultados con el fin de seleccionar a la mejor cepa de *Trichoderma* como inhibidor del fitopatógeno *Fusarium* spp., y como inductora de crecimiento de *A. thaliana*.

2.5 Metodología

2.5.1 Material biológico

2.5.1.1 Biocontrolador

Se utilizaron dos cepas nativas de *Trichoderma*, *T. harzianum* y *T. asperellum*, que fueron aisladas de suelos orgánicos de cinco fincas de la región sierra del Ecuador, en los Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos, y en el de manejo integrado de plagas, de la Universidad San Francisco de Quito, por Muñoz en el año 2012.

2.5.1.2 Fitopatógeno

El patógeno *Fusarium* spp. fue proporcionado por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) estación experimental Santa Catalina, para un proyecto anterior realizado en la USFQ.

2.5.1.3 Material vegetal

Las plantas *wild-type* de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) que se utilizaron para el presente estudio, se obtuvieron a partir de sus semillas, las mismas que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de alimentos de la Universidad San Francisco de Quito.

2.5.2 Evaluación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp.

2.5.2.1 Pruebas antagónicas a través de cultivos duales

Para evaluar el efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma*, se procedió a 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, como se muestra en la figura 2.1. 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).

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, mediante la fórmula de Dennis y Webster que se muestra a continuación:

$$\%IC = \left\{ \frac{(C-T)}{C} \right\} * 100$$

Donde, C es el crecimiento radial promedio del patógeno control en cm, y T es el crecimiento radial promedio del patógeno en la caja Petri del cultivo dual (Rasu, 2012).

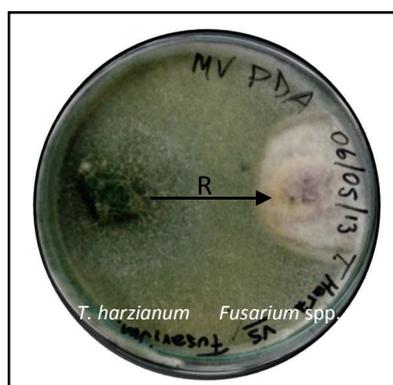


Figura 2.1: Fotografía de prueba antagónica. Cultivo dual entre *Trichoderma harzianum* y *Fusarium* spp.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Para todos los ensayos de cultivos duales, se inoculó el patógeno *Fusarium* spp. con 24 horas de anterioridad en el medio PDA, debido a que su crecimiento es más lento que el de *Trichoderma* spp. (Muñoz, 2012).

2.5.2.2 Pruebas antagónicas a través de filtrados fúngicos

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 (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 um 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, como se puede observar en la figura 2.2. 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).

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, mediante la fórmula de Dennis y Webster que se muestra a continuación:

$$\%IC = \left\{ \frac{(C-T)}{C} \right\} * 100$$

Donde, C es el crecimiento radial promedio del patógeno control en cm, y T es el crecimiento radial promedio del patógeno en la caja Petri (Rasu, 2012).

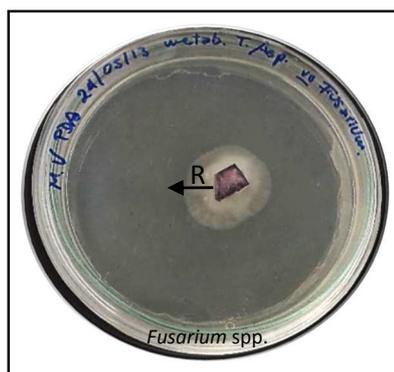


Figura 2.2: Fotografía de prueba antagonica. Filtrados fúngicos de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium* spp.
Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

2.5.3 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 um 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, observándose como la figura 2.3. 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. Para este ensayo se realizaron diez repeticiones, y se determinó el tamaño de tallo de la planta.



Figura 2.3: Fotografía de filtrados fúngicos de *T. asperellum* en *A. thaliana*. Crecimiento de planta en medio Murashige & Skoog con filtrados fúngicos de cepa parental *T. asperellum*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

2.5.4 Técnica de fusión de protoplastos

2.5.4.1 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 independientes, 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).

2.5.4.2 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).

2.5.4.3 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).

2.5.5 Bioensayos

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

Para evaluar el efecto *in vivo* de las cepas parentales de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*, se procedió a 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.

La unidad experimental fue *A. thaliana*, constando de 10 repeticiones cada tratamiento, y se evaluó desde la tercera hasta la quinta semana, el parámetro longitud (cm) de la planta. A continuación en la figura 2.4 se pueden observar los bioensayos al respecto.



Figura 2.4: Fotografía de bioensayo en plantas de *A. thaliana*. Bioensayo con cepas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* para inducción de crecimiento.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

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

Para evaluar el efecto *in vivo* de los filtrados fúngicos de *T. harzianum* sobre el crecimiento de *A. thaliana*, se procedió a 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 um 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.

La unidad experimental fue *A. thaliana*, constando de 10 repeticiones cada tratamiento, y se evaluó desde la tercera hasta la quinta semana, el parámetro longitud (cm) de la planta. A continuación en la figura 2.5 se pueden observar los bioensayos al respecto.



Figura 2.5: Fotografía de bioensayo en plantas de *A. thaliana*. Bioensayo con filtrados fúngicos de *Trichoderma harzianum*, a concentraciones del 10%, 20%, 30%, 40%.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

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

Para evaluar el efecto *in vivo* de las cepas fusionadas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*, se procedió a 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.

La unidad experimental fue *A. thaliana*, constando de 10 repeticiones cada tratamiento, y se evaluó a la quinta semana, el parámetro longitud (cm) de la planta. A continuación en la figura 2.6 se pueden observar los bioensayos al respecto.



Figura 2.6: Fotografía de bioensayo en plantas de *A. thaliana*. Bioensayo con cepas fusionadas para inducción de crecimiento.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Evaluación *in vitro* de las cepas parentales de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp.

3.1.1 Pruebas antagónicas a través de cultivos duales

Al evaluar el efecto antagónico *in vitro* de las cepas parentales de *Trichoderma*, *T. harzianum* y *T. asperellum* en los cultivos duales frente a *Fusarium* spp., se determinó la inhibición del patógeno. Por parte del primer parental mencionado la inhibición fue de 69.51%, mientras que por parte del otro fue de 87.80%, en comparación con el control. Además, se observó que *T. harzianum* liberaba metabolitos al medio, ya que la coloración del medio cambió de color crema blanquecino a amarillento, mientras que *T. asperellum* no lo hizo (Fig. 3.1).

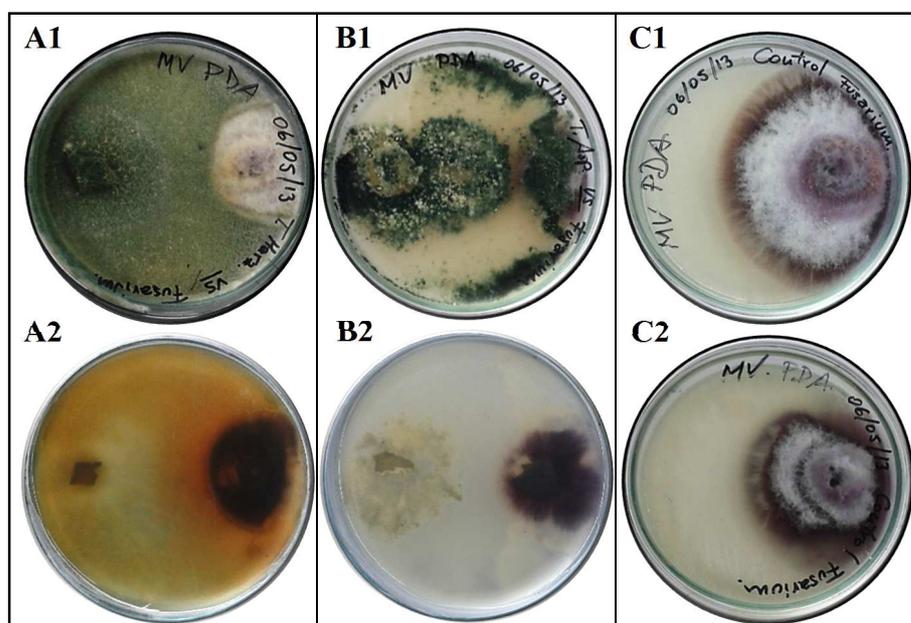


Figura 3.1: Fotografías de evaluación de cultivos duales de cepas parentales. A1) *T. harzianum* vs. *Fusarium* spp. A2) *T. harzianum* libera metabolitos B1) *T. asperellum* vs. *Fusarium* spp. B2) *T. asperellum* no libera metabolitos C1,C2) Controles de *Fusarium* spp.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de inoculación en los cultivos duales de las cepas de *Trichoderma* frente al fitopatógeno *Fusarium* spp., se determinó diferencias significativas entre los parentales. El análisis de varianzas (ANOVA) con la prueba de Tukey considera a *T. asperellum* como mejor biocontrolador en el ensayo de cultivos duales, puesto que el crecimiento del patógeno fue apenas del 12.19% con respecto al control, como se puede observar en la figura 3.2.

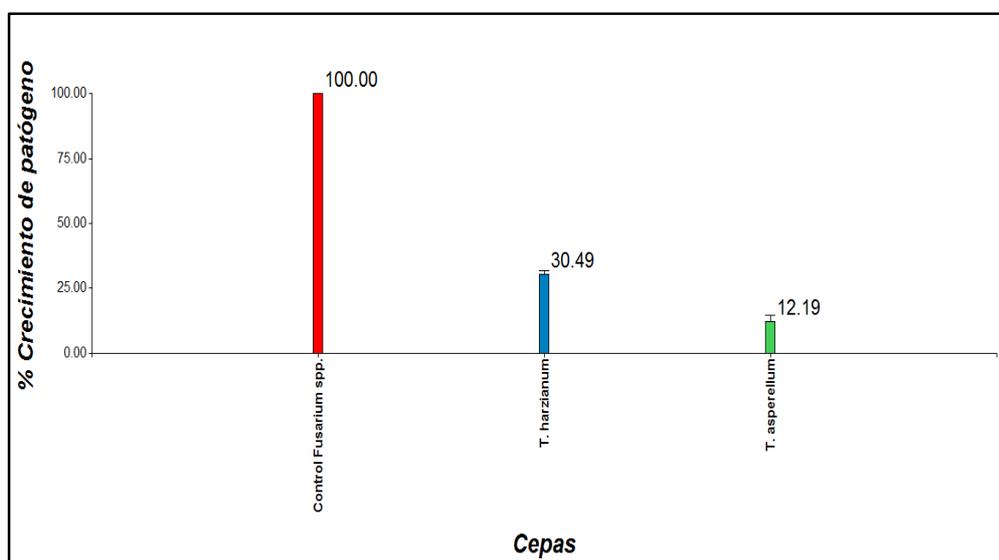


Figura 3.2: Gráfica de evaluación de cepas parentales de *Trichoderma* en cultivos duales frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de *T. harzianum* y *T. asperellum*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

3.1.2 Pruebas antagónicas a través de filtrados fúngicos

Al evaluar el crecimiento radial *in vitro* del patógeno *Fusarium* spp. en presencia de los filtrados fúngicos de las cepas parentales de *Trichoderma*, se determinó que, los metabolitos de *T. harzianum* lo inhibieron en un 79.44%, mientras

que los de *T. asperellum* en un 33.24%, en comparación con el control; evitando de esa manera su proliferación en la caja Petri (Fig. 3.3).

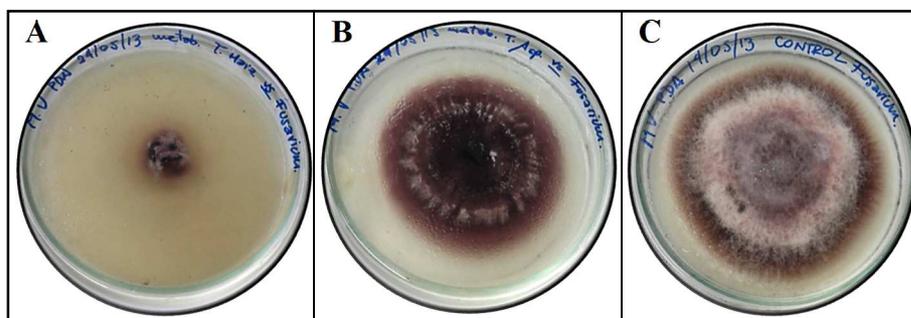


Figura 3.3: Fotografías de evaluación de filtrados fúngicos de cepas parentales frente a *Fusarium* spp. A) Filtrados de *T. harzianum* B) Filtrados de *T. asperellum* C) Control de *Fusarium* spp.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de inoculación del patógeno *Fusarium* spp. en presencia de los filtrados fúngicos de las cepas de *Trichoderma*, se observó diferencias significativas entre los parentales, en cuanto al efecto que causaron sus filtrados. Mediante el análisis de varianzas (ANOVA), se pudo determinar que los filtrados del parental *T. harzianum* inhibieron significativamente el crecimiento de *Fusarium* spp., de tal manera que su desarrollo fue apenas del 20.56 % en relación al control (Fig. 3.4).

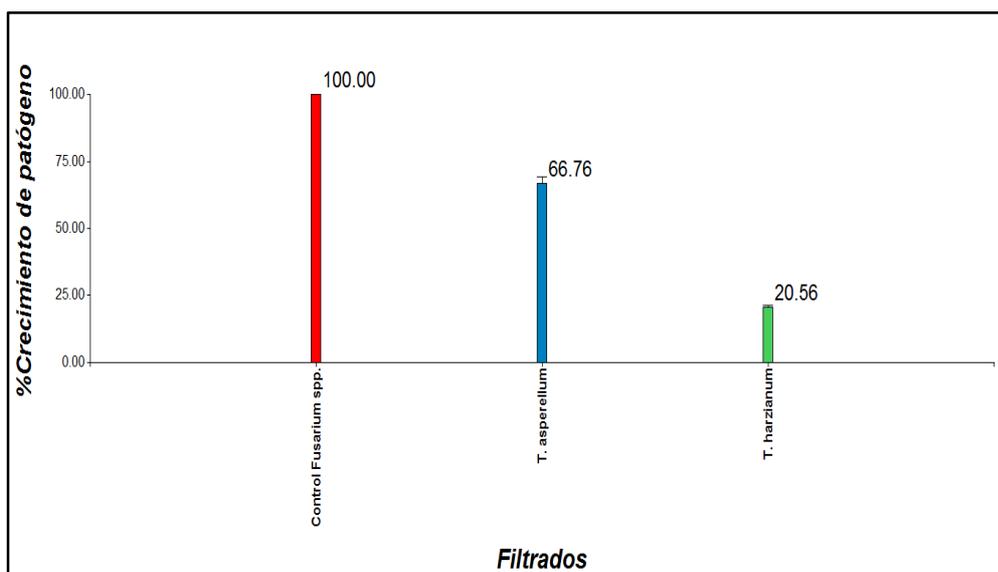


Figura 3.4: Gráfica de evaluación de filtrados fúngicos de las cepas parentales de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de filtrados de *T. harzianum* y *T. asperellum*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

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

Al momento de evaluar el crecimiento de *A. thaliana in vitro* en medio MS, bajo la influencia de los filtrados de *Trichoderma*, 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. 3.5).

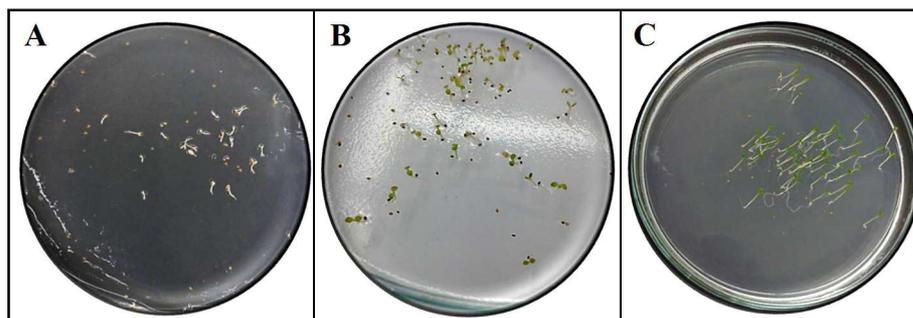


Figura 3.5: Fotografías de evaluación de crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de cepas parentales de *Trichoderma*. A) Filtrados de *T. harzianum* B) Filtrados de *T. asperellum* C) Control *A. thaliana*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de haber germinado las semillas de *A. thaliana* de la línea Col-0, en el medio MS que contenía filtrados fúngicos de las cepas parentales de *Trichoderma*, se determinaron diferencias altamente significativas en cuanto al tamaño de planta, observándose inhibición en su crecimiento, con respecto al control. Los filtrados tanto de *T. harzianum* como de *T. asperellum* ocasionaron dicho comportamiento, el mismo que se puede observar en la figura 3.6.

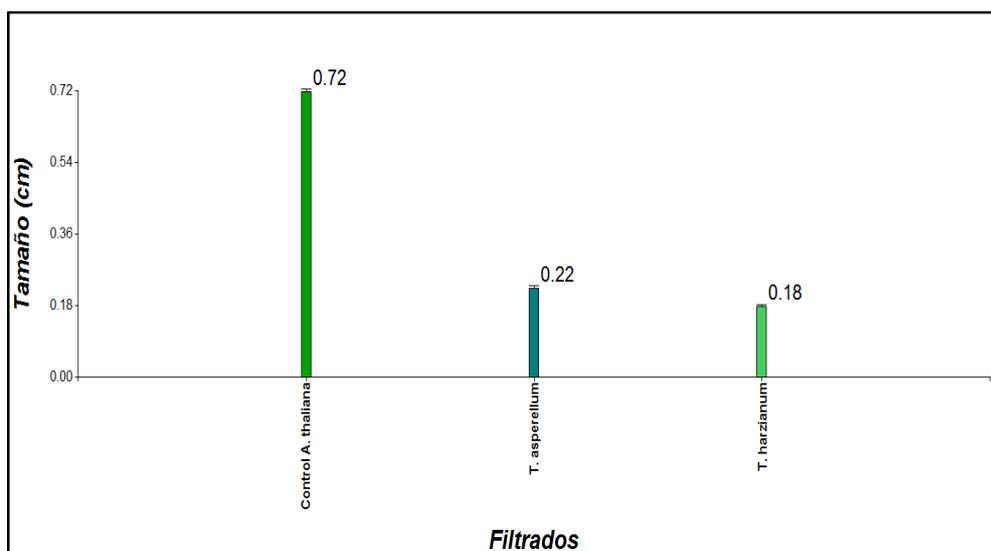


Figura 3.6: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de cepas parentales de *Trichoderma*. Tamaño de plantas en cm, sembradas en medio MS.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

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

Posterior a realizar la fusión de protoplastos con la metodología mencionada en el apartado 2.5.5, se logró aislar 26 nuevas cepas del medio de cultivo SPDA, las mismas que se inocularon en medio PDA para su conservación y proliferación. A continuación, en la figura 3.7 se pueden observar las regiones de las cuales fueron aisladas las cepas evaluadas.

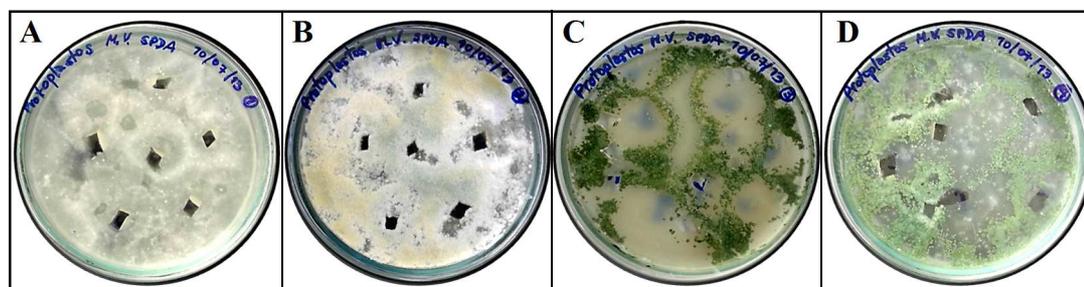


Figura 3.7: Fotografías con vista superior de cajas Petri de las regiones donde se aislaron las cepas fusionadas. A) Caja Petri 1 B) Caja Petri 2 C) Caja Petri 3 D) Caja Petri 4.

Elaborado por: (Villaruel, Mauricio).

En la figura 3.8 se pueden observar las regiones de las cuales fueron aisladas las cepas evaluadas, pero con vista inferior de la caja Petri.

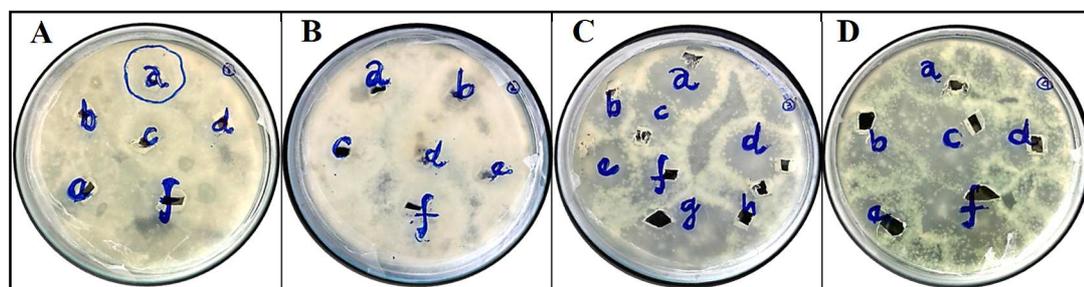


Figura 3.8: Fotografías con vista inferior de cajas Petri de las regiones donde se aislaron las cepas fusionadas. A) Caja Petri 1 B) Caja Petri 2 C) Caja Petri 3 D) Caja Petri 4.

Elaborado por: (Villaruel, Mauricio).

Las nuevas cepas que se aislaron de las regiones mostradas en las figuras 3.7 y 3.8 se las agrupó 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.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

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
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

Las cepas con la nomenclatura como se muestra en la tabla 3.1, fueron inoculadas individualmente en medio PDA para su posterior estudio. Macroscópicamente se observaron diferencias entre ellas, tanto en la forma de esporular, como en la coloración de sus micelios.

Las variaciones en la esporulación presentaron distintas formas tales como, redondeadas, elipsoidales, y ovoides, mientras que respecto a la coloración se observaron variaciones que van desde blanquecinas hasta diferentes tonos de verde. A continuación, en la figura 3.9 se muestran a ocho de las nuevas cepas fusionadas.

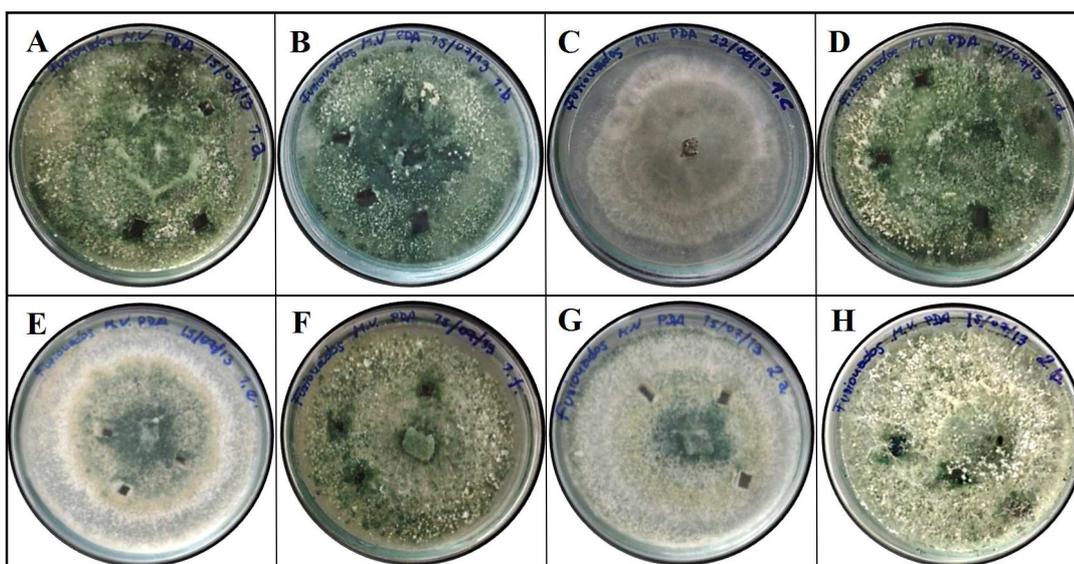


Figura 3.9: Fotografías de las cepas fusionadas de *Trichoderma*. A) 1.a B) 1.b C) 1.c D) 1.d E) 1.e F) 1.f G) 2.a H) 2.b.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

A continuación, en la figura 3.10 se muestran a 18 de las nuevas cepas fusionadas.

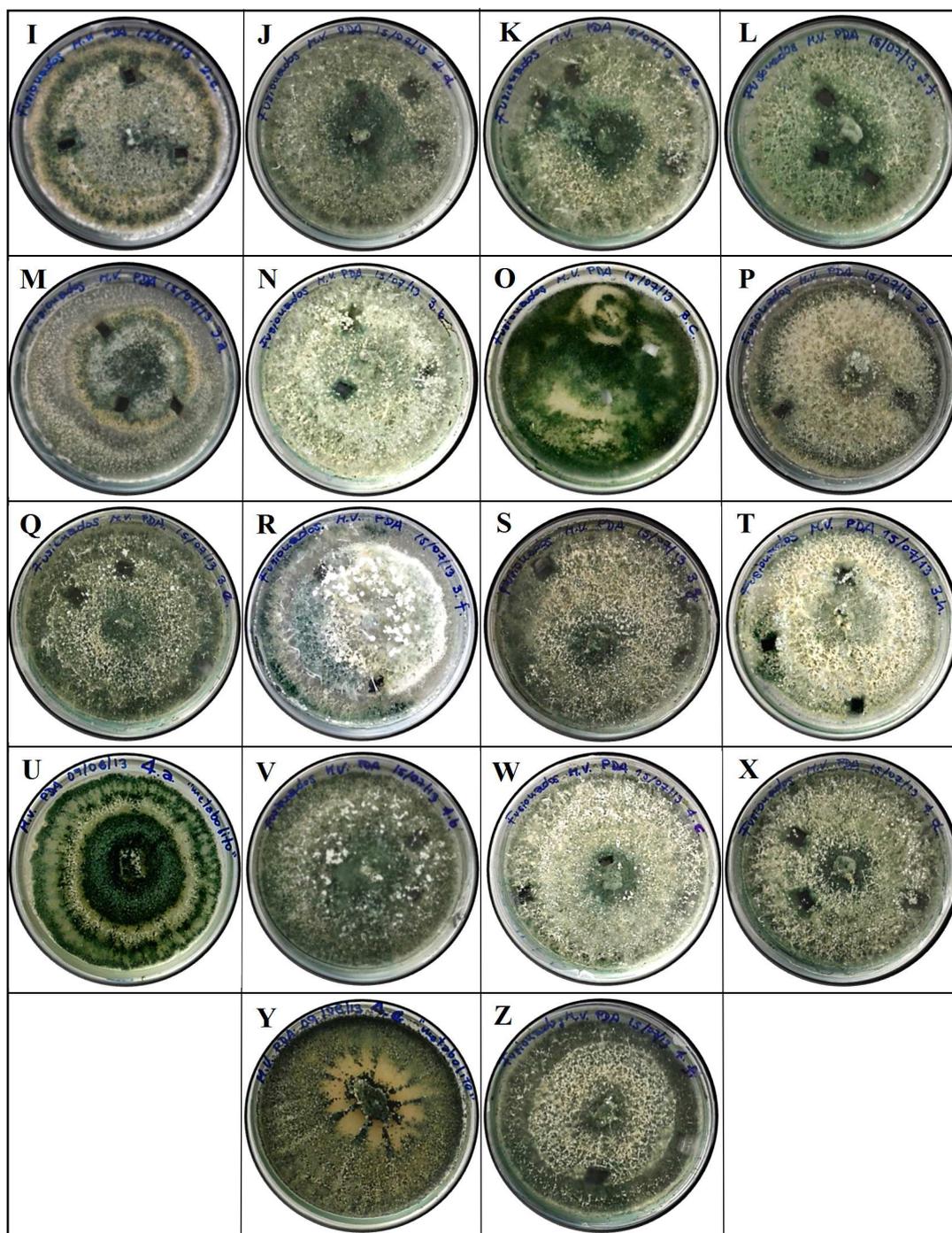


Figura 3.10: Fotografías de las cepas fusionadas de *Trichoderma*. I) 2.c J) 2.d K) 2.e L) 2.f M) 3.a N) 3.b O) 3.c P) 3.d Q) 3.e R) 3.f S) 3.g T) 3.h U) 4.a V) 4.b W) 4.c X) 4.d Y) 4.e Z) 4.f.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

La evidencia de la fusión se pudo capturar con microscopio óptico (Fig. 3.11).



Figura 3.11: Fotografía de la fusión de protoplastos vista en 100X.
Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

3.4 Evaluación *in vitro* de las cepas fusionadas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp.

3.4.1 Pruebas antagónicas a través de cultivos duales

Cuando se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de las cepas fusionadas de *Trichoderma* en los cultivos duales frente a *Fusarium* spp., se observó que 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%.

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de inoculación en los cultivos duales de las cepas fusionadas frente al fitopatógeno *Fusarium* spp., se determinaron grupos, de acuerdo a su inhibición y varianzas con respecto al crecimiento del

patógeno. Para clasificar a las mejores, se incluyó a los parentales dentro del análisis, y de esa manera se obtuvo cuatro grupos estadísticamente diferentes.

En dos de los grupos, se determinó que *Fusarium* spp. se desarrolló de manera similar, incluso frente al parental *T. harzianum*, aunque frente a cuatro de las cepas fusionadas su crecimiento 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. Los datos correspondientes se encuentran en la figura 3.12.

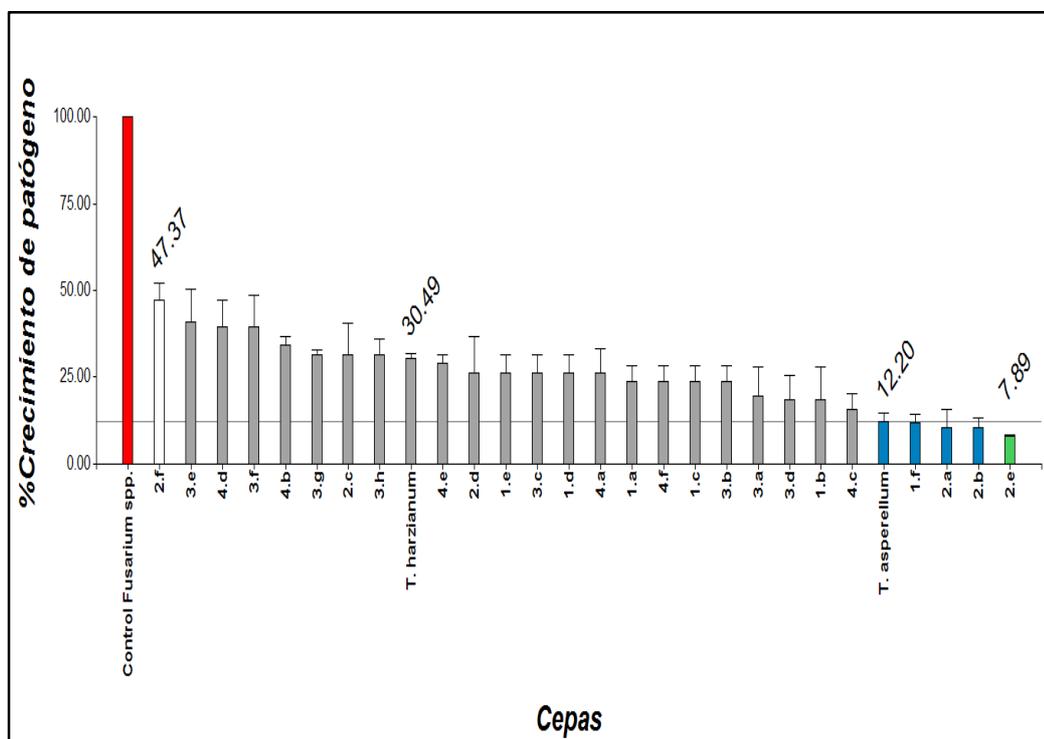


Figura 3.12: Gráfica de evaluación de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

3.4.2 Pruebas antagónicas a través de filtrados fúngicos

Al evaluar el efecto *in vitro* de los filtrados de las cepas fusionadas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp., se determinó que la gran mayoría 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%.

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de inoculación del patógeno, en presencia de los filtrados fúngicos de las cepas fusionadas de *Trichoderma*, se determinaron grupos estadísticamente significativos, de acuerdo a la varianza y la inhibición con respecto al crecimiento del patógeno. Para clasificarlas, se incluyó a los parentales dentro del análisis, obteniéndose de esta manera cuatro grupos estadísticamente diferentes con respecto al control.

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, y a la mayoría de fusionados. A continuación, en la figura 3.13 se pueden observar los resultados al respecto.

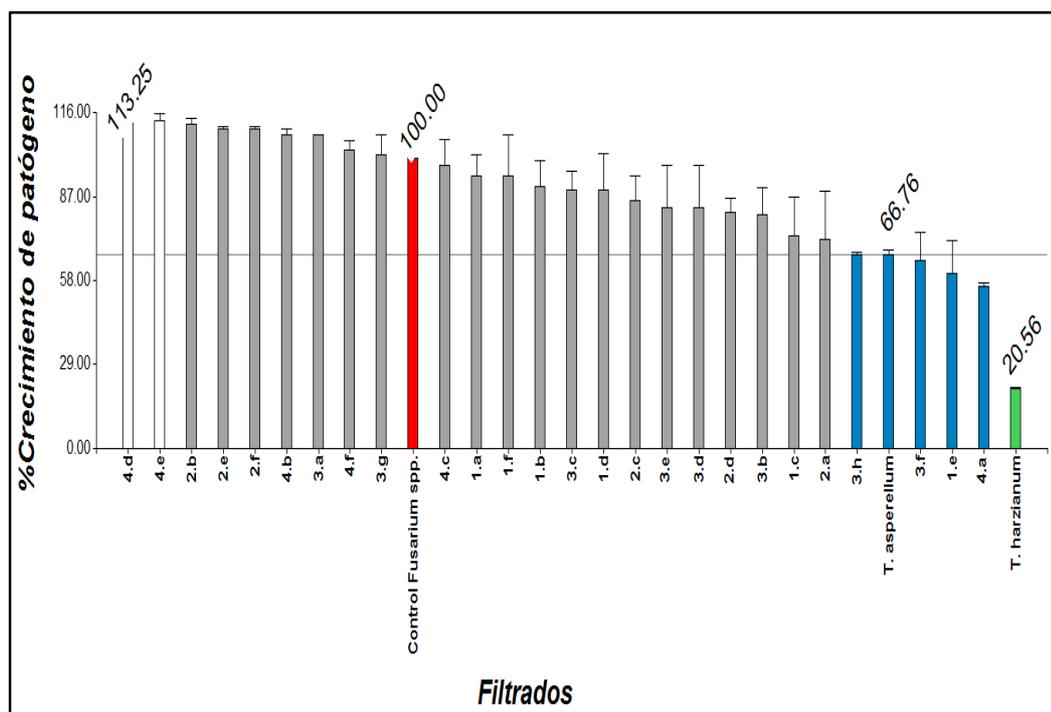


Figura 3.13: Gráfica de evaluación de filtrados fúngicos de las cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. Porcentajes de crecimiento *in vitro* del patógeno en función de filtrados de las cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

Elaborado por: (Villaruel, Mauricio).

3.5 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. Dicho comportamiento fue registrado a la tercera, cuarta, y quinta semana desde su germinación, observándose valores promedio muy inferiores al control de *A. thaliana*.

Las diferencias en cuanto al tamaño de planta en cada tratamiento, con respecto al control, a las cinco semanas de germinación, se pueden observar en la figura 3.14.

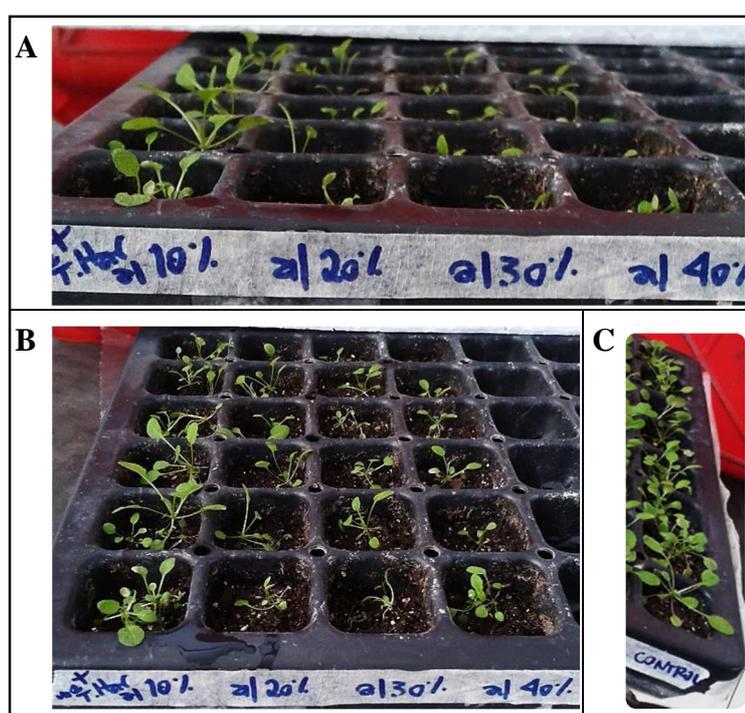


Figura 3.14: Fotografías de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de *T. harzianum* a diferentes concentraciones. A) Vista lateral de plantas en los tratamientos B) Vista superior de plantas en los tratamientos C) Control *A. thaliana*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Al realizar el análisis estadístico a las cinco semanas de haber germinado las semillas de *A. thaliana* de la línea Col-0, en los bioensayos a condiciones de invernadero, bajo influencia de filtrados fúngicos de *T. harzianum* a diferentes concentraciones, se determinaron diferencias estadísticas significativas respecto al tamaño de planta. Se observó que, a concentraciones altas de filtrados las plantas crecían poco, mientras que a bajas concentraciones su desarrollo era mayor en relación al 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. Dichos datos se los puede observar a continuación en la figura 3.15.

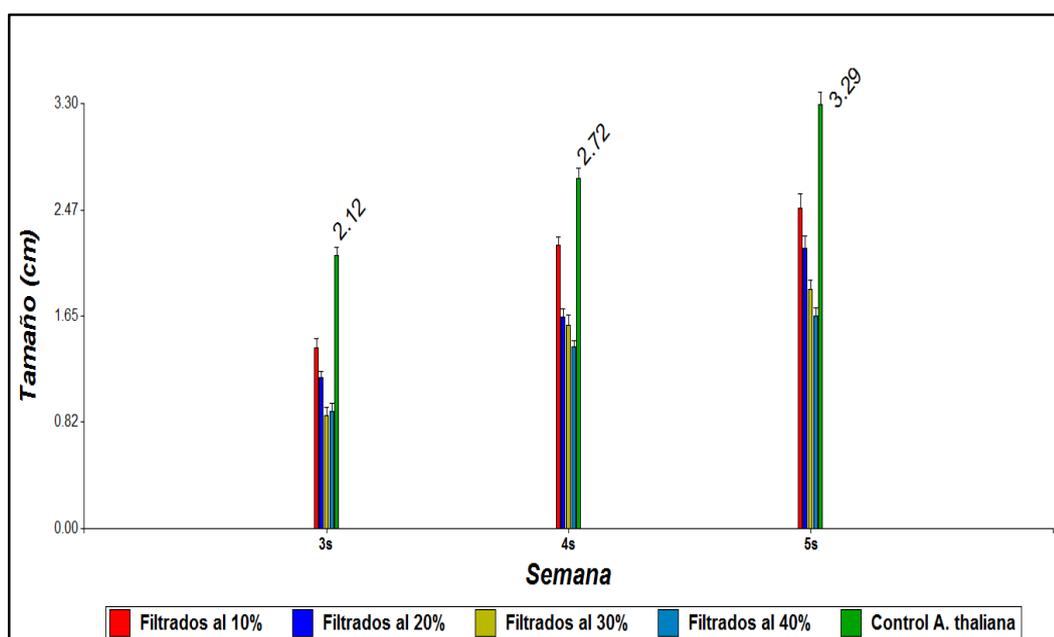


Figura 3.15: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con filtrados fúngicos de *T. harzianum*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la tercera, cuarta, y quinta semana, en función de las concentraciones de filtrados fúngicos.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

3.6 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. Dicho comportamiento se observó en *A. thaliana*, el mismo que fue registrado a la tercera, cuarta, y quinta semana desde su germinación.

Las variaciones con respecto al tamaño de planta en cada tratamiento con las cepas parentales de *Trichoderma* en comparación con el control, a las cinco semanas de germinación se pueden observar en la figura 3.16.

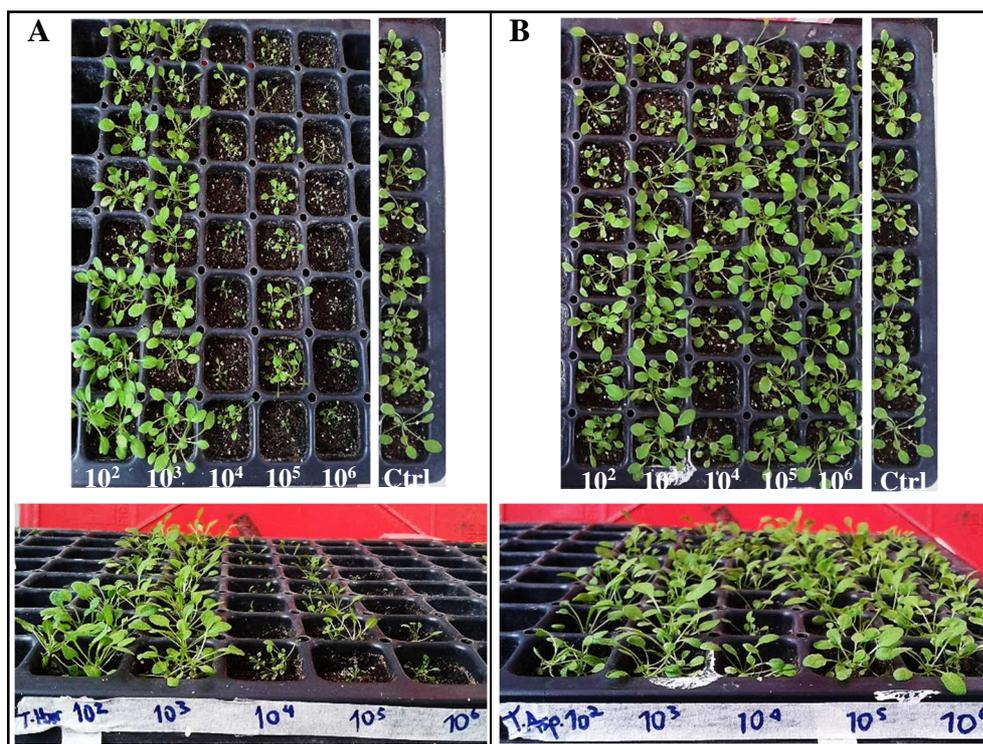


Figura 3.16: Fotografías de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas a diferentes concentraciones de las cepas parentales de *Trichoderma*. A) Vista superior y lateral de plantas en los tratamientos con *T. harzianum* B) Vista superior y lateral de plantas en los tratamientos con *T. asperellum*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Al realizar el análisis estadístico a las cuatro semanas de haber sido inoculadas las plantas de *A. thaliana* Col-0, con suspensiones de esporas de las cepas parentales de *Trichoderma* a diferentes concentraciones, se determinó diferencias estadísticas significativas respecto al tamaño de la planta.

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. Mientras que, a concentraciones mayores de esporas, *A. thaliana* fue inhibida

significativamente en su desarrollo, presentando valores muy por debajo del control (3.29 cm). Los tamaños promedio de planta fueron 2.24 cm, 1.76 cm, 1.25 cm, para las concentraciones de 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^6 ufc ml^{-1} , respectivamente. En la figura 3.17 se pueden observar dichas diferencias.

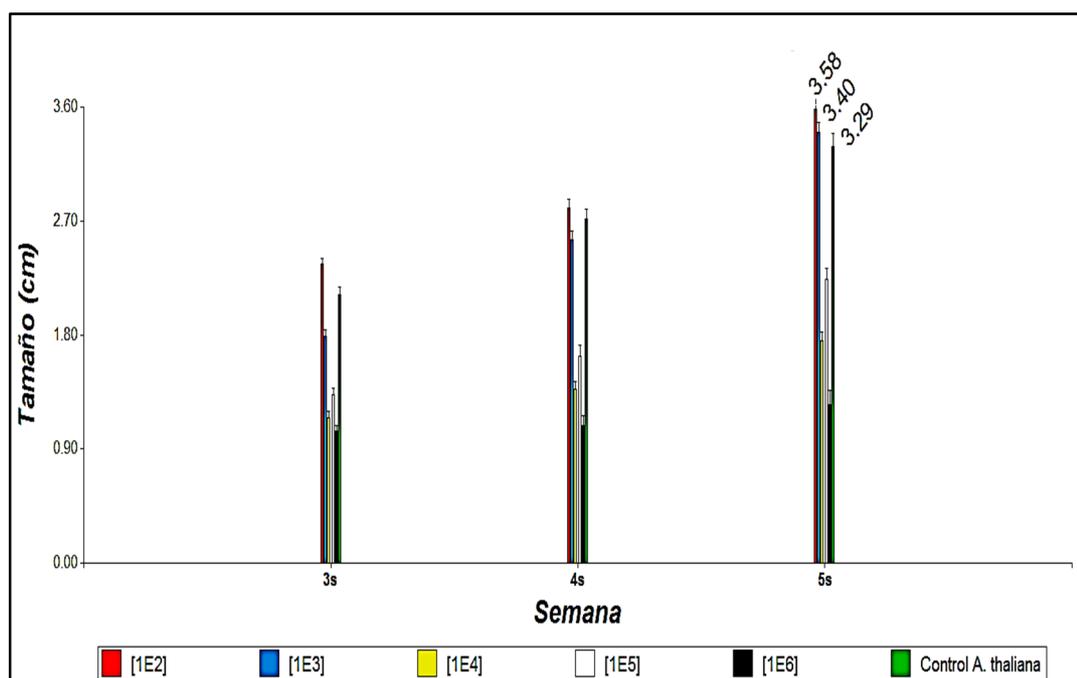


Figura 3.17: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de *T. harzianum*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la tercera, cuarta, y quinta semana, en función de las concentraciones de esporas.

Elaborado por: (Villaruel, Mauricio).

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*. Mientras que con los demás tratamientos, el desarrollo de las plantas se inhibió, ya que se observaron valores por debajo del

control (3.29 cm). Los tamaños fueron de 3.25 cm y 3.05 cm para las suspensiones 1×10^2 y 1×10^4 ufc ml^{-1} , respectivamente. Dichos datos se pueden observar en la figura 3.18.

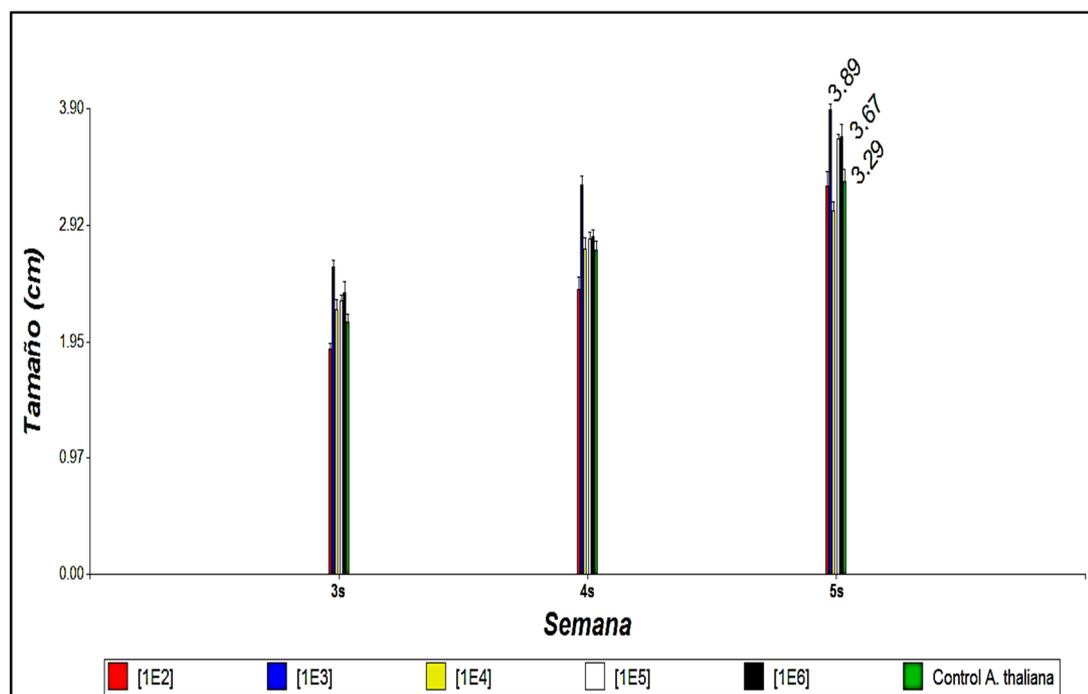


Figura 3.18: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de *T. asperellum*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la tercera, cuarta, y quinta semana, en función de las concentraciones de esporas.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Las diferencias entre los tratamientos con las cepas parentales de *Trichoderma* y el control de *A. thaliana*, al evaluar el crecimiento a las cuatro semanas de la inoculación con las esporas se encuentran en la figura 3.19.

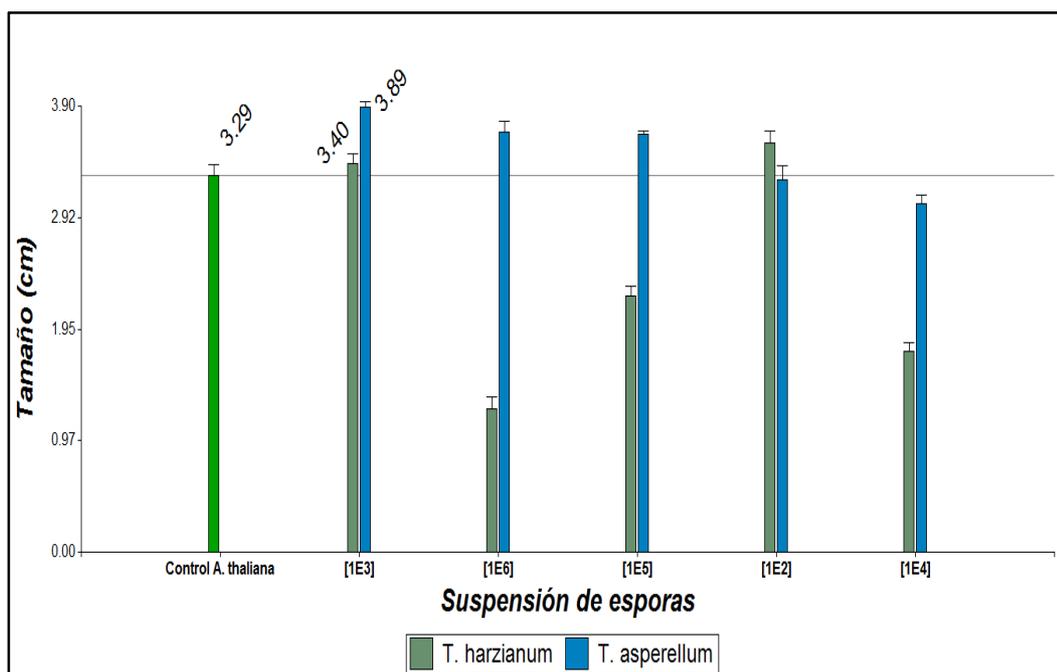


Figura 3.19: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de cepas parentales de *Trichoderma*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la quinta semana, en función de concentraciones de esporas de *T. harzianum* y *T. asperellum*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

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

Posterior a los ensayos realizados con las cepas nativas de *T. harzianum* y *T. asperellum*, se determinó la concentración de esporas en 1×10^3 ufc ml^{-1} , ya que a esa concentración las plantas presentaron un mayor desarrollo que el control de *A. thaliana*. Posteriormente se realizaron inoculaciones con las cepas fusionadas a dicha concentración.

Al evaluar el crecimiento de *A. thaliana in vivo*, a través de los bioensayos con la suspensión de esporas a la concentración de 1×10^3 ufc ml^{-1} , con las 26 cepas resultantes de la fusión de protoplastos, se determinó que 16 de ellas 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.

En la figura 3.20 se pueden observar las variaciones del tamaño de plantas en los tratamientos con las cepas fusionadas que presentaron un mayor cambio con respecto al control, a las cinco semanas de germinación.



Figura 3.20: Fotografías de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de cepas fusionadas de *Trichoderma*. Plantas que presentaron el mayor y menor tamaño con la presencia de las cepas fusionadas en relación al control.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Al realizar el análisis a las cuatro semanas de haber sido inoculadas las plantas de *A. thaliana* de la línea Col-0, con suspensiones de esporas de las cepas fusionadas de *Trichoderma*, se identificaron a 18 grupos de cepas estadísticamente diferentes respecto al tamaño de planta.

Además, se determinó que existieron 16 cepas fusionadas que indujeron el crecimiento de las plantas en cuestión, de las cuales, únicamente dos de ellas presentaron una inducción mayor al parental *T. asperellum*. Con las demás cepas, se observó un desarrollo de *A. thaliana* por debajo del control.

Las mejores cepas que ayudaron al desarrollo de las plantas fueron 3.b y 1.b, mientras que las que presentaron inducción intermedia fueron 4.b, 1.e, 4.c, 1.c, 4.d, 1.d, 1.a, 2.c, 2.b, 4.e, 3.h, 2.a, 4.a, y 3.d puesto que los valores de crecimiento se encontraron entre los de *T. harzianum* y *T. asperellum*. Las demás, tales como 3.f, 2.d, 3.g, 3.e, 2.f, 1.f, 4.f, 2.e, 3.a, y 3.c presentaron una inducción nula, ya que el tamaño de planta en dichos tratamientos fue inferior al del control *A. thaliana*.

La diferencia estadística en cuanto al tamaño de plantas en el tratamiento con la cepa 3.b, en relación al resto, es significativa, ya que 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). A continuación, en la figura 3.21 se pueden observar dichas diferencias.

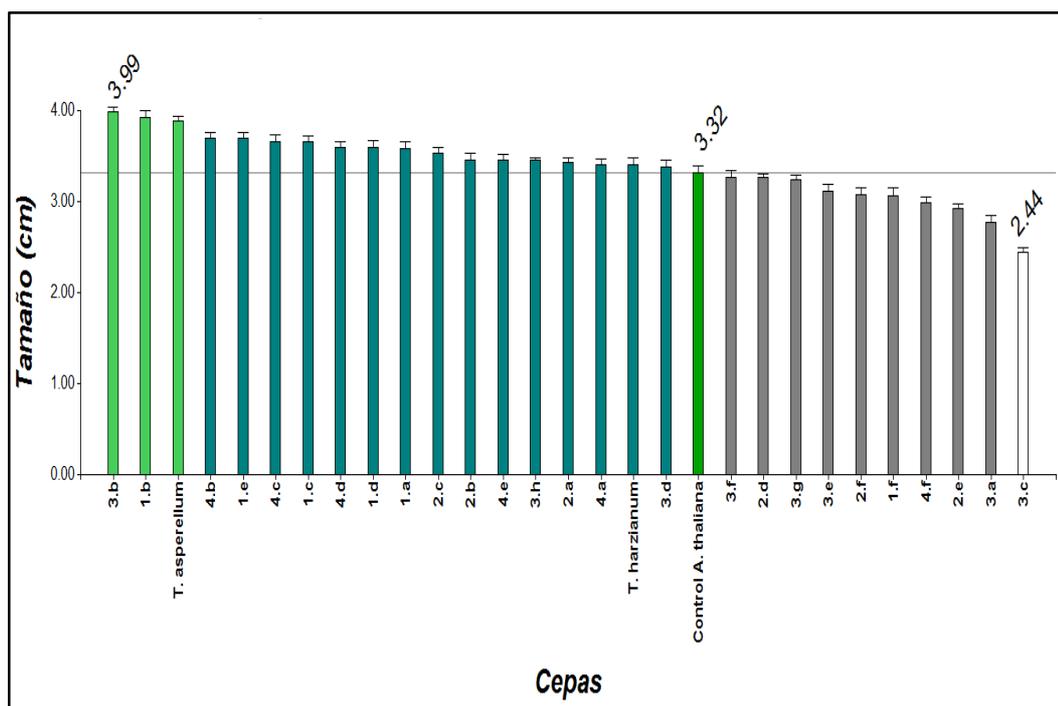


Figura 3.21: Gráfica de evaluación de crecimiento *in vivo* de *A. thaliana* con suspensiones de esporas de cepas de *Trichoderma*. Tamaño de plantas en cm, evaluadas a la quinta semana, en función de esporas de cepas parentales y fusionadas de *Trichoderma*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

Para determinar a las mejores cepas de *Trichoderma*, en cuanto al biocontrol del fitopatógeno *Fusarium* spp. y a la inducción de crecimiento de *A. thaliana*, se analizaron todos sus comportamientos en las distintos ensayos mencionados en el apartado 2.5.

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.

Algunas cepas mejoraron el mecanismo de acción de micoparasitismo más que *T. asperellum*, mientras que otras no lo hicieron con respecto a la producción de metabolitos secundarios del otro parental *T. harzianum*. Sin embargo, se determinó que por parte de la gran mayoría de cepas el desarrollo de *A. thaliana* se vió favorecido. En la gráfica 3.22 se muestran los datos obtenidos al respecto.

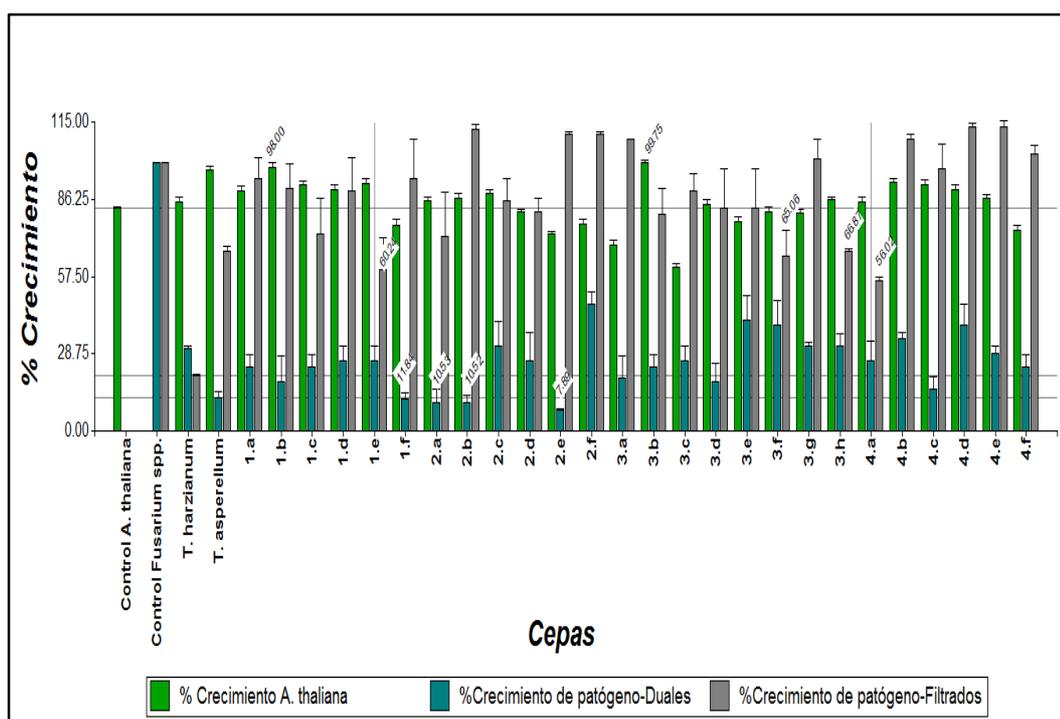


Figura 3.22: Gráfica de evaluación de las cepas fusionadas de *Trichoderma*. Evaluación de las cepas fusionadas con relación a los parentales en los ensayos de cultivos duales, filtrados fúngicos y bioensayos con *A. thaliana*.

Elaborado por: (Villarroel, Mauricio).

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1 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 antagónica se encontró entre el 52% y 92% (ver figura 3.12). 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 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 antagónica 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 mejore, y que las cepas fusionadas presenten dichas características relevantes (Tovar, 2008).

El efecto observado en el ensayo de cultivos duales con las mejores cepas (ver figura 3.12) muestra el éxito antagónico. 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 (ver figura 3.13). 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* (ver figura 3.13), 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* (ver figura 3.3), 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).

4.2 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 (ver figura 3.9 y 3.10), ya que muchas fusiones ocurren entre protoplastos de las mismas cepas, o simplemente no ocurre dicho proceso (ver figura 3.11), 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* (ver figura 3.9 y 3.10). 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.

4.3 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 (ver figura 3.5 y 3.14). 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 (ver figura 3.14), 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* (ver figura 3.16 y 3.19). 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 (ver figura 3.21). 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 (ver figura 3.21). 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 (ver figura 3.21). 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.

CAPÍTULO V: 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 ($p < 0.0001$).

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- En investigaciones posteriores se recomienda realizar bioensayos con los filtrados fúngicos de las cepas de *Trichoderma* a diferentes concentraciones, para determinar la concentración óptima a la cual se pueda inducir el crecimiento de la planta.
- Es de gran importancia realizar análisis de los metabolitos que produce *Trichoderma*, para poder identificar a las moléculas que intervienen de manera específica en el biocontrol de fitopatógenos.
- Sería de gran interés realizar bioensayos consorcios de *Trichoderma* en plantas, para poder determinar la sinergia de los mismos y los efectos en la inducción del crecimiento y resistencia a plagas.
- Se recomienda realizar investigaciones con las cepas que favorecieron e indujeron el crecimiento del fitopatógeno, para determinar sus posibles aplicaciones.
- Es importante que se realicen ensayos en campo con las cepas de *Trichoderma*, para estandarizar parámetros que resulten de interés para la producción agrícola en el Ecuador.

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 en plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum*. Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Ezziyyani, 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 Colombia*, 6, 7-25.
- Gomes, F. (2002). Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudokoningii*. Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Guigón, 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.). *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 Bahía, Bahía, 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 & Agrotecnología, 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.