

UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD, BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

***Trichoderma spp.* para el control de *Asterina mexicana* agente causal de
la viruela o negrilla de maguey pulquero.**

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

ERIKA IVETTE DIAZ MARTINEZ

ASESOR: DRA. YURIDIA MERCADO FLORES
PROFESOR DE TIEMPO COMPLETO TITULAR D

ASESOR: DRA. DIANA ELINOS CALDERON



ÍNDICE

Resumen	4
1. Marco Teórico.....	5
1.1. Maguey pulquero	5
1.1.1. Características morfológicas.....	6
1.1.2. Reproducción.....	6
1.2. Beneficios y usos del Maguey pulquero	7
1.2.1. Mixiote	7
1.2.2. Penca.....	8
1.2.3. Quiote y flores.....	9
1.2.4. Gusanos	9
1.2.5. Aguamiel.....	9
1.2.6. Pulque.....	10
1.3. Beneficios en el consumo de sus productos.....	10
1.3.1. Consumo de Aguamiel.....	11
1.3.2. Consumo de Pulque	11
1.4. Relevancia económica en la Industria Pulquera	11
1.5. <i>Agave salmiana</i>	11
1.5.1. Morfología del <i>Agave salmiana</i>	12
1.6. Viruela o negrilla en <i>A.salmiana</i> causada por hongo <i>A. mexicana</i>	12
1.6.1. Viruela o negrilla	12
1.6.2. Características de la enfermedad	12
1.7. <i>Trichoderma</i> spp.....	13
1.7.1. Mecanismos de acción	14
1.7.2. Competencia por sustrato.....	14
1.7.3. Antibiosis	14



1.7.4. Resistencia Inducida.....	15
1.7.5. Micoparasitismo.....	15
2. Justificación.....	16
3. Hipótesis.....	17
4. Objetivo general.....	18
4.1. Objetivos particulares.....	18
5. Metodología.....	19
5.1. Microorganismo y condiciones de cultivo.....	20
5.2. Producción del inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
5.3. Producción del inóculo de <i>Asterina mexicana</i>	21
5.4. Pruebas de confrontación en placa.....	22
5.4.1. Actividad antagonica de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>A. mexicana</i>	22
5.5. Evaluación del efecto micoparásitico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>A. mexicana</i>	23
5.6 Producción de Antibióticos.....	24
5.6.1. Producción de compuestos volátiles.....	24
5.6.2. Producción de compuestos no volátiles.....	25
5.7. Determinación de actividad enzimática.....	26
5.8. Identificación molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	27
6. Resultados y Discusión.....	31
7. Conclusión.....	46
8. Bibliografía.....	47



RESUMEN

El cultivo de maguey pulquero (*Agave salmiana*) tiene gran importancia económica y agrícola en México, debido a sus múltiples usos; su aprovechamiento es tal que todas y cada una de sus partes tienen uno o varios fines específicos, el principal producto del cual derivan su nombre genérico es el pulque. También tiene importancia a nivel ecológico; ya que participa en la formación y conservación de suelo.

La producción y calidad del cultivo del maguey pulquero se ven limitadas por diversas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, que llevan al productor a aplicar estrategias de control químico y en algunos casos abandonar la actividad por un incremento en las pérdidas; por lo que el control biológico es una estrategia útil para combatir este tipo de microorganismos.

Este proyecto está enfocado en uno del problema fitosanitario que se han encontrado en la entidad; la viruela o negrilla, producida por el hongo *Asterina mexicana* que causa un considerable decremento en la producción del maguey pulquero.



MARCO TEÓRICO

1.1 Maguey pulquero

La existencia de maguey pulquero (*Agave salmiana*) data de tiempos ancestrales; ya que sus características biológicas y ecológicas han sido aprovechadas por el hombre, obteniendo variedad de beneficios; de acuerdo a los usos actuales y la importancia económica que representa, habitantes de Tlaxcala e Hidalgo reconocen múltiples utilidades al maguey pulquero (Vázquez-García et al., 2016).

El maguey pulquero, también conocido con el nombre de maguey *manso* o *määxo*, es una de las especies con mayor tradición de uso en México (Aguirre et al, 2001). En el estado de Hidalgo se tiene registrada la presencia de agaves pulqueros en 71 de sus 84 municipios. Las principales variedades presentes son: Maguey penca-larga o carricillo, Maguey verde, Maguey savililla, Maguey xamini, Maguey ayoteco, Maguey chalqueño y Maguey manso (Nieto-Aquino et al., 2016).

Los principales estados productores son: Hidalgo, Estado de México, Puebla y Tlaxcala y en menor proporción San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato y Veracruz (Jacinto et al., 2000).

Los magueyes son plantas xerófitas, capaces de vivir en condiciones climáticas adversas; es decir, a altas temperaturas, períodos largos de sequía, ambientes secos, suelos con variaciones de temperatura entre el día y la noche (García, 2007).

El uso del maguey data de tiempos prehispánicos, cuando los pueblos indígenas lo utilizaban como fuente abastecedora de materia prima para elaborar cientos de productos, es por ello que para México es de suma importancia desde el punto de vista económico, ecológico y social (Gentry, 1982).



1.1.1. Características morfológicas

El maguey, metl en náhuatl, es usualmente de gran talla, con hojas anchas y verdes que en sus orillas y punta presentan espinas.

Los magueyes son plantas xerófitas, capaces de vivir en condiciones climáticas adversas; es decir, a altas temperaturas, períodos largos de sequía, ambientes secos, suelos con variaciones de temperatura entre el día y la noche (García, 2007).

El maguey pulquero es de tamaño mediano a grande, con vástagos cortos, formando rosetas de 1.5 a 2.0 m de alto. Hojas de 100-200 cm de largo y 20-35 cm de ancho, lineares, acuminadas, color verde, profundamente convexo hacia la base, cóncava o hasta acanalada hacia la punta, el ápice curvado sigmoide. Inflorescencia grande cuando carnosa, flores de 7-9 cm de longitud, por lo regular de color amarillo. Se encuentra presente en el norte y centro de México; Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas (Nieto-Aquino *et al.*, 2016).

En el estado de Hidalgo se tiene registrada la presencia de agaves pulqueros en 71 de sus 84 municipios. Las principales variedades presentes de maguey pulquero en el estado: Maguey penca-larga o carricillo, Maguey verde, Maguey saviñilla, Maguey xamini, Maguey ayoteco, Maguey chalqueño y Maguey manso (Nieto-Aquino *et al.*, 2016).

1.1.2. Reproducción

La mayoría de los agaves se propagan de manera asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia, Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta, los hijuelos intrafoliares se originan entre las hojas de la roseta y se desarrollan cuando se desprenden de la planta madre o esta muere (García-Mendoza, 2007).



El maguey pulquero es polifacético y multifuncional debido a que puede ser aprovechado a lo largo de su vida; ya sea en estado entero, capado o saltado y proveer de sus beneficios.

La planta en procesos de crecimiento y que no ha sufrido alteraciones radicales que afecten su desarrollo, se denomina maguey entero; de lo contrario cuando la planta ha madurado lo suficiente se debe extraer su yema apical floral para garantizar mayor cantidad de savia, en ese momento el maguey se convierte en capado. Cuando al maguey no se le retira su yema de crecimiento de su centro o “meyolote”, brotará su vástago floral (tallo largo que producirá su inflorescencia y posteriormente semilla); a este se le llamará maguey “saltado”; puesto que ya no producirá aguamiel para elaborar pulque y miel, pero ofrecerá otro tipo de beneficio (Vázquez-García *et al.*, 2016).

El uso del maguey data de tiempos prehispánicos, cuando los pueblos indígenas lo utilizaban como fuente abastecedora de materia prima para elaborar cientos de productos, es por ello que para nuestro país es de suma importancia desde el punto de vista económico, ecológico y social (Gentry, 2004).

1.2. Beneficios y usos del maguey pulquero

1.2.1. Mixiotes

Una vez que el maguey ha crecido lo suficientes se puede extraer la cutícula que cubre la hoja del maguey, llamada mixiote; la cual es utilizada para la cocción de alimentos (Vázquez-García *et al.*, 2016).

Para no dañar a la planta solo se deben extraer uno o dos mixiotes por penca de manera cuidadosa, los productores emplean una técnica en la que no es necesario cortar la penca para su extracción.



1.2.2. Penca

Cuando el maguey ya está en su etapa final de producción de aguamiel proveen de insumo gastronómico “penca”.

- La penca es muy solicitada por la industria gastronómica ya que es utilizada para envolver y preparar numerosos platillos, principalmente carne, la cual adquiere un sabor y textura sumamente agradables; lo que se conoce como: “Barbacoa”, platillo típico mexicano valorado a nivel doméstico y comercial (Narváez-Suárez, 2016).
- Las pencas son empleadas también para obtener ixtle (fibra vegetal), con el cual se pueden confeccionar diversas artesanías como morrales, prendas de vestir, manteles, carpetas, bolsas, esponjas corporales para baño, entre otro. El proceso de extracción para obtener ixtle es un poco extenso, pero a grandes rasgos es cortar la penca, quebrado y tallado, preparación y lavado de la fibra e hilado (Vázquez-García *et al.*, 2016).
- Las pencas de maguey son empleadas como forraje para vacas, bueyes y borregos, estas provienen de magueyes podados, quebrados, saltados y de aquellos que han terminado su producción de aguamiel o que una vez capados no produjeron savia (Vázquez-García *et al.*, 2016).
- Las pencas de maguey son empleadas como forraje para ganado; ya que son un alimento muy nutritivo; proporcionando altos niveles de energía digestible, minerales y agua (Vázquez-García *et al.*, 2016).



1.2.3. Quiote y flores del maguey

Son base de varios platillos nutritivos y deliciosos que forman parte de la dieta de las familias campesinas como los guisos de gualumbos, jugo y dulce de quiote (Narváez-Suárez, 2016).

El quiote alcanza una longitud de 3 a 5 mts de altura y en su extremo superior se desarrolla la inflorescencia en forma de racimo de color amarillento en las que las sigue el fruto capsular. La época de floración depende de la variedad, suelo, clima y cultivo.

1.2.4. Gusanos de maguey: en temporada de lluvia el maguey entero suministra dos tipos de gusanos comestibles:

- Gusano rojo: también llamados chinicuiles, viven enraíces del maguey joven (Museo Nacional de Culturas Populares, 1998).
- Gusano blanco: estos son ricos en proteínas y grasas, viven en las pencas del maguey (Museo Nacional de Culturas Populares, 1998) y se cotiza muy alto en el mercado.

En nuestro país el consumo de gusanos es una práctica que se remonta a la época prehispánica constituyen un platillo tradicional y de alto valor nutrimental.

1.2.5. Aguamiel

El aguamiel o jugo de agave es la savia de color amarillento y de olor herbáceo que se obtiene al hacer la capación del maguey maduro, es decir, el corte de las hojas tiernas centrales antes del desarrollo del escapo central, posteriormente se raspa el centro del maguey, seguido del corte de las hojas para formar una cavidad de 20-30 cm de profundidad la cual servirá para su almacenamiento (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013).



Uno de los productos con valor agregado que está creciendo en el mercado es la miel de maguey elaborada a base de aguamiel deshidratada, ésta se envasa y se comercializa con la respectiva marca y diseño de cada productor, es un producto de origen prehispánico y se elabora de la misma forma que hace cientos de años (Narváez-Suárez, 2016).

1.2.6. Pulque

El pulque es una bebida ancestral y forma parte del patrimonio cultural mexicano, su historial data desde la época prehispánica; en México ha sido una referencia de cultura, tradición y gastronomía.

Esta bebida es producida a partir de la fermentación de la savia fresca conocida como aguamiel.

La principal producción en México sigue siendo el estado de Hidalgo donde se produjeron más de 260 millones de litros de *pulque* en 2010, equivalentes al 82% de la producción nacional, seguido por Tlaxcala con 13.3% y el Estado de México con 2.68%, según a fuentes no oficiales (Escalante *et al.*, 2016).

1.3. Beneficios en el consumo de sus productos

1.3.1. Consumo de Aguamiel

Los efectos beneficiosos del consumo del concentrado de aguamiel de *A. salmiana* y sus saponinas extraídas se pueden utilizar como parte de la estrategia dietética para mejorar las anomalías metabólicas observadas en sujetos obesos (Leal-Díaz *et al.*, 2016). El aguamiel también tiene propiedades curativas para combatir la anemia, diabetes, parásitos intestinales (lombrices).

En México, las personas diabéticas consumen concentrado de aguamiel (AC) para mejorar su condición diabética.



1.3.2. Consumo de *pulque*

El primer estudio sistemático sobre los beneficios nutricionales del *pulque* el consumo asociado con una ingesta regular se llevó a cabo en la población indígena otomí del Valle del Mezquital (estado de Hidalgo) fue realizado por Anderson *et al.* 2009. Los resultados obtenidos del análisis a 100 consumidores adultos, durante 7 días, determinaron que la ingesta diaria de *pulque* (hasta 2 L) proporciona calorías (12%), proteína total (6%), tiamina (10%), riboflavina (24%), niacina (23%), vitamina C (48%), calcio (8%) y hierro (51%). Estos resultados indican que el consumo de pulque para este grupo étnico, constituye el segundo "alimento" más importante en la dieta después de la tortilla (Escalante *et al.*, 2016).

1.4. Relevancia económica en la industria pulquera

En el Estado de Hidalgo el cultivo de *A. salmiana* es económicamente importante; ya que de este se obtiene la materia prima para la producción de pulque.

La producción de *pulque* fermentado embotellado/enlatado han sido realizados principalmente por productores en los estados de Puebla, Tlaxcala e Hidalgo (Ramírez *et al.*, 2004).

1.5. *Agave salmiana*

El maguey pulquero, también conocido con el nombre de maguey *manso* o *määxo*, es una de las especies con mayor tradición de uso en México. Esta especie se distribuye por México (Coahuila, Hidalgo, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Colima, Puebla), desde los 1000 hasta los 2460 m, en climas subhúmedos, semisecos y secos (Aguirre *et al.*, 2001).

Desde un punto taxonómico, este maguey se incluye dentro de la familia Agavaceae y subgénero *Agave* (Gentry, 1992).



1.5.1. Morfología del Agave *salmiana*

Rosetas de 1.5 a 2.0 m de altura, raíz fibrosa, hojas de color verde oscuro, escapo floral de hasta 4m en los magueyes de 8 y 10 años de edad, con flores hermafroditas amarillo verdosas de 10-12 cm de largo, el fruto es una cápsula oblonga con pequeñas semillas negras (Gentry, 1982).

1.6. Viruela o negrilla en *A. salmiana* causada por hongo *A. mexicana*

1.6.1. Viruela o negrilla

Esta enfermedad es causada por un hongo (*Asterina mexicana*), de la clase Ascomycetes, orden Mycophyrales, familia Mycrotheriaceae. Esta enfermedad se presenta durante todo el año; a pesar de esto son raras las ocasiones en que este hongo mata las plantas a no ser que esté asociado con otro organismo (Domínguez-Rosales, 2009).

1.6.2. Características de la enfermedad

De inicio se presentan sobre las pencas pequeñas manchitas de color amarillento; después se tornan negras, como se muestra en la Figura.1. Cuando el daño es severo, ya la penca se encuentra completamente invadida por el hongo y como resultado final, la planta presenta pencas raquílicas y mal formadas que pueden llegar a secarse (Domínguez-Rosales, 2009).

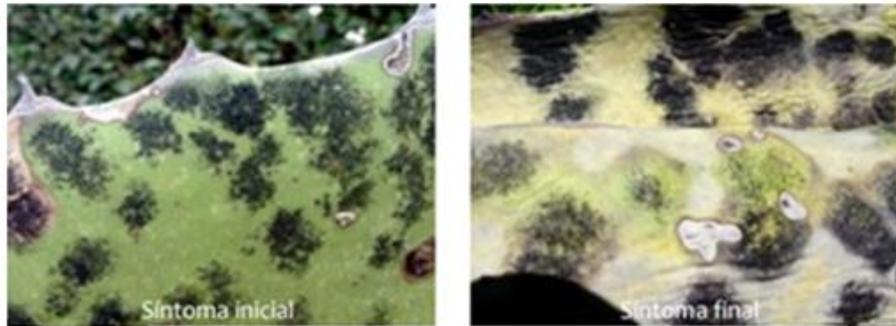


Figura 1 . Viruela o negrilla (*Asterina mexicana*)
Fuente: CESAVERG

1.7. *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. son hongos de vida libre que son altamente interactivos en la raíz, suelo y ambientes foliares, son heterótrofo, aerobios, que se reproducen asexualmente.

Estos hongos son bien conocidos por su capacidad para producir una amplia gama de sustancias antibióticas y por su capacidad para parasitar otros hongos; dichos efectos son beneficiosos para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Harman *et al.*, 2004). El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios.

Trichoderma spp., tiene efecto antagónico sobre los microorganismos que se encuentran en el suelo, por lo es utilizado como controlador biológico y antagonista natural de hongos fitopatógenos del suelo, por medio de sus diferentes modos y mecanismos de acción que le permiten el control de los mismos (Infante *et al.*, 2009).

El género *Trichoderma* incluye especies que sirven como agentes de control biológico con efecto estimulante en los cultivos e inductor de resistencia sistémica a diferentes patógenos en plantas (Harman, 2004).



1.7.1. Mecanismos de acción

Un efectivo control biológico de *Trichoderma* se logra a través de la combinación de diversos mecanismos de acción como: micoparasitismo, competencia por nutrientes (sustrato) y/o espacio, antibiosis, y la resistencia inducida (Travis *et al.*, 2016).

Romo y Ávila (2000) sustentan que *Trichoderma* spp. tiene propiedades antifungosas y antibacteriales, gracias a que produce sustancias tales como: trichodermina, dermadina, sequisterpeno, trichotoxina y acetaldehído; adicionalmente están implicadas enzimas extracelulares como β -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista.

1.7.2. Competencia por sustrato

Trichoderma spp., no compite por nutrientes del suelo con la planta, se alimenta de los patógenos que se encuentra en el suelo; la competencia directa se da por espacio o por nutrientes; así como también existe una competencia por el oxígeno por su gran versatilidad de adaptación a los suelos, lo cual favorece su rápido crecimiento (Ezziyani *et al.*, 2004).

1.7.3. Antibiosis

La antibiosis es el fenómeno por medio del cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de moléculas tóxicas, volátiles y no volátiles, así como de enzimas líticas; las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994).



La habilidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños causados por hongos fitopatógenos, está relacionada con su capacidad de competencia, antibiosis por la producción de enzimas y metabolitos secundarios y al micoparasitismo (Ghrisalberti *et al.*, 1991).

1.7.4. Resistencia inducida

Existen cepas de *Trichoderma* muy tolerantes, que pueden sobrevivir y resistir a los fungicidas químicos. El mecanismo de resistencia de algunos hongos a productos químicos fungicidas se debe a mutaciones genéticas, que reduce la susceptibilidad a los fungicidas y disminuye su eficacia. Dichas mutaciones pueden causar alteraciones en la adaptación y la aptitud de los hongos (Chaparro *et al.*, 2011).

1.7.5. Micoparasitismo

Este proceso complejo es la interacción entre antagonista- patógeno, que ocurre en cuatro etapas: la primera es el **crecimiento quimiotrófico**; donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes; para continuar con la etapa de **Reconocimiento**: en donde existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato. La tercera etapa es llamada: **Adhesión y enrollamiento**, ya que ocurre la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno y así llegar a la cuarta etapa llamada: **Actividad lítica**: que es la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* (Martínez *et al.*, 2013).

El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación (Martínez *et al.*, 2013).



Weindling en 1932, demostró la acción de *Trichoderma* como micoparásito natural, después de diversos experimentos fue hasta 1970 que se implementó como control biológico.

Debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y su acción como inductor de resistencia sistémica en la

planta a diferentes patógenos, el género *Trichoderma* se considera una de las especies más ampliamente utilizadas como control biológico (Infante *et al.*, 2009).

La colonización de raíces por *Trichoderma* spp. aumenta el crecimiento y desarrollo de las mismas, la productividad de los cultivos, la resistencia al estrés abiótico y la absorción y el uso de nutrientes (Harman *et al.*, 2004).

Una alternativa eficiente para el control de enfermedades foliares y las ocasionadas por patógenos en el suelo es el control biológico (Infante *et al.*, 2009).

El género *Trichoderma* incluye especies que sirven como agentes de control biológico con efecto estimulante en los cultivos e inductor de resistencia sistémica a diferentes patógenos en plantas (Harman, 2004). La caracterización e identificación de estas especies es crucial para la adecuada aplicación en el control biológico específico de patógenos en los cultivos agrícolas.

Algunas especies de este hongo que han sido utilizadas para el control de enfermedades fungosas son: *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. gamsii* y *T. polysporum* (Samuels *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2010),



2. JUSTIFICACIÓN

El maguey pulquero (*Agave salmiana*) es una planta de importancia económica, gastronómica, histórica y cultural en México.

Su cultivo se realiza para la producción de miel, agua miel, pulque, dulces, papel mixiote y destilado de pulque, por otro lado, las pencas son un alimento muy nutritivo para el ganado, además de ser utilizadas para elaborar diferentes platillos típicos como la barbacoa. También posee importancia ecológica al evitar la pérdida por erosión de los suelos.

El cultivo de esta agavacea en el estado de Hidalgo, ha tenido gran importancia desde tiempos prehispánico. Actualmente se busca incorporar su producción en la agroindustria, no solo para obtener agua miel y sus derivados, sino más bien, productos con alto valor agregado, además de evitar su depredación mediante esquemas de conservación.

Una de las problemáticas más importantes en el cultivo de maguey pulquero, es la presencia de plagas y enfermedades que afectan y disminuyen su tiempo de vida, considerando que para tener una planta productiva tienen que pasar de 8 a 12 años. Dentro de los problemas fitosanitarios que se han encontrado en la entidad y que, aunque no ha sido documentado, se encuentra la viruela o negrilla, producida por el hongo *Asterina mexicana* que causa un considerable decremento en la producción lo que preocupa a los productores.

Aunque no se tiene una metodología efectiva para el manejo de la enfermedad, los compuestos químicos son la primera elección, aun tomando en cuenta las desventajas que éstos poseen, al ser altamente tóxicos y que inhiben el desarrollo no solo del fitopatógeno, sino también de la microbiota benéfica para la planta, además de la selección de cepas patogénicas resistentes a los fungicidas.



Una alternativa es el uso de hongo micoparásito *Trichoderma* spp., el cual ha demostrado ser un eficiente agente de biocontrol en otros cultivos, además de que promueve el desarrollo vegetal e induce la respuesta sistémica de planta como mecanismo de defensa; sin embargo, cepas aisladas en una región, no son efectivas en otras, por lo que en este trabajo se evaluarán diferentes cepas de *Trichoderma* aisladas de la rizosfera de *A. salmiana* en el estado de Hidalgo para conocer su efecto antagónico sobre *A. mexicana*, y proponerlas como una alternativa de control de la viruela o negrilla.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *Trichoderma* spp. autóctonas del estado de Hidalgo inhibirán el desarrollo de *A. mexicana*.



4. OBJETIVO GENERAL

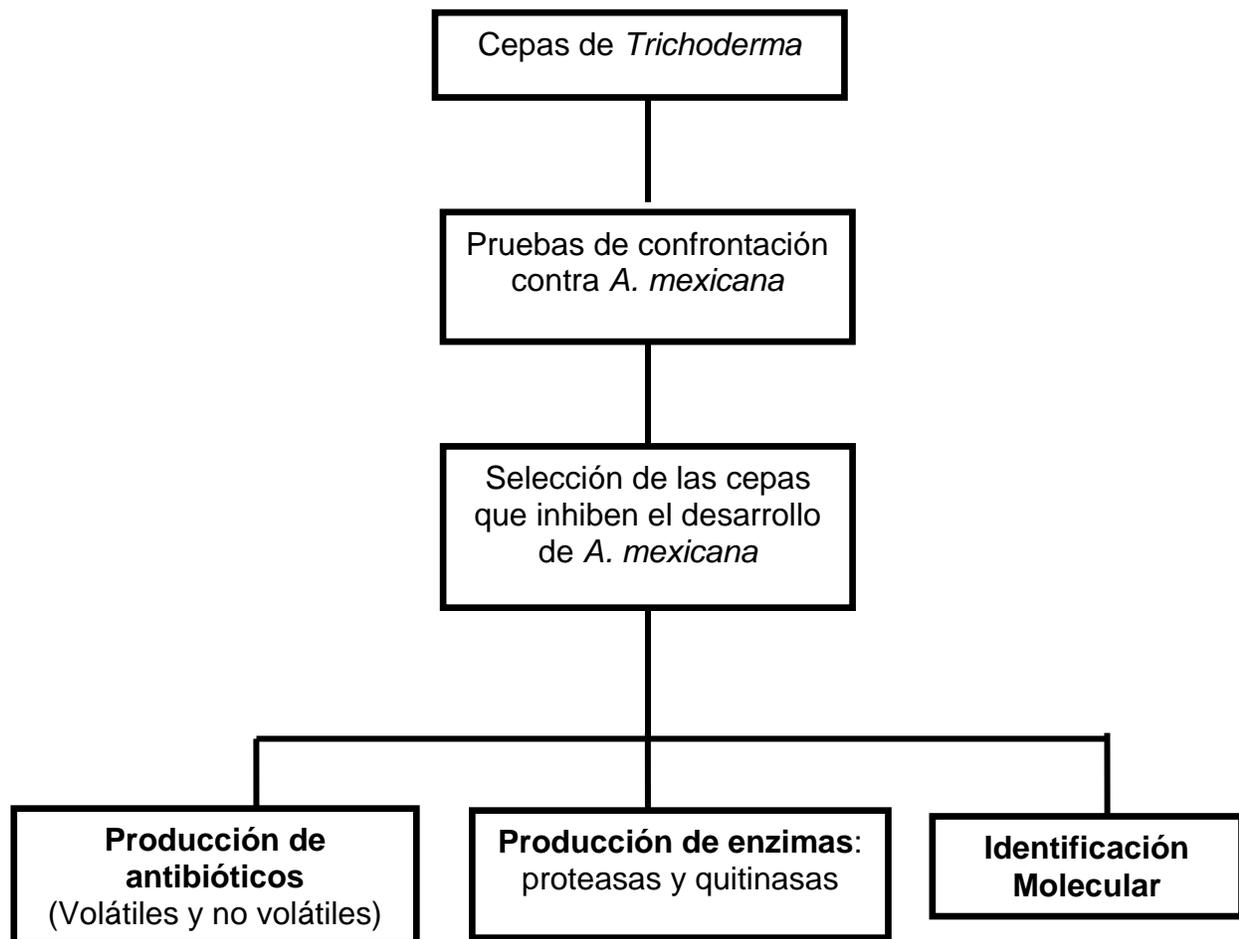
Evaluar diferentes cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizosfera de *A. salmiana* en el estado de Hidalgo para conocer su efecto antagónico sobre *A. mexicana*, mediante técnicas de confrontación y microbiológicas.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar las cepas de *Trichoderma* spp. utilizando pruebas de confrontación para la selección de aquellas que presentan actividad antagónica sobre *A. mexicana*.
- Analizar las cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas, para conocer los mecanismos de antagonismo que poseen sobre *A. mexicana* mediante la evaluación de la producción de antibióticos y enzimas.
- Identificar las cepas de *Trichoderma* spp. con potencial como agentes de control biológico de *A. mexicana* mediante técnicas moleculares para conocer la especie a la que pertenecen.



5. METODOLOGÍA



5.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la cepa de *A. mexicana* la cual fue aislada de la localidad de Zempoala Hgo. El hongo se cultivó en placas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA Difco™), las cuales fueron incubadas a 28°C durante 8 días, posteriormente fue conservado en refrigeración a 4°C en el mismo medio.

Las 11 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizosfera de *A. salmiana* se conservaron en medio PDA (Agar Papa Dextrosa Difco) en tubos inclinados. Para su activación se inocularon en matraces con 35 mL de CPD (Caldo Papa Dextrosa Difco) un cuadro de 1 cm² de cada hongo por separado obtenido de tubos inclinados con PDA. Los matraces se incubaron a 28°C en agitación a 150 rpm durante 48 h. Al término de este periodo con ayuda de un asa bacteriológica se tomó un pellet y se sembró en el centro de una caja Petri con medio PDA por un periodo de 5-7 días a 25°C como se muestra en la Figura 2.

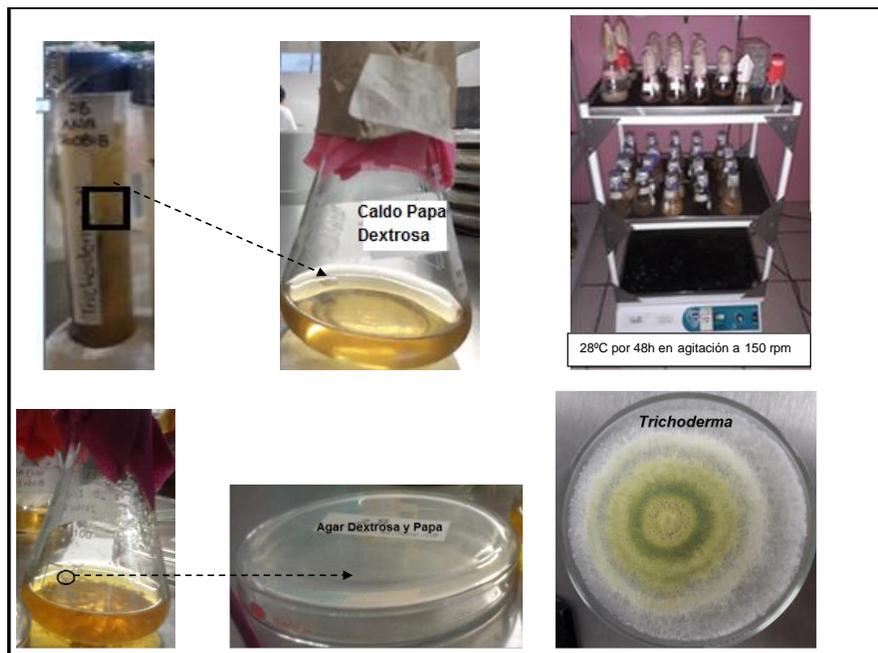


Figura 2. Procedimiento de activación de las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de *A. salmiana*.



Todos los medios de cultivo fueron esterilizados durante 15 min, a 120°C y 1 atm de presión.

5.2. Producción del inóculo de *Trichoderma* spp.

Para la obtención de esporas de *Trichoderma* spp se prepararon matraces de 125 mL con 25 mL de medio PDA y se inoculó un cuadro de 1 cm² de cada cepa de *Trichoderma* spp. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 7 días o hasta observar la esporulación. Posteriormente se adicionaron 10 mL de Glicerol al 70% a cada matraz. Con ayuda de una barra magnética y una parrilla eléctrica con agitación se procedió a realizar el desprendimiento de los conidios a partir de la colonia del hongo, los cuales fueron colocados en tubos eppendorf estériles. Este procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

5.3. Producción del inóculo de *A. mexicana*

Para la obtención de esporas de *A. mexicana* se preparó un matraz de 125 mL con 25 mL medio PDA y se inoculó un cuadro de 1 cm² de *A. mexicana*, se incubó a 28°C durante 7 días o hasta observar la esporulación. Posteriormente se adicionaron 10 mL de Tween 20 al 0.01%, con ayuda de una barra magnética y una parrilla eléctrica con agitación, se procedió a realizar el desprendimiento de conidios a partir de la colonia del hongo y se colocaron en tubos estériles eppendorf. Este procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

5.4. Pruebas de confrontación en placa

5.4.1. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *A. mexicana*.

Para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990). Cada tratamiento se realizó por duplicado. En un extremo de la caja Petri con PDA se sembró por picadura micelio activo de la colonia de 8 días de desarrollo a 28°C de *A. mexicana* y se incubó durante 48 horas a esta misma temperatura. Posteriormente, en el otro extremo de la caja y por picadura se sembró *Trichoderma* spp. Las placas fueron incubadas a 25°C con fotoperíodos de 12 h oscuridad/luz como se muestra en la Figura 3. Se tomaron lecturas cada 24 h para determinar el número de días del primer contacto entre las hifas de los dos hongos, la zona de intersección, y a los 10 días, se clasificó el tipo de antagonismo según Bell *et al.* (1982), donde: Grado 1 = *Trichoderma* crece completamente sobre el patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, Grado 2 = *Trichoderma* crece sobre las dos terceras partes de la superficie del medio, Grado 3 = *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro, Grado 4 = el patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* y Grado 5 = el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del medio.

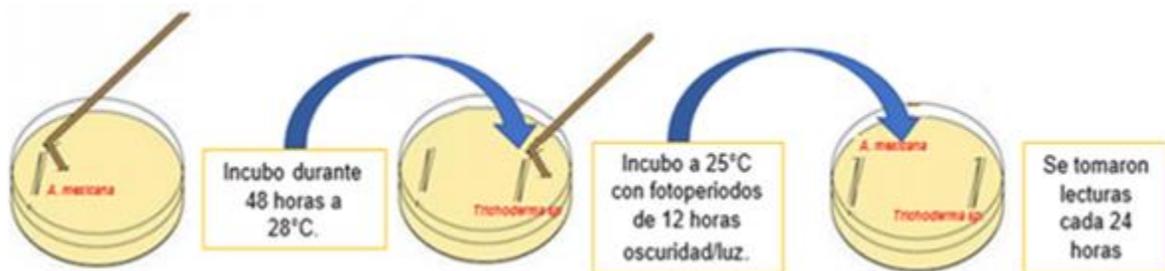


Figura 3. Técnica de Cherif y Benhamou (1990), para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp.

5.5. Evaluación del efecto micoparasítico de *Trichoderma* spp. sobre *A. mexicana*

Se tomó un fragmento de tres diferentes secciones de la placa; donde se observaba el crecimiento de *Trichoderma* spp, así como de *A. mexicana* y finalmente donde estaba la presencia de ambos hongos. Dichos fragmentos fueron inoculados en 25 mL de medio CPD e incubados a 28°C por 48h en agitación a 150 rpm. como se muestra en la Figura 4.

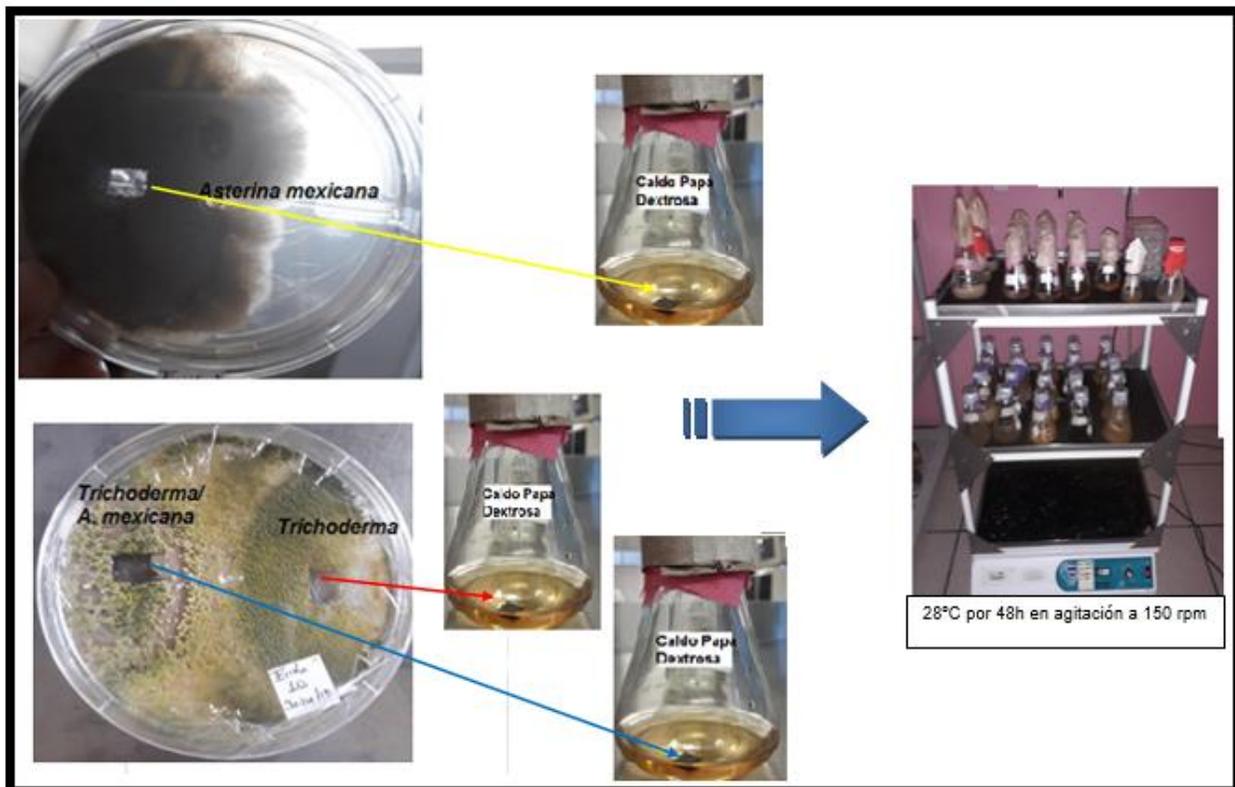


Figura 4. Evaluación del efecto micoparasítico de *Trichoderma* spp. sobre *A. mexicana*. Para observar el efecto inhibitorio de *Trichoderma* se tomó un fragmento de tres diferentes secciones de la placa: → *Trichoderma* spp → *A. mexicana* y finalmente donde está la presencia de ambos →

Al cabo de este período se observó el crecimiento en cada matraz.

5.6. Producción de antibióticos

5.6.1. Producción de compuestos volátiles

Se inocularon placas de PDA (90 x 25 mm) con un cuadro de 1 cm² del margen de la colonia de *Trichoderma* de 3 días de crecimiento y se incubaron durante 48 h a 25°C. En otra placa se inoculó un cuadro de micelio de 1 cm² del margen de la colonia del patógeno con un crecimiento de 5 a 7 días. Se reemplazó la tapa del cultivo de *Trichoderma* por la placa PDA inoculada con el fitopatógeno para que ambos hongos se encuentren uno frente al otro. Para la incubación, *A. mexicana* debió colocarse sobre *Trichoderma* para evitar contaminación por los conidios fúngicos micoparasitarios como se muestra en la Figura 5. Las condiciones de incubación fueron a 25°C con fotoperiodo luz/obscuridad 12h/12h durante 10 días. Se sellaron las placas de Petri con Parafilm.

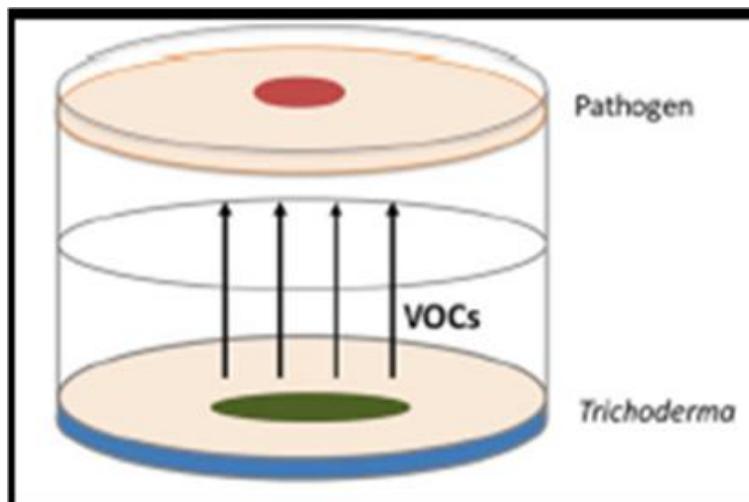


Figura 5. Evaluación de la Producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica sobre *A. mexicana* de las cepas de *Trichoderma* aisladas de *A. salmiana*.
Fuente: Glare *et al.*, 2016.



Para el control, se utilizó una placa PDA sin inocular *Trichoderma*. Cada tratamiento será realizado por triplicado.

Se midió el diámetro de la colonia del patógeno diariamente y se calculó la tasa de crecimiento radial.

El porcentaje de inhibición del control del patógeno de la planta se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición del micelio} = [(C - T) / C] \times 100.$$

Donde:

C= crecimiento micelial radial del patógeno de la planta en las placas de control (cm).

T= crecimiento micelial radial del patógeno de la planta en presencia de *Trichoderma* (cm).

5.6.2. Producción de metabolitos no volátiles

Se cubrieron las placas de PDA con papel celofán dulce y se inoculó centralmente con un cuadro de micelio de 1 cm² del margen de una colonia de *Trichoderma* de 3 días de crecimiento a 28°C. Las placas fueron selladas con una envoltura de plástico y se incubaron a 28°C en 12/12 h de luz / oscuridad de 2 a 3 días.

Se retiró con extremo cuidado el papel celofán con el crecimiento de *Trichoderma* de las placas de PDA y se inoculó en la misma placa una porción de micelio de 1 cm² del margen de la colonia del patógeno del crecimiento de entre 5 y 7 días a 28°C.

Para las placas de control se utilizó una placa de PDA únicamente con papel celofán sin inocular *Trichoderma*; así como también una placa de PDA que contiene el patógeno de la planta que se cultiva en una placa sin inocular *Trichoderma*. Se incubaron a 25°C hasta que la colonia del patógeno en el control cubrió toda la placa de Petri.



Se midió diariamente el diámetro de la colonia de *A. mexicana* tanto en los controles como en las placas de tratamiento, y se calculó la tasa de crecimiento radial y la inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición del micelio} = [(C - T) / C] \times 100.$$

Donde:

C= crecimiento micelial radial del patógeno de la planta en las placas de control (cm).

T= crecimiento micelial radial del patógeno de la planta en presencia de *Trichoderma* (cm).

5.7. Determinación de actividades enzimáticas en placa de *Trichoderma* spp

Se determinó la producción de proteasas y quitinasas en los hongos aislados en los medios que a continuación se describen:

Proteasas: Medio PDA-leche descremada

Quitinasas: Agar-Quitina

Para la determinación de proteasas se utilizaron placas con medio de Agar-leche descremada, las cuales se prepararon de la siguiente manera: a 400mL de agua destilada se le adicionaron 3.6 g de agar bacteriológico y 12 g de leche descremada. Esta solución se esterilizó a 121°C durante 15 min, para posteriormente ser vaciada en las placas de Petri.

La determinación de la producción de quitinasas por los hongos en estudio, se realizó utilizando placas de Agar-Quitina (Quitina coloidal al 10% y Agar al 2%).



El agar se preparó en 400 mL de agua destilada, 12g de Quitina coloidal, 0.8 g de Nitrato de sodio, 0.4 g de Fosfato Dipotásico, 0.2 g de Sulfato de Magnesio, 0.2 g de Cloruro de Potasio, 0.04g de Sulfato de Potasio, y 3.6 g de Agar bacteriológico; para después ser esterilizado a 121°C durante 15 min y ser vaciada en las placas de Petri

Todas las placas fueron inoculadas en el centro con un disco de 5 mm de diámetro del crecimiento de los hongos obtenido a partir de un cultivo de 5 días a 28°C en medio PDA, posteriormente fueron incubadas a 25°C durante 3 días monitoreando el crecimiento cada 24 h. Al finalizar este tiempo la actividad enzimática fue evidenciada con el crecimiento de *Trichoderma* en el medio.

En el caso de las quitinasas las placas fueron reveladas adicionando Yodo-Lugo al 10%, durante 24 hrs en oscuridad, la presencia de crecimiento del hongo o un halo claro indicó una prueba positiva.

5.8. Identificación molecular de cepas de *Trichoderma* spp.

Para la identificación molecular de los hongos aislados se realizó la extracción de ADN genómico de micelio. De cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. crecidas en 25 mL de CPD durante 3 días a 28°C a 150 rpm, se colectó la biomasa por centrifugación a 5000 rpm durante 30 min y se lavó con agua destilada estéril, se retiró el sobrenadante y la biomasa se pasó a un tubo de centrifuga de 15 mL, el cual se tapó con papel cera adherible, perforando la superficie con poros de ~1 mm de diámetro, posteriormente se congelaron a -80°C durante 48 hrs. Estos tubos con la biomasa se llevaron liofilización por 48h.

Para realizar la extracción se siguió el protocolo reportado por Huanca-Mamani et al., 2014 con las siguientes modificaciones: la biomasa liofilizada se vació a un mortero, se adiciono nitrógeno líquido y se trituro hasta obtener un polvo fino, que posteriormente se depositó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y se adicionaron 600 µL de buffer de lisis (CTAB al 2%, TRIS HCl 100Mm, NaCl 1.4 M, Na₂ EDTA 20 mM, LiCl 0.2%, *PVP al



1%, y *Mercaptoethanol al 0.2%, * se adicionan antes de usar), se mezcló por vortex y se incubó a 65°C durante 45 minutos. Pasado el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 2.5 µL de Proteinasa K (100mg/mL), se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después se centrifugo a 10 000 rpm, durante 15 min. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se agregaron 500 µL de Fenol Cloroformo, alcohol isoamilico (25:24:1) mezclando suavemente, se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se agregaron 500 µL de Cloroformo alcohol isoamilico (24:1), mezclándolo suavemente. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos, se tomó nuevamente el sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos y se pasó a un tubo de microcentrifuga nuevo. Para precipitar el DNA se adicionaron 500 µL de isopropanol frio, se dejó incubar a -20°C durante toda la noche; al termino de ese tiempo se centrifugo a 13,000 rpm por 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol; se centrifugo a 13,000 rpm 5 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante. Las muestras se dejaron secar para eliminar los restos de etanol y posteriormente al DNA se le adicionaron 30 µL de H₂O bidestilada estéril, libre de DNAsas y conservado a -20°C. La integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE al 1X y un voltaje de 80 v durante una hora, el DNA se visualizo por tincion con Bromuro de etidio en un transiluminador.

Para la amplificación de las regiones ITS 1 e ITS4 del gen 18sSrDNA de cada una de las muestras se realizó por medio de PCR utilizando el protocolo descrito por Peteira *et al.*, 2008 con algunas modificaciones, en un termociclador. La mezcla de la reacción se especifica en la Tabla 7 utilizando los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), utilizando como DNA molde el correspondiente a cada cepa de *Trichoderma*. El programa consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 1 min y extensión a 72°C por 7 min.

Tabla 1. Mezcla de la reacción para la amplificación de la región ITS a partir de DNA genómico del hongo asilado mediante PCR

Reactivo	Concentración	Volumen en μL
Agua Bidestilada	---	35.25
MgCl₂	25 mM	1,5
Buffer	5x	5
dNTPs	10 mM	1
ITS 1	10 mM	1
ITS 4	10 mM	1
Taq Polimerasa	5 U/ μL	0.25
DNA	---	5
Volumen Final		50

Los productos de PCR se purificaron con el Kit comercial: Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los productos purificados de PCR, fueron enviados para su secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA de la Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología.

Los electroferogramas fueron transformados a secuencias de nucleótidos en formato de texto, los cuales fueron visualizados, limpiados y editados de forma manual utilizando el software Chromas lite y BioEdit sequence alignment editor v. 7.2.6. Las secuencias editadas y obtenidas se compararon mediante el uso del algoritmo del programa BLAST, en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information



(NCBI). Posteriormente se buscaron secuencias similares a los hongos generados por el análisis BLAST, así como grupos externos y se realizó el estudio filogenético.

Para realizar el árbol filogenético se buscaron 10 secuencias de cada cepa con alto nivel de identidad y similitud en formato Fasta, las cuales fueron sometidas a un alineamiento múltiple mediante ClustalX para determinar las homologías entre ellas y finalmente en el software BioEdit fueron editadas manualmente.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa CLUSTAL X y editadas con el programa Bioedit, donde además se empleó BEAST que contiene programas como BEAST, BEAUti, TreeAnnotator las cuales se utilizaron para generar el árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud empleando una estrategia de búsqueda heurística conducida por el algoritmo de SPR (Subtree Pruning Regrafting) y 500 replicas de adición de taxa secuencial por pseudoreplica. El modelo de sustitución nucleotídica óptimo para las secuencias en estudio fue el “Criterio de Información corregido de Akaike”. Posteriormente el árbol fue visualizado en el programa Free Tree. Además, para definir la raíz inicial se utilizaron las secuencias de los hongos: *Hypomyces corticiicola*, *Hypomyces cervinus* e *Hypomyces robledoi* con clave de acceso MH860037, MG953988 MH86313 respectivamente. Finalmente se utilizó el programa Scape para editar el árbol filogenético.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El género *Trichoderma* incluye diferentes especies las cuales han sido ampliamente estudiadas por su efecto antifúngico y micoparasitico sobre hongos fitopatógenos de interés agrícola (López-Ferrer *et al.*, 2017). Los principales mecanismos por los cuales ejercen esta acción son: la competencia por espacio y nutrientes, antibiosis y micoparasitismo, (Benítez *et al.*, 2004).

En este trabajo se evaluaron diferentes cepas de *Trichoderma* spp aisladas de *A. salmiana*, con la finalidad de conocer su efecto sobre el hongo *A. mexicana*, que ocasiona la viruela o negrilla en esta planta (Domínguez-Rosales, 2009), aportando información del potencial de uso de las cepas evaluadas como agentes de biocontrol de la enfermedad.

Lo primero en realizarse fueron las pruebas de confrontación en placa para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp sobre *A. mexicana*, encontrando que de las 11 cepas evaluadas solo 6 presentaron la capacidad de crecer sobre el fitopatógeno como se muestra en la Figura 6, por otro lado 5 de ellas alcanzaron el grado 1 de micoparasitismo a los 10 días, lo que indica el hongo en estudio creció invadiendo toda la placa y sobre el crecimiento de *A. asterina* (Tabla 2).

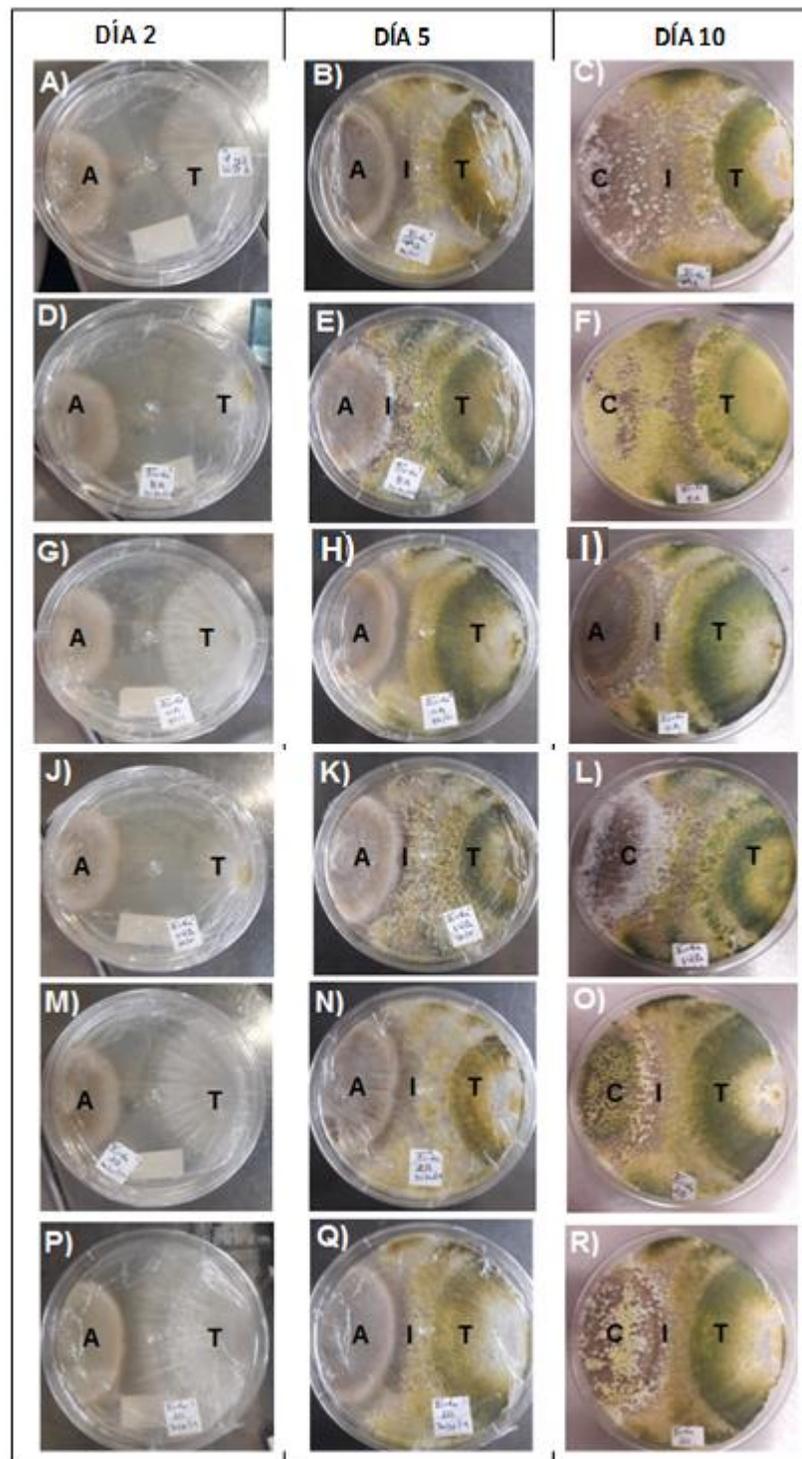


Figura 6. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *A. mexicana*. A), B), C): cepa 2A; D), E), F): cepa 8A; G), H), I): cepa 11A; J), K), L): cepa 14A; M), N), O): cepa 2B; P), Q), R): cepa 1C. A= *A. mexicana*, T= *Trichoderma* spp, I= Interacción entre ambos hongos y C= crecimiento de *Trichoderma* spp. sobre *A. mexicana*.



Tabla 2. Grado de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp aisladas de *A. salmiana* sobre *A. mexicana*

CEPA	DIA 2	DIA 5	DIA 10
2A	3	2	1
8A	3	2	1
11A	3	3	2
14A	3	2	1
2B	3	2	1
1C	3	2	1

Se clasificó el grado de antagonismo según Bell et al. (1982), donde: Grado 1 = *Trichoderma* crece completamente sobre el patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, Grado 2 = *Trichoderma* crece sobre las dos terceras partes de la superficie del medio, Grado 3 = *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro, Grado 4 = el patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* y Grado 5 = el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del medio.

El proceso de micoparasitismo en *Trichoderma*, se encuentra bien documentado, en donde el hongo invade el micelio del fitopatógeno envolviéndolo y penetrándolo para alimentarse de él, lo que ocasiona la pérdida de la viabilidad de este último (Martínez et al., 2013), probablemente es lo que se observa con las cepas que presentaron Grado 1 en las pruebas de confrontación.

Para corroborar lo anterior, se tomó el crecimiento de las zonas en las pruebas de confrontación en donde se encontraba el crecimiento de la cepa de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno y se sembró en un medio líquido como se describió en la metodología. En la mayoría de los casos no se observó el crecimiento de *A. mexicana* solo en la prueba para la cepa 11A que presentó un Grado 2 de antagonismo (Tabla 3 y Figura 7). Se ha visto que existen diferencias en el grado de virulencia de diferentes aislados de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Infante et al., 2009) lo cual es similar a los



resultados de este trabajo en donde una de las cepas evaluadas, aunque tienen un efecto sobre *A. mexicana* no es tan evidente como las demás.

Las pruebas fueron realizadas como se describe en los materiales y métodos.

Los resultados obtenidos en este trabajo se asemejan a los reportados por Michel-Aceves *et al.*, 2008; en dicho trabajo muestra que de 20 aislados de *Trichoderma* spp. todos inhibieron el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*, de los cuales solo seleccionaron 6 aislados contra el primero y 6 contra el segundo; en donde todos los aislados seleccionados se ubicaron en las clases 1 y 2 de antagonismo respectivamente; lo que demuestra que *Trichoderma* spp. tiene una alta capacidad antagónica contra diversos fitopatógenos.

Tabla 3. Crecimiento en matraz de la sección en donde se observó la interacción de micoparasitismo en placa. Prueba para corroborar el micoparasitismo.		
CEPA	<i>A. mexicana</i>	<i>Trichoderma</i>
2A	-	+++
8A	-	+++
11A	+	+++
14A	-	+++
2B	+	+++
1C	-	+++

* La presencia de los microorganismos en los cultivos se evaluó mediante observación directa.

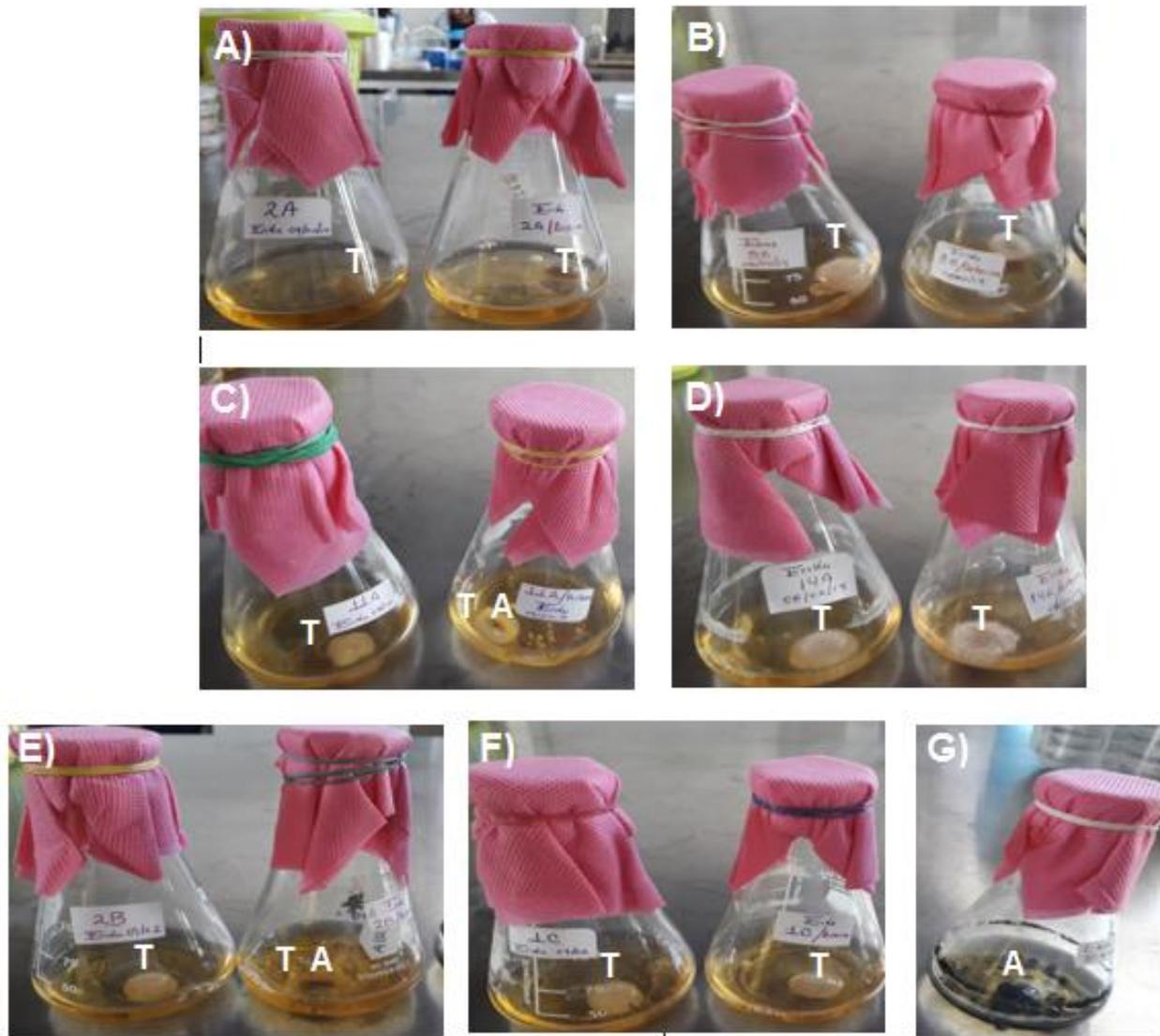


Figura 7. Prueba para corroborar el grado de micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* spp aisladas de *A. salmiana* sobre *A. mexicana*. A) *Trichoderma* spp. cepa 2A, B) *Trichoderma* spp. cepa 8A, C) *Trichoderma* spp. cepa 11A, D) *Trichoderma* spp. cepa 14A, E) *Trichoderma* spp. cepa 2B, F) *Trichoderma* spp. cepa 1C, G) *A. mexicana*. T= Crecimiento de *Trichoderma*. A= Crecimiento de *A. mexicana*.



La antibiosis es uno de los mecanismos que utiliza *Trichoderma* spp. para inhibir el crecimiento de un fitopatógeno mediante la producción de metabólicos tóxicos, sin tener contacto físico entre ellos. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos antagónicos (Martínez-Anaya *et al.*, 2008). Actualmente se han caracterizado cada vez más metabolitos secundarios que provocan un efecto inhibitorio o letal en fitopatógenos (Reino *et al.*, 2008); como es la producción de peptaiboles, estos presentan un efecto antifúngico causando severos daños como la formación de poros en la membrana del hongo parasitado, facilitando la entrada de la hifa en la célula la cual eventualmente muere sirviendo como alimento al micoparásito (Benítez, *et al.*, 2004; Atanasova, *et al.*, 2013).

Para evaluar la capacidad de inhibición de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *A. mexicana* mediante la producción de metabolitos no volátiles, se desarrolló la prueba en placa como se describe en la metodología; midiendo diariamente el crecimiento micelial de *A. mexicana* durante 10 días y así calcular el porcentaje de inhibición; obteniendo como resultado que todas las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron capacidad de inhibición sobre *A. mexicana*. La cepa de *Trichoderma* spp. con mayor efectividad fue la 14 A con un porcentaje de inhibición máximo de 55.2%, seguida de la cepa 11A con un 53.2 % y la 8A con un 52.6 %, como se muestra en la Tabla 5.



Tabla 5. Porcentaje de Inhibición de especies de *Trichoderma* contra *A. mexicana* a través de metabolitos no volátiles.

CEPA	CRECIMIENTO MICELIAL DEL PATOGENO (cm)	% DE INHIBICIÓN
2A	4.6 ± 0.2	40.9
8A	3.7 ± 0.1	52.6
11A	3.6 ± 0.3	53.2
14A	3.5 ± 0.1	55.2
2B	4.4 ± 0.4	42.9
1C	5.1 ± 0.8	33.1
CONTROL	7.7 ± 0.1	

Capacidad de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento del micelio de *A. mexicana* mediante de la producción de compuestos volátiles

Estos resultados demuestran que las cepas de *Trichoderma* spp. en estudio presentan antibiosis, mediante la producción de metabolitos no volátiles que inhiben el desarrollo de *A. mexicana*. Lo cual concuerda con lo reportado por Miguel-Aceves, *et al.*, 2008; en donde muestran el % de inhibición respecto a *A. solani* y *P. infestans* se encuentran entre 38.8% a 81.3 % y 16.3% a 85.5% respectivamente, mientras que en este trabajo se encuentran entre 33.1% a 55.2%.



En cuanto a la producción a la producción de metabolitos volátiles, se desarrolló la prueba en placa como se describe en la metodología; obteniendo como resultado que todas las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron capacidad de inhibición sobre *A. mexicana*, la cepa de *Trichoderma* spp. con mayor efectividad fue la 8A con un porcentaje de inhibición máximo de 29.5 %, la cepa con el porcentaje de inhibición mínimo fue la 11A con 16.9% como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de Inhibición de especies de <i>Trichoderma</i> contra <i>A. mexicana</i> a través de metabolitos volátiles.		
CEPA	CRECIMIENTO MICELIAL DEL PATOGENO (cm)	% DE INHIBICIÓN
2A	4.8 ± 1.4	21.3
8A	4.3 ± 0.4	29.5
11A	5.1 ± 0.6	16.9
14A	4.7 ± 0.4	23.5
2B	4.5 ± 0.7	25.7
1C	5.1 ± 1.2	17.2
CONTROL	6.1 ± 0.1	

Capacidad de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento del micelio de *A. mexicana* mediante de la producción de compuestos volátiles,



Los resultados obtenidos en este trabajo se pueden comparar con los reportados por Alanis, *et al.*, 2017, en donde analizan tres cepas de *Trichoderma* spp. que presentan capacidad de inhibición frente a *Dreschlera teres* mediante la producción de compuestos volátiles muestran un % de inhibición de 21.2, 21.3 y 42.82% con el aislado 1, mientras que el aislado 2 mostró porcentajes de 16.1, 6.33 y 32.2 %, para el caso del aislado 3 mostró de 27.9 y 27.4 %.

Los mecanismos involucrados en el control biológico de las especies de *Trichoderma* spp. han demostrado ser eficaces; uno de éstos es la producción de enzimas líticas, las cuales son responsables de la supresión del patógeno de la planta, destruyendo así la integridad de la pared celular. La producción de proteasa por *Trichoderma* spp. también se ha asociado con el control biológico; debido a que este tipo de enzimas descomponen las enzimas hidrolíticas en cadenas peptídicas y/o sus aminoácidos constituyentes y, por lo tanto, destruyen su capacidad para actuar sobre las células vegetales (Howell, 2003).

La actividad enzimática en este trabajo se determinó en placa como se describe en la metodología; de las 6 cepas de *Trichoderma* spp. en estudio solo 4 presentaron producción de quitinasas, al tener la capacidad de utilizar la quitina como fuente de carbono, siendo la cepa 1C la que presentó mayor capacidad de crecimiento, con un diámetro de 5.8 cm, mientras que las cepas 8A y 14A no presentaron ningún desarrollo como se muestra en la Tabla 6. En cuanto a la producción de proteasa se observa que todas las cepas de *Trichoderma* spp. crecieron en el medio que tenía leche como fuente de carbono y nitrógeno siendo la cepa 2B la que presento mayor desarrollo con un diámetro de 6.1 cm como se muestra en la Tabla 7.



Tabla 7. Actividad enzimas en las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizosfera de de *A. salmiana*

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
	PROTEASA (crecimiento en cm)	QUITINASA (crecimiento en cm)
2A	4.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1
8A	1.7 ± 0.1	0
11A	5.8 ± 0.2	5.4 ± 0.3
14A	3.2 ± 0.2	0
2B	6.1 ± 0.2	5.3 ± 0.6
1C	2.6 ± 0.2	5.8 ± 0.3

Producción de enzimas extracelulares de *Trichoderma* spp. en placa

La participación de varias enzimas hidrolíticas es necesaria para una lisis eficiente de la pared celular del fitopatógeno; por lo que el sinergismo entre enzimas y antibióticos hacen más efectivos los procesos de biocontrol (Lorito *et al.*, 1996, Di Pietro *et al.*, 1993)

Los métodos moleculares han surgido como una posible respuesta a los problemas asociados con las infecciones fúngicas, debido al aumento en la prevalencia de las infecciones y al tiempo que alcanza un diagnóstico mediante las técnicas microbiológicas clásicas (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008).

Una de las técnicas más utilizadas en biología molecular es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) principalmente para la identificación de hongos; la cual permite el análisis de pequeñas cantidades de células fúngicas, así como también la selección de cebadores universales específicos para hongos lo que ha proporcionado un fácil acceso a las secuencias de nucleótidos (Guarro *et al.*, 1999).

La extracción de ADN de alta calidad de hongos puede ser afectada debido a la presencia de una pared celular compleja, alto contenido de polisacáridos o metabolitos secundarios; por lo que en este trabajo se utilizó el protocolo de extracción reportado por Huanca-Mamani *et al.*, 2014, con algunas modificaciones como se muestra en la metodología; el cual ha demostrado ser un eficaz método para la obtención de ADN genómico de hongos.

El método de extracción utilizado permitió la obtención de ADN de alta calidad sin presencia de degradación: los rendimientos de ADN obtenidos variaron 400 a 900 ng/ uL con una relación A260 / A280 cercana a 1,9 y A260 / A230 alrededor de 1,7 indicando poca contaminación de proteínas, polisacáridos o compuestos aromáticos.

La integridad del DNA resultante de la extracción se verificó por medio de electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% que fue teñido con una solución de bromuro de etidio y visualizado con luz UV como se muestra en la Figura 8.

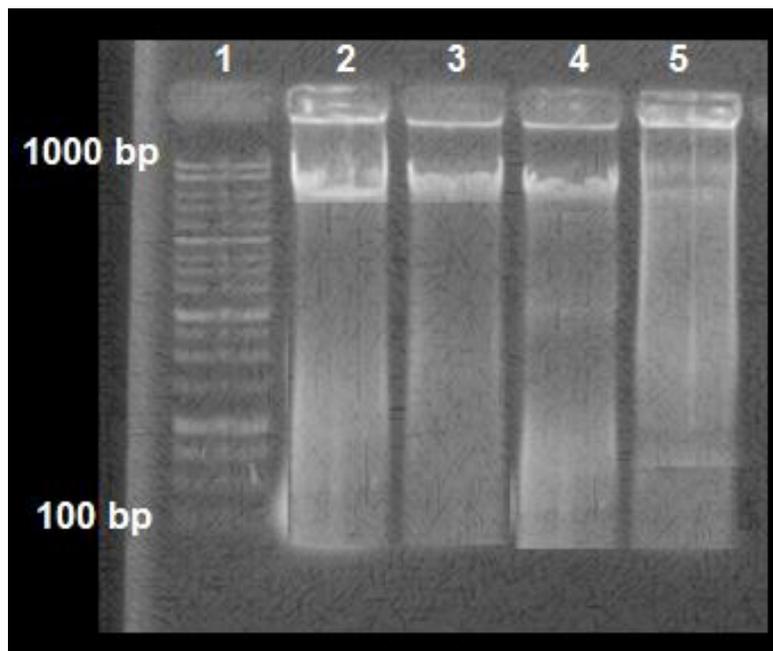


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracciones de DNA Genómico de cada muestra de *Trichoderma*: Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 cepa: 2A, carril 3 cepa 8A, carril 4: 14A y carril 5: 1C.

Estos resultados evidencian la efectividad del método de extracción por lo que el ADN extraído pudo ser utilizado para su amplificación mediante PCR como se indica en la metodología.

Con el fin de verificar la eficacia y la viabilidad de este método, los genes 18S rRNA de la región ITS se amplificaron mediante PCR (Figura 9). Utilizando la Cebadores ITS1 / ITS4, obteniendo bandas únicas de aproximadamente entre 500 y 600 pb para todas las cepas de *Trichoderma* spp.

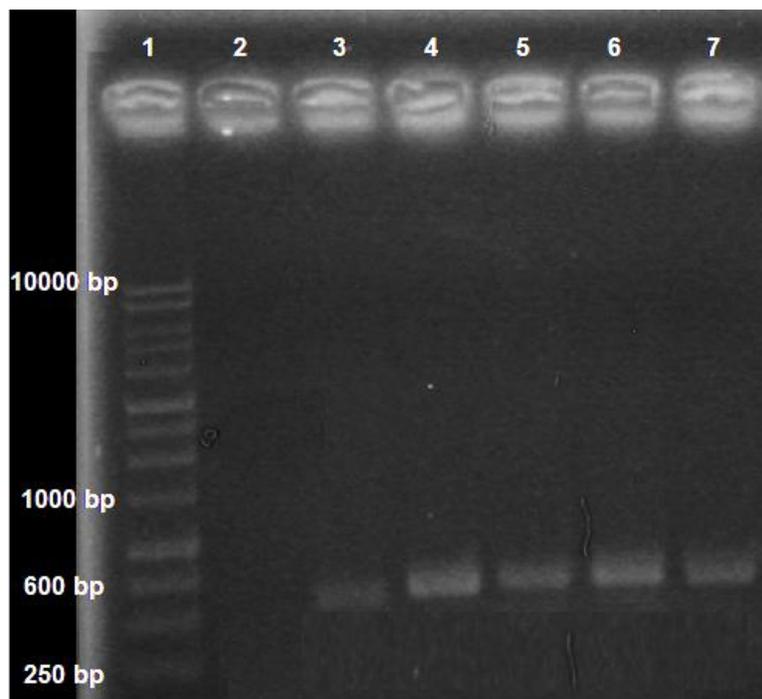


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de *Trichoderma*: carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo, carril 4: cepa: 2A, carril 5: cepa 8A, carril 6: cepa 14A y carril 7: cepa 2B.



Posteriormente fueron purificadas como se describe en la metodología para su secuenciación, obteniendo las secuencias como se muestra en las Tablas 8, 9, 10 y 11.

Tabla 8. Secuencia de la cepa de *Trichoderma* spp. correspondiente a la cepa 8A

```
>8645
CCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCCTGGCGGGGTCACGCCCGGGTGC GT
CGCAGCCCCGGAACAGGC GCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCT
CGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCGGC
GGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGC GTTGGG
GATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCGAAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCT
CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGC GTCCACGTCCGTA AAA
CACCCAAC TTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC TTAAGCA
TATCAA
```

Tabla 9. Secuencia de la cepa de *Trichoderma* spp. correspondiente a la cepa 2B

```
>8646
ATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCCTGGCGGGATCTCTGCCCGSGGTGCGTGCAGCCC
CGGACCAAGGC GCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAAC TCTTATTGTATACCCCTCGCGGG
TTTTTTTATAATCTGAGCCTTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGC GTTTCGAAAATGAATCAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGG
TCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTC TCCGAAATACAGTGGCGGTCT
TCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGC GTCCA
CAGCCGTAAACACCCAAC TTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG
AACTTAAGCATATCA
```

Tabla 10. Secuencia de la cepa de *Trichoderma* spp. correspondiente a la cepa 2A

```
>8647
CCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCCTGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGC GT
CGCAGCCCCGGAACAGGC GCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAAC TCTTATTGTATACCC
CTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGC GTTTCGAAAAT
GAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCGCCAGTATTCGGCGGGCATGCCGTGTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCT
CCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTC TCCGAAATACAG
TGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGG
CGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAAC TTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT
ACCCGCTGAAC TTAAGCATATCA
```



Tabla 11. Secuencia de la cepa de *Trichoderma* spp. correspondiente a la cepa 14A

```
>8648
AAACCCAATGTGAACGTTACCAAACGTTGCCTCGGC GGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCG
CAGCCCCGGAACAGGC GCCCGCCGGAGGAACCAACCAAAC TTTCTGTAGTCCCCTCG
CGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAAC TTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTC TGGCGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGC GTTGGGGA
TCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCT
CCTGCGCAGTAGTTTGCACAAC TCGACCGGGAGCGCGGC GCGTCCACGTCCGTAAAACA
CCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAA
```

Los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias en la base de datos del GenBank del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) mediante el análisis BLAST mostraron que, de las 4 cepas, 2 tienen una identidad del 100 % con *T. asperellum* y las 2 cepas restantes tienen una identidad del 100% con *T. harzianum*; sin embargo, fue necesario elaborar un árbol filogenético para corroborar el resultado.

Los análisis filogenéticos son una herramienta que apoya y valida los estudios moleculares, mediante la evidencia evolutiva y las relaciones que pueden mostrar entre especies (Morrone, 2001).

La ubicación taxonómica de las cepas en estudio es importante ya que representa el punto de partida que permitirá un mejor diseño de experimentos posteriores a fin de evaluar su actividad biológica bajo diferentes condiciones de crecimiento y determinar los mecanismos de acción que desarrollan. Esta información en conjunto permitirá una mejor selección de los organismos que pueden ser susceptibles de un mejor aprovechamiento en el biocontrol de patógenos de las plantas (Guigón-López, 2010).

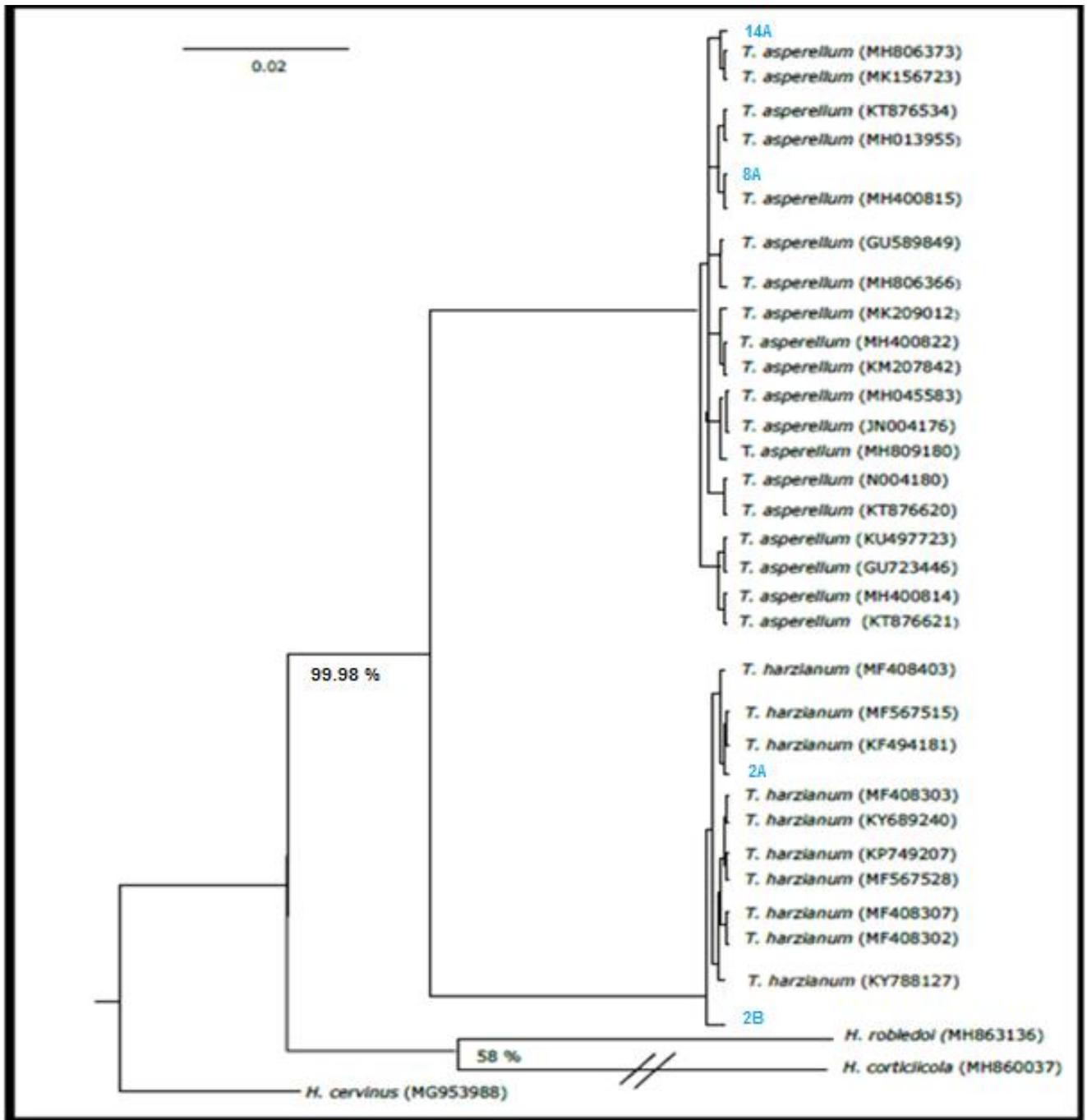


Figura 10. Árbol filogenético derivado de los datos de las secuencias de los hongos para la región ITS de *Trichoderma*.



7. CONCLUSIÓN

- Con base en los resultados obtenidos en este proyecto, se logró identificar cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *A. mexicana*.
- Se evidenciaron los mecanismos de antagonismo mediante los cuales cepas de *Trichoderma* spp. inhibieron el crecimiento de *A. mexicana* de manera in vitro.
- Se identificó el género y la especie a la que pertenecen las cepas de *Trichoderma* spp. con potencial como agentes de control biológico de *A. mexicana*.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Rivera, J. R., Charcas-Salazar, H., & Flores-Flores, J. L. (2001). El Maguey Mezcalero Potosino. San Luis Potosí. *SLP: Universidad Autónoma de San Luis Potosí*.
- Alanis, K. S., Hernández, N. J., & Avilés, M. N. C. (2017). Análisis del efecto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Trichoderma* spp., para el biocontrol de mancha en red en *Hordeum vulgare*, ocasionada por el fitopatógeno *Dreschlera teres*. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 3(2), 1-6.
- Anderson, R. K., Calvo, J., Serrano, G., & Payne, G. C. (2009). Estudio del estado de nutrición y los hábitos alimentarios de comunidades otomíes en el Valle del Mezquital de México. *Salud pública de México*, 51, S657-S674.
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC genomics*, 14(1), 121.
- Ayala, G. L. y Ruiz, G. (1996). Usos del maguey pulquero *Agave Salmiana* en México. *Ciencia Nicolaita*, 11.
- Backstrand, J. R., Allen, L. H., Black, A. K., de Mata, M., & Pelto, G. H. (2002). Diet and iron status of nonpregnant women in rural Central Mexico. *The American journal of clinical nutrition*, 76(1), 156-164.



- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.
- Cartagena-Luna A., (2014). Aislamiento e identificación de un hongo parásito con potencial para el control biológico de enfermedades en cereales. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica de Pachuca
- CESAVERG (2007). Campaña de manejo Fitosanitario de Agave. <https://docplayer.es/7442632-Campana-de-manejo-fitosanitario-de-agave.html>. Consultado en agosto 2018.
- Chérif, M., & Benhamou, N. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 80(12), 1406-1414.
- Chaparro, A. P., Hoyos-Carvajal, S L. Orduz, S. (2011). Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Science* Vol.2, No.3, 301-307.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M., and Harman, G. E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83:308-313.



- Domínguez-Rosales, M.S. (2009). Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de especies del género *Agave*. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Eraso-Insuasty, C., Acosta-Rodríguez, J., Salazar-González, C. y Betancourth-García, C. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma spp.* para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15 (2), 237-249.
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in microbiology*, 7, 1026.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*). In *Anales de biología* (No. 26, pp. 35-45). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.
- García, M. A. (2002). "Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico". *Cactus and Succulent Journal* (US). No 74. pp. 177-187.
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves en México. *Ciencias*. (087).
- Gentry, H. S. (2004). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press.



- Ghrisalberti, E.L., and Sivacithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotic produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 23:1011-1020.
- Glare, T. R., & Moran-Diez, M. E. (Eds.). (2016). *Microbial-based Biopesticides: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Goldman, G.H., Hayes, C., and Harman, G.E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Biotechnology Techniques* 12:478-482.
- Guarro, J., Gené, J., y Stchigel, AM (1999). Desarrollos en taxonomía fúngica. *Revisiones de microbiología clínica*, 12(3), 454-500.
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L., & Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 87-96.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43
- Hernández, E. O., Castillo, F. D. H., Herrera, R. R., Fuentes, S. E. V., Drouaillet, B. E., & Santillán, J. A. L. (2016). Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (67), 5-11.



- Howell, C.R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant disease*. 87: 4-10.
- Huanca-Mamani, W., Salvatierra Martínez, R., & Sepúlveda-Chavera, G. (2014). A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi. *Idesia*, 32, 75-78.
- Huerta-García A., (2017). Evaluación del efecto elicitor y estimulador del crecimiento vegetal del maíz de los lignosulfonatos y *Trichoderma harzianum* obtenidos de paja de cebada durante el proceso de infección con *Sporisorium reilianum*. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Pachuca.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21.
- Jacinto, R. J. y García-Moya, E. (2000). Remoción cuticular ("Mixiote") y desarrollo foliar en los agaves pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 73-79.
- Kamala, T., & Indira, S. (2011). Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3 Biotech*, 1(4), 217-225.

Leal-Díaz, A. M., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., López-Romero, P., ... & Avila-Nava, A. (2016). Aguamiel concentrate from *Agave salmiana* and its extracted saponins attenuated obesity



and hepatic steatosis and increased *Akkermansia muciniphila* in C57BL6 mice. *Scientific reports*, 6, 34242.

- López-Ferrer, U. D. C., Brito-Vega, H., López-Morales, D., Salaya-Domínguez, J. M., & Gómez-Méndez, E. (2017). Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales-cacaotal como un agente antagónico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(1).
- Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P., and Scala, F. (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:206-213.
- Lurá, M., Benítez, J., Jáuregui, S., & González, A. (2003). Evaluación de diferentes técnicas de extracción del ADN de hongos filamentosos. *R Fabricib*, 7, 37-44.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 119-131.
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30.
- Martínez, B. Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos, *Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1: 1-11*.
- Mercado-Flores, Y., Cárdenas-Álvarez, I. O., Rojas-Olvera, A. V., Pérez-Camarillo, J. P., Leyva-Mir, S. G., & Anducho-Reyes, M. A. (2014). Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. *Biological control*, 76, 36-40.



- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Rebolledo-Domínguez, O., y Lezama-Gutiérrez, R. (2004). Producción y actividad antibiótica del 6 pentil- α -pirona de *Trichoderma spp.*, sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22:14-21.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. (2008). Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. *Avances en investigación Agropecuaria*, 12(3).
- Muñiz-Márquez, D.B., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J.C. y Aguilar-González, C.N. (2013). Producción Artesanal del Aguamiel: Una Bebida Tradicional Mexicana. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. Volumen 5, No 10.
- Morrone, J. J. (2000). *Sistemática, biogeografía, evolución*. UNAM
- Narváez Suárez, A. U., Martínez Saldaña, T., & Jiménez Velázquez, M. A. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56).
- Nieto-Aquino, A., Vargas-Monter, J., Nieto-Aquino, J.C., Rodríguez-Ortega, A., Jiménez-Pérez, V.M., Hernández-Callejas, J. y Ortiz-Balderas, M. (2016). EL CULTIVO DE MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana*) EN EL VALLE DEL MEZQUITAL. Francisco I. Madero, Hidalgo 1ª Edición.
- Peteira, B., Toledo, V., & Martínez, B. (2008). Variabilidad molecular en aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan. *Revista de Protección Vegetal*, 23(3), 183-190.



- Ramirez, J. F., Sánchez-Marroquín, A., Alvarez, M. M., & Valyasevi, R. (2004). Industrialization of Mexican pulque. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 547-582.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123.
- Rodríguez-Tudela, J. L., Cuesta, I., Gómez-López, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martínez, L., & Cuenca-Estrella, M. (2008). Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, 47-53.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respinis, S., & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944-966.
- Sanchez-Marroquin, A., & Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(3), 246-249.
- Schneider, K. A., & Kelly, J. D. (2000). A greenhouse screening protocol for *Fusarium* root rot in bean. *HortScience*, 35(6), 1095-1098.
- Schuster, A., and Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 787-799.



- Valiente, M., y Pavone, D. 2013. Identificación de cepas de hongo *Trichoderma* spp. Por métodos moleculares. *FARAUTE*, Vol. 8, No. 2, 1-9.
- Vázquez García, A., Aliphat Fernández, M. M., Estrella Chulim, N. G., Ortiz Torres, E., Ramírez Juárez, J., & Ramírez, A. M. (2016). EL MAGUEY PULQUERO, UNA PLANTA MULTIFUNCIONAL Y POLIFACÉTICA: LOS USOS DESDE UNA VISIÓN MESTIZA E INDÍGENA. *Scripta Ethnologica*, 38.
- Weindling, R. (1932), *Trichoderma lignorum* como parásito de otros hongos del suelo. *Phytopathology*, 22, 837-845.