



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**ENDOFITISMO EN TRES ESPECIES DE *Trichoderma* spp. EN VITROPLANTAS  
DE *Vanilla planifolia* G. Jackson**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PRESENTA

ADRIANA MARLENNE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. DELFINO REYES LÓPEZ

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre de 2023.



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**ENDOFITISMO EN TRES ESPECIES DE *Trichoderma* spp. EN VITROPLANTAS  
DE *Vanilla planifolia* G Jackson**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PRESENTA

ADRIANA MARLENNE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. DELFINO REYES LÓPEZ

ASESORES

DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES

M. C. FABIÁN VÁZQUEZ CRUZ

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre de 2023.

La presente tesis titulada: **Endofitismo en tres especies de *Trichoderma* spp. en vitroplantas de *Vanilla planifolia* G Jackson** realizada por **Adriana Marlene Hernández Hernández**, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Consejo particular integrado por:

Firma

Director: **Dr. Delfino Reyes López**



---

Asesor: **Dra. Carmela Hernández Domínguez**



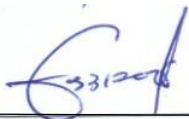
---

Asesor: **Dr. Luis Antonio Domínguez Perales**



---

Asesor: **M C Fabiel Vázquez Cruz**



---

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre de 2023.

El presente trabajo forma parte del Cuerpo Académico denominado: BUAP- CA 355 **Agrobiotecnología y recursos naturales** y de la línea de investigación: **Biotecnología, conservación y protección vegetal**. Dicho trabajo, fue financiado por: recursos propios.

## DEDICATORIA

Al Señor por dar me vida, salud y sabiduría, por permitir me vivir cada etapa y guiar me en el camino para así poder llegar a ser la persona que soy ahora.

A mi madre Estefania, por siempre creer en mí, dar me su amor incondicional, apoyar me en todas las decisiones que he tomado y ser el mayor ejemplo de superación, por nunca dejar que me rindiera y ayudar me a cumplir mis metas. Te amo muchísima.

A mis hermanas Alma, Bere, Gristy, que siempre han creído en mí, que me han apoyado en cada etapa de mi vida, gracias por las palabras y acciones que lograron que llegara a la meta.

A mi hija Kendra, que es mi motor de vida y que fue por quien seguí adelante en ser una mejor persona y llegar a ser profesionalista, te amo mucho mi pequeña.

A mi esposo Juan Carlos por apoyar me en todas mis locuras y siempre alentarme a hacer nuevas cosas, por estar en los momentos más complicados, por siempre aferrarte y no soltar me eres una persona importante para que yo pudiera lograr esta meta.

A mis compañeros y amigos, que siempre estuvieron presentes apoyándome y dándome ánimos para yo poder culminar mi carrera universitaria.

A todas las personas que estuvieron presentes y apoyándome moralmente para poder finalizar esta etapa de mi vida.

Gracias a todos los docentes que estuvieron presentes en mi formación académica, les agradezco por brindarme los conocimientos y estrategias que fueron fundamentales para poder llegar aquí.

## AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias por brindarme el espacio para realizar este experimento, por el apoyo, las herramientas y aparatos necesarios para el desarrollo de esta tesis.

Le agradezco infinitamente al doctor Delfino Reyes López por darme la oportunidad de realizar esta investigación, es uno de los mejores maestros que he conocido. Gracias por estar presente en cada proceso para finalizar esta tesis, gracias por toda la dedicación, paciencia, por las correcciones y palabras que hicieron posible este experimento. Estoy agradecida de que me haya compartido sus conocimientos y ser un guía, siempre los tendré en cuenta para mi futuro profesional.

Gracias a la doctora Cárnela Hernández y al doctor Luis Antonio Domínguez por tener el tiempo y compromiso en asesorarme y compartirme sus conocimientos, gracias por todas las enseñanzas que me brindaron, son una parte fundamental para culminar este proceso.

Le agradezco al M.C. Fabiel Vázquez por tomarse el tiempo y dedicación para apoyarme en esta tesis, gracias por las enseñanzas.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> . . . . .	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> . . . . .	iv
<b>RESUMEN</b> . . . . .	vi
<b>ABSTRACT</b> . . . . .	vii
<b>I INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	1
<b>II OBJETIVOS</b> . . . . .	3
2.1. Objetivo general . . . . .	3
2.2. Objetivos específicos . . . . .	3
<b>III HIPÓTESIS</b> . . . . .	4
<b>IV REVISIÓN DE LITERATURA</b> . . . . .	5
4.1. Importancia económica de la vainilla . . . . .	5
4.2. Generalidades de la vainilla . . . . .	5
4.2.1. Descripción morfológica . . . . .	5
4.3. Definición de endofitismo . . . . .	6
4.4. Cultivo de tejidos o propagación <i>in vitro</i> . . . . .	6
4.4.1. Morfogénesis u organogénesis . . . . .	6
4.5. Fases de la propagación <i>in vitro</i> . . . . .	7
4.5.1. Manejo de las plantas madre . . . . .	7
4.5.2. Establecimiento . . . . .	7
4.5.3. Multiplicación . . . . .	7
4.5.4. Enraizamiento . . . . .	8
4.5.5. Aclimatación . . . . .	8
4.6. Generalidades de <i>Trichoderma spp.</i> . . . . .	8
4.7. Importancia de <i>Trichoderma spp.</i> como agente de biocontrol . . . . .	9
4.8. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma spp.</i> . . . . .	10
<b>V MATERIALES Y MÉTODOS</b> . . . . .	11
5.1. Localización del experimento . . . . .	11
5.2. Material vegetal utilizado . . . . .	11
5.4. Obtención de los explantes . . . . .	12
5.5. Desinfección . . . . .	12
5.6. Primera siembra de explantes . . . . .	13

5.7.	Segunda siembra . . . . .	13
5.8.	Tercera siembra . . . . .	13
5.9.	Adquisición de explantes . . . . .	14
5.10.	Desarrollo de plántulas en cámara de incubación . . . . .	14
5.11.	Obtención y preparación de hongos <i>Trichoderma</i> . . . . .	14
5.12.	Inoculación de explantes . . . . .	14
5.13.	Sustrato utilizado para aclimatación . . . . .	15
5.14.	Trasplante de las vitroplantas al sustrato . . . . .	15
5.15.	Aclimatación . . . . .	15
5.16.	Crecimiento del hongo a partir de la raíz . . . . .	15
5.17.	Observación del crecimiento de los hongos en medio de cultivo . . . . .	15
5.18.	Observación de endofitismo de los hongos en la raíz . . . . .	16
5.19.	Obtención del peso fresco y porcentaje de materia seca . . . . .	16
5.20.	VARIABLES A EVALUAR . . . . .	16
5.21.	Diseño experimental . . . . .	17
5.22.	Análisis estadístico . . . . .	17
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>18</b>
6.1.	Endofitismo . . . . .	18
6.1.1.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> . . . . .	18
6.1.2.	<i>Trichoderma harzianum</i> . . . . .	21
6.1.3.	<i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	24
6.2.	VARIABLES MORFOLÓGICAS DE PLÁNTULAS <i>in vitro</i> INOCULADAS CON TRES TIPOS DE HONGOS DEL GÉNERO <i>Trichoderma</i> . . . . .	26
6.2.1.	Longitud de tallo de vitroplantas de vainilla. . . . .	26
6.2.2.	Dímetro de tallo de vitroplantas de vainilla. . . . .	27
6.2.3.	Número de hojas en vitroplantas de vainilla. . . . .	28
6.2.4.	Longitud de raíz en vitroplantas de vainilla . . . . .	29
6.2.5.	Dímetro de raíz en vitroplantas de vainilla . . . . .	30
6.2.6.	Número de raíces primarias en vitroplantas de vainilla . . . . .	31
6.3.	Porcentaje de materia seca (MS) . . . . .	32
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>33</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA . . . . .</b>	<b>34</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

---

Contenido	Página
<b>Cuadro 1.</b> Porcentaje de materia seca (MS) en plantas inoculadas con hongos del género <i>Trichoderma</i> .....	32

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Figura 1.</b> Ubicación de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias .....	11
<b>Figura 2.</b> a: Infestación de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio de cultivo;	
b: Crecimiento de micelio a partir de raíz .....	18
<b>Figura 3.</b> a: Crecimiento de micelio en <i>Trichoderma longibrachiatum</i> b: Coloración	
blanquecina de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	19
<b>Figura 4.</b> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> visto al microscopio a 100x .....	20
<b>Figura 5.</b> Invasión de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en raíces de vitropiantas de vainilla visto	
al microscopio a 40x .....	20
<b>Figura 6.</b> a: Porcentaje de endofitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio de cultivo;	
b: Crecimiento del hongo <i>Trichoderma harzianum</i> en raíces de vainilla .....	21
<b>Figura 7.</b> a: Coloración verdosa de <i>Trichoderma harzianum</i> ; b: Apariencia algodonosa	
de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	22
<b>Figura 8.</b> <i>Trichoderma harzianum</i> visto al microscopio a 100 x .....	22
<b>Figura 9.</b> Invasión de <i>Trichoderma harzianum</i> en raíces de vainilla visto al microscopio a	
100 x .....	23
<b>Figura 10.</b> a: Endofitismo de <i>Trichoderma reesei</i> ; b: Apariencia algodonosa de	
<i>Trichoderma reesei</i> .....	24
<b>Figura 11.</b> Coloración verdosa de <i>Trichoderma reesei</i> .....	24
<b>Figura 12.</b> <i>Trichoderma reesei</i> visto al microscopio a 100 x .....	25
<b>Figura 13.</b> Invasión de <i>Trichoderma reesei</i> en raíces de vainilla visto al microscopio a 100 x.	25
<b>Figura 14.</b> Longitud de tallo en vitropiantas de vainilla, donde medias con la misma letra en	
cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey	
( $P \leq 0.05$ ) .....	26
<b>Figura 15.</b> Diámetro de tallo de vitropiantas de vainilla, donde medias con la misma letra en	
cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey	
( $P \leq 0.05$ ) .....	27
<b>Figura 16.</b> Número de hojas en vitropiantas de vainilla, donde medias con la misma letra	
en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ ) .....	28
<b>Figura 17.</b> Longitud de raíz de vitropiantas de vainilla, donde medias con la misma letra	
en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ ) .....	29

- Figura 18.** Dámetro de raíz de vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )..... 30
- Figura 19.** Número de raíces primarias de vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).. 31
-

## RESUMEN

La vainilla pertenece a la familia de las orquídeas, la cual tiene la capacidad de convivir con diversos hongos del suelo para obtener sus nutrientes que le permitan un buen desarrollo vegetativo. Sin embargo, en México se tienen pocos estudios relacionados con hongos benéficos que se puedan utilizar de manera comercial. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue inocular plántulas de *Vanilla planifolia* G Jackson propagadas *in vitro* con tres especies de hongo del género *Trichoderma* spp. y conocer su efecto en el desarrollo vegetativo. Se obtuvieron plántulas *in vitro* de vainilla, las cuales se inocularon con *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei*. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos, cinco repeticiones y como unidad experimental cuatro plantas. Las variables que se evaluaron fueron el porcentaje de endofitismo, longitud de tallo, diámetro de tallo, número de hojas, longitud de raíz, diámetro de raíz, número de raíces primarias y peso de la materia seca. Todos los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y prueba de medias de Tuckey. Los resultados indicaron que las tres especies lograron entrar al sistema radicular de las vitroplantas. Sin embargo, fue *Trichoderma longibrachiatum* la que presentó mayores valores en las variables medidas, por lo que dicho hongo puede ser considerado para ser incluido en los sustratos que se utilizan de manera comercial para el cultivo de vainilla.

**Palabras clave:** *Vanilla planifolia*, *in vitro*, mutualismo, medio de cultivo.

## ABSTRACT

Vanilla belongs to the orchid family, which has the ability to coexist with various soil fungi to obtain their nutrients that allow good vegetative development. However, in Mexico there are few studies related to beneficial mushrooms that can be used commercially. Therefore, the objective of this work was to inoculate *Vanilla planifolia* G Jackson seedlings propagated *in vitro* with three species of fungus of the genus *Trichoderma* spp. and know its effect on vegetative development. *In vitro* vanilla seedlings were obtained, which were inoculated with *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma reesei*. A completely randomized experimental design was used with four treatments, five repetitions and four plants as experimental unit. The variables that were evaluated were the percentage of endophytism, stem length, stem diameter, number of leaves, root length, root diameter, number of primary roots and dry matter weight. All the data obtained were analyzed by means of an analysis of variance and Tuckey's test of means. The results indicated that the three species managed to enter the root system of the vitroplants. However, it was *Trichoderma longibrachiatum* that presented the highest values in the measured variables, so this fungus can be considered to be included in the substrates that are used commercially for vanilla cultivation.

**Key words:** *Vanilla planifolia*, *in vitro*, mutualism culture medium

## I INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* G Jackson) es una especie perenne, con crecimiento vegetativo durante los dos primeros años y en el tercer año comienza la producción de flor, después de este momento, la planta produce frutos anualmente. La vainilla es la única especie de la familia de las orquídeas que produce frutos comestibles (Hernández- Hernández, 2011).

En México, el principal estado productor de vainilla es Veracruz con aproximadamente el 70 % del total, en orden de importancia le siguen los estados de Oaxaca y Puebla con el 30 % y por sus características climáticas y culturales los estados de Hidalgo, Chiapas y Quintana Roo producen cantidades no significativas de vainas de vainilla (Vázquez *et al.*, 2014).

La importancia del estudio de la vainilla como cultivo, no sólo radica en su potencial económico, sino también, por su relevancia como recurso genético primario que se encuentra severamente amenazado en su hábitat original. Las causas fundamentales están asociadas al desconocimiento de la variación genética de especies silvestres, a la excesiva recolección para su propagación vegetativa y a la pérdida de la calidad del producto, debido a la subutilización de otras especies distintas a *V. planifolia* (Castañón *et al.*, 2017).

Actualmente, la vainilla está catalogada como una especie en peligro de extinción (NOM 059-SEMARNAT – 2010) ya que está siendo explotada lo que ha llevado a la disminución de sus poblaciones silvestres y a una reducción de su diversidad genética (Soto-Arenas, 1999; SAGARPA 2010).

La vainilla es hospedera de microorganismos endófitos los cuales habitan en los tejidos internos de una planta sin resultar patógenos para ella. En general, la investigación ha demostrado que los endófitos bacterianos pueden ser un factor clave en la reducción de la vegetación, la promoción del crecimiento de la planta, el aumento de la absorción de minerales, la fijación de nitrógeno, la supresión de enfermedades y la inducción de mecanismos de defensa (Bailey y Lumden, 1998).

*Trichoderma* spp. es un hongo benéfico que se encuentra de forma natural y que ha sido utilizado ampliamente en la agricultura como biocontrolador de patógenos y promotor del crecimiento de las plantas. Tiene una amplia capacidad para colonizar y establecer una relación con las raíces de vainilla (Fernández *et al.*, 2014).

La vainilla puede formar una asociación con hongos endófitos es por eso que inocular vainilla con *Trichoderma* produce beneficios en su capacidad para protegerla contra enfermedades causadas por hongos patógenos. *Trichoderma* spp. actúa como un escudo, compitiendo por los nutrientes y espacio con los hongos perjudiciales, impidiendo así su crecimiento y evitando la aparición de enfermedades como la podredumbre de la raíz y la roya ( Quesada *et al.*, 2015).

Además, *Trichoderma* spp. es capaz de producir enzimas y metabolitos que estimulan el crecimiento de las plantas. Estas sustancias promueven el desarrollo de las raíces, mejoran la absorción de nutrientes y aumentan la resistencia de la vainilla frente a condiciones adversas como la sequía y la salinidad del suelo. De esta manera, la vainilla inoculada con *Trichoderma* spp. tiene un mayor potencial para adaptarse y sobrevivir en campo abierto (Balboa *et al.*, 2017).

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- Inocular tres especies de hongo del genero *Trichoderma* spp. en plántulas de *Vanilla planifolia* G Jackson obtenidas de cultivo *in vitro*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obtener plántulas de *Vanilla planifolia* G Jackson mediante cultivo *in vitro*
- Inocular vitropiantas de *Vanilla planifolia* G Jackson con *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma harzianum*
- Determinar la capacidad de endofitismo de tres especies de *Trichoderma* spp. en vitropiantas de *Vanilla planifolia* G Jackson.

### III. HIPÓTESIS

El hongo *Trichoderma longibrachiatum* tendrá mayor capacidad de endofitismo en las raíces de vitroplantas de *Vanilla planifolia* G Jackson que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei*, debido a que la especie *longibrachiatum* tiene mayor capacidad de reproducirse y crecer en distintos medios.

## IV REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Importancia económica de la vainilla

La vainilla es originaria de las selvas tropicales del sureste de México, y América Central. distribuido desde Veracruz, San Luis Potosí, Puebla, Tabasco, Chiapas, hasta la Península de Yucatán en México. Actualmente, alrededor del 80 % de la vainilla natural del mundo proviene de pequeñas granjas en Madagascar e Indonesia (Barrales-Cureño y Herrera-Cabrera, 2023).

En México en el año 2021 se produjeron 609.57 toneladas de vainilla y se cosecharon 1,046.46 hectáreas. Los principales estados en los que se cultivó dichas cantidades fueron Veracruz con una producción de 465.38 toneladas, Puebla con una producción de 74.06 toneladas, Oaxaca con una producción de 61.53 y San Luis Potosí con una producción de 8.6 toneladas (SADER, 2022).

Los países que exportan y reciben productos derivados de la vainilla, Madagascar es el país que más produce vainilla, mientras EUA es el principal importador a nivel mundial. Muchos de los países exportadores de la vainilla entera son países productores: Madagascar (56%), seguido por Francia (8%), Indonesia (7%), Canadá (6%), Alemania (5%), Papúa Nueva Guinea (4%). En el caso de la vainilla triturada o molida, los países que produjeron y comercializaron las vainas de vainilla son Francia (26%), Alemania (21%), Madagascar (16%), EUA (6%), Comoras (4%), Reino Unido, República Checa e Indonesia (3% cada uno), seguidos por Polonia y Papúa Nueva Guinea (2%) y el resto con 14% (SER, 2022).

### 4.2 Generalidades de la vainilla

La vainilla pertenece a la familia de las *Orchidaceae* y forma parte del género *Vanilla* en él se incluyen aproximadamente 155 especies, para la producción comercial de vainilla sólo se cultivan tres especies; *Vanilla planifolia* G Jackson o *Vanilla fragans* Salisbury, *Vanilla pompona* Schiede y *Vanillatahitensis* (Herrera-Cabrera, 2018).

#### 4.2.1 Descripción morfológica

Las hojas son flexibles, subsésiles, elípticas, laureadas y suculentas, como el tallo y se disponen de manera alterna a lo largo del tallo acompañados de una yema, la cual no se desarrolla y por la raíz adventicia en el lado opuesto de la hoja. La hoja es una estructura importante, dado que su morfología es útil para la identificación de la especie y la variedad de la planta de vainilla (Palacios *et al.*, 2021).

Las flores se presentan en inflorescencia o racimos conocidos como macetas y brotan de las axilas de las hojas; por lo general, son simples de 5 a 8 cm de longitud y agrupadas. La planta llega a tener de 10 a 15 racimos de flores, compuesto cada uno de más de 10 flores individuales, las cuales son de color aperlado, blanco amarillento, cuyos brotes florales abren de uno a tres cada mañana en la primavera, pero mueren por las tardes y cuando son polinizadas dan lugar a un fruto carnoso y alargado, de 15 a 25 cm de longitud (Rodríguez-López y Martínez-Castillo, 2019).

El fruto es una cápsula dehiscente, que presenta tres costados cóncavos, en forma cilíndrica, de color verde brillante cuando inmaduro y el cual se torna de verde a amarillo a medida que madura. Su longitud varía de 13 a 25 cm y su diámetro entre 10 y 15 mm (Ruiz-Espinosa, 2018).

### **4.3 Definición de endofitismo**

Los microorganismos endófitos son bacterias, hongos o virus que viven total o parcialmente dentro de los tejidos internos de las plantas sin dañar a su huésped y que participan en una interacción simbiótica que modula la salud de las plantas y su capacidad para adaptarse a diversos factores estresantes ambientales (Hardoim *et al.*, 2015).

Las bacterias endófitas representan un subgrupo dentro de la comunidad de bacterias de la rizosfera y del rizoplasma que colonizan los tejidos de las raíces internas de la planta huésped y ofrecen ventajas ecológicas sobre otras poblaciones que colonizan epífitamente (Rosenbluet h y Martínez-Romero, 2006).

### **4.4 Cultivo de tejidos o propagación *in vitro***

El cultivo de tejidos vegetales comienza inicialmente a partir de explantes y estos pueden ser de cualquier tejido vegetal, aunque principalmente se utilizan embriones, raíces y brotes (Ochoa-Villareal *et al.*, 2015).

Esta técnica se basa en el concepto de totipotencialidad de las células vegetales, misma que se define como la habilidad de una célula de expresar el genoma completo por medio de la división celular (Hussain *et al.*, 2015).

#### **4.4.1 Morfogénesis u organogénesis**

La organogénesis puede ocurrir de dos formas diferentes de acuerdo con el proceso morfogénico que da origen a los nuevos tallos, y que a su vez depende del grado de

competencia y determinación presente en las células que conforman el explante (Schwarz y Beaty, 1996).

La competencia se define como la condición en la cual las células han adquirido o retenido la capacidad de diferenciación organogénesis celular para formar nuevas estructuras, mientras que la determinación se entiende como el grado de compromiso que tiene la célula en su programación biológica para seguir un proceso morfológico controlado genéticamente sin verse afectadas por los estímulos externos (Christianson y Wárník, 1983).

## **4.5 Fases de la propagación *in vitro***

### **4.5.1 Manejo de las plantas madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

### **4.5.2 Establecimiento**

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana a quince días, comenzando el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

Comúnmente se emplea como medio basal el medio MS completo sugerido por Murashige y Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas.

### **4.5.3 Multiplicación**

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de

callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica (Omos *et al.*, 2010). Generalmente esta etapa comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica, generalmente, el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente de auxinas más que citocininas) para favorecer la diferenciación. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular (Omos *et al.*, 2010).

#### 4.5.4 Enraizamiento

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente yemas individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo 2004).

#### 4.5.5 Aclimatación

Las plántulas que fueron desarrollándose *in vitro* se transfieren a condiciones de exterior; estas plantas necesitan un proceso de adaptación con el fin de proveer estabilidad en campo. Las plántulas se trasplantan en sustratos estériles y son monitoreadas bajo invernadero, con estricta atención en los procesos fisiológicos que requieren (Perea, 2010).

### 4.6 Generalidades de *Trichoderma spp.*

Los hongos *Trichoderma* normalmente se encuentran en tejidos vegetales que están en descomposición. Son organismos que dominan el suelo, debido a que poseen una naturaleza agresiva tienen la capacidad metabólica que permite que compita con otros microorganismos (Insuasty *et al.*, 2014).

Samuels e Ismail (2009) mencionan que *Trichoderma* comprende alrededor de 386 especies sin fase sexual evidente. El micelio que produce son septos simples. Las especies son haploides y su pared celular está compuesta por quitina y glucano. Su reproducción es asexual por conidios. Muestran conidióforos hialinos ramificados, filiales simples o que esta por grupo, los

conidios presentan un diámetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$  normalmente son ovalados unicelulares, de coloración normalmente verde, con un desarrollo veloz en medios sintéticos. Posee la capacidad de producir clamidosporas unicelulares que pueden unirse entre dos o más. Son estructuras de valiosa importancia para poder sobrevivir en el suelo bajo condiciones desfavorables. Este organismo se desarrolla y se ramifica desarrollando hifas, de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. Los hongos *Trichoderma* son aeróbicos, que posee la capacidad de resistir un drástico cambio de temperatura, encontrando especies aisladas que sobreviven en temperaturas desde 4° a 35° C

La luz es un factor importante en el desarrollo de *Trichoderma* ya que esto permite que la esporulación aumente. Las especies de *Trichoderma* pueden crecer en suelos con pH desde 5.5 a 8.5 pero sus valores óptimos están entre 5.5 y 6.5 es decir en un ambiente ácido. Para que *Trichoderma* pueda desarrollarse se necesita de humedad, con una retención del suelo óptima del 60%. Se encuentran principalmente en suelos ricos en materia orgánica y por su relación con esta, se encuentra dentro del grupo de hongos hipogeos, lignícolas y predadores (Martínez *et al.*, 2013).

#### **4.7. Importancia de *Trichoderma* spp como agente de biocontrol**

*Trichoderma* es considerado como buen biocontrolador ya que tiene la capacidad de sintetizar compuestos antagónicos como lo son las proteínas, enzimas y antibióticos, además de sustancias promotoras de crecimiento como lo son las vitaminas y hormonas, favoreciendo así a los cultivos agrícolas (Navaneetha *et al.*, 2015).

*Trichoderma* posee propiedades antagónicas contra hongos patógenos las cuales se basan en la activación de múltiples mecanismos que influyen en la competencia por nutrientes y espacio, el microparasitismo, la antibiosis la promoción del crecimiento vegetal e inducción de respuestas de defensa vegetal (De Aguiar *et al.*, 2014). Es el proceso de microparasitismo, *Trichoderma* produce enzimas que hidrolizan la pared celular de los hongos los cuales está parasitando, las cuales comúnmente son reconocidas por las proteasas, quitinasas y las glutanasas (Marcello *et al.*, 2010) que provocan que la membrana plasmática se retraiga y el citoplasma sufra una desorganización. De igual manera inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo (Romero-Cortes *et al.*, 2016).

#### 4.8 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp

Los hongos de *Trichoderma* deben estar en un suelo que contenga materia orgánica para que pueda realizar el control de patógenos correctamente. Uno de los principales mecanismos que están involucrados en la actividad de biocontrol es la competencia por espacio y nutrientes, la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Ros *et al.*, 2016). Las enzimas hidrolíticas tienen la función de degradar parcialmente la pared celular de los patógenos y llevan a cabo la función de parasitismo. *Trichoderma* spp. comúnmente produce hifas enredando a los patógenos, por lo cual las enzimas que contienen ellos se inactivan, asociándolo a la planta libre a una resistencia sistémica haciendo que el crecimiento aumente, mejorando el desarrollo de las raíces, la productividad la resistencia al estrés abiótico, la absorción y el uso de nutrientes (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016).

En la defensa de las plantas *Trichoderma* spp. penetra las primeras dos capas de la célula epidérmica en el tejido de la raíz, invaden los espacios y comienzan a crecer entre la membrana plasmática y la pared celular de la planta (Infante *et al.*, 2009). La colonización estimula el crecimiento en las plantas, compite por la obtención de biomasa, generando así una mayor germinación en las semillas y modifica la composición de la raíz, aumentando la productividad (Hermosa *et al.*, 2012). Así como también tiene la capacidad de modular los niveles de las hormonas producidas por la planta, estos hongos poseen la capacidad de contribuir con sus propias hormonas (Pacheco *et al.*, 2016).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Localización del experimento

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que se localiza en San Juan Acateno, en el municipio de Teziutlán, Puebla (Figura 1); con coordenadas geográficas en los paralelos  $19^{\circ} 47' 06''$  y  $19^{\circ} 58' 12''$  latitud norte y  $97^{\circ} 18' 54''$  y  $97^{\circ} 23' 18''$  de longitud occidental a una altitud de 1 617 m



Figura 1. Localización del experimento. Fuente: Google Earth (2013)

### 5.2 Material vegetal utilizado

El material vegetal utilizado fueron esquejes de vainilla de la especie *V. planifolia* que se conservan en el Banco de germoplasma de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que

está ubicado en el municipio de Tenampulco Puebla. Cada esqueje contenía alrededor de 10 yemas viables.

### 5.3 Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo MS (Mirashi y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, agar 9.5 g L<sup>-1</sup> y mio-inositol 10 mL L<sup>-1</sup>.

La preparación del medio consistió en disolver el medio MS en 100 mL de agua, agitarlos y agregarlos en un matraz Erlenmeyer con capacidad de un litro, después la sacarosa se disolvió en 100 mL de agua y de igual forma se agregó al matraz, se agregaron los 10 mL de mio-inositol y se aflojó el matraz, posteriormente con la ayuda de un potenciómetro, se ajustó el pH a 5.7 ± 1 con NaOH 0.1 N se agregaron los 9.5 g de agar y se llevó al microondas durante 9 minutos a punto de ebullición. Posteriormente, se adicionaron 15 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo estériles con capacidad de 25 x 150 mm, los tubos fueron sellados con tapas plásticas, para posteriormente esterilizarlos en una autoclave tipo vertical de la marca Man-olve<sup>MR</sup>, a una presión de 1.5 kg cm<sup>2</sup> y una temperatura de 120 °C, durante un tiempo de 15 minutos.

### 5.4 Obtención de los explantes

Se utilizaron como explantes secciones de tallo de *V. planifolia* que contenían al menos una yema, dichos trozos de tallo se cortaron con ayuda de navajas afiladas realizando un corte de 1 cm arriba de la yema y 1 cm debajo de la yema.

### 5.5 Desinfección

Los explantes, se colocaron en frascos y fueron sometidos a cuatro lavados continuos con agua corriente, con jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5 % marca Clarasol® agitándolo durante un lapso de 10 min, y posteriormente se enjuagaron con agua del grifo para eliminar restos del jabón.

Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en 2 g L<sup>-1</sup> fungicida (Bencimidazol) y 2 g L<sup>-1</sup> de bactericida (sulfato de estreptomina, oxitetraciclina). Seguido a esto, se realizaron cuatro enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech® modelo LCB-1202H donde los explantes fueron tratados por 15 minutos en constante agitación en una solución de hipoclorito de sodio al 30 % + tween80.

Posteriormente, se dieron otros cuatro enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 2 minutos en alcohol al 70 % y con la finalidad de remover excesos se dieron cuatro enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.

### **5.6 Primera siembra de explantes**

La siembra de explantes se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, cuyas paredes fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70 % y flameada, así mismo el material utilizado como pinzas, bisturís y tapas de cajas Petri, fue flameado con alcohol al 90 % con la finalidad de evitar contaminaciones externas en el medio de cultivo.

Con el apoyo de un bisturí con hoja número 20 y un bisturí con hoja número 15, se cortaron los extremos sobrantes de cada yema, procurando eliminar gran parte del material vegetal innecesario y con pinzas bacteriológicas se sembraron los explantes de manera que el material vegetal quedara completamente horizontal, se sellaron las tapas con papel parafilm de un ancho de 3 cm cada tubo fue etiquetado con la fecha de siembra, los tubos fueron puestos en una cámara de incubación a  $28 \pm 2$  °C con lámparas de luz fluorescente y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

### **5.7 Segunda siembra**

En la primera siembra se tuvo una contaminación del 95 % por lo cual se requirió de una segunda siembra, utilizando yemas axilares de vainilla y usando el mismo tipo de medio MS descrito anteriormente.

La siembra se realizó siguiendo el procedimiento anterior, solo, se modificó la concentración y tiempo de exposición al cloro, al 10 % y tres minutos en comparación con la primera siembra.

### **5.8 Tercera siembra**

Como en la segunda siembra hubo un 80% de oxidación y contaminación se realizó una tercera siembra. Se obtuvieron esquejes de *Vanilla planifolia* G Jackson con yemas maduras viables. Utilizando el medio de cultivo MS descrito anteriormente.

En esta siembra en comparación con las demás, fue usado, bicloruro de mercurio al 0.025 % y tanto el tiempo de exposición, como la concentración de cloro fueron reducidos al 0.25 % por 10 segundos, así mismo, la concentración del alcohol fue reducida al 50 % con una exposición de 5 segundos.

### 5.9. Adquisición de explantes

Como en la tercera siembra hubo un 20 % de contaminación se complementó los tratamientos con vainilla que se adquirieron de la empresa LAJOYA DEL TOTONACAPAN considerando que fueran la misma variedad, mismo tamaño y edad.

### 5.10. Desarrollo de plántulas en cámara de incubación

Las plántulas se desarrollaron en la cámara de incubación en un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura promedio de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 6 meses.

### 5.11. Obtención y preparación de hongos *Trichoderma*

Los hongos que se inocularon en las plántulas correspondieron a *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei* los cuales se obtuvieron del Laboratorio de Biología Molecular que se encuentra dentro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La preparación consistió en la descongelación para tenerlos a temperatura ambiente, paralelamente se realizó la preparación del medio de cultivo Agar Dextrosa y papa (PDA). Primero se colocaron 67 g de PDA en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1 litro y se aforó al 100% de su capacidad. El matraz fue colocado en un agitador magnético con placa de agitación y parrilla integrada, durante 15 minutos con el objetivo de disolver el PDA. Después se agregaron 25 ml en cajas Petri previamente esterilizadas y se llevó a esterilizar durante 15 minutos en una autoclave tipo vertical de la marca Man-olve<sup>MR</sup>, a una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 120 °C después se llevaron a la cámara de incubación que se encuentra a una temperatura de 30 °C por cinco días para después determinar la concentración de  $1 \times 10^4$  esporas mL<sup>-1</sup> en cada tratamiento en una cámara de Neubauer. Después se utilizaron 20 ml de la concentración de esporas de los tres tratamientos (*Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei*) y 80 ml de agua destilada y fueron colocados en vasos de precipitado de 250 mL de capacidad.

### 5.12. Inoculación de explantes

La inoculación consistió en sacar las plántulas *in vitro* de los frascos y se lavaron las raíces con agua destilada con la finalidad de eliminar los restos de medio de cultivo. Dichos explantes tuvieron una longitud aproximada de 15 a 20 cm. Las raíces de vitropiantas se sumergieron en el medio que contenían los hongos micorrizicos durante 1 minuto.

### **5.13. Sustrato utilizado para aclimatación**

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de bocashi 50 % tierra de monte 25 % y perlita 25 %. Primero se mezclaron bien los distintos componentes del sustrato y se colocaron en bolsas de papel, estas se cubrieron con bolsas plásticas para después ser esterilizado en una autoclave tipo vertical de la marca Man-olve<sup>MR</sup>, a una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 120 °C durante 30 minutos. Después de su esterilización y una vez que estuvo frío dicho sustrato se puso en bolsas de plástico negro de 10 x 20 cm.

### **5.14. Trasplante de las vitroplantas al sustrato**

Las vitroplantas inoculadas fueron sembradas en las bolsas que contenían el sustrato esterilizado a una profundidad de 3 cm sujetadas a un tutor de madera de 30 cm de largo y 0.5 cm de diámetro.

### **5.15. Aclimatación**

La aclimatación consistió en poner las vitroplantas en macetas y estas en una estructura simulando las condiciones de un invernadero. Las vitroplantas fueron colocadas en una estructura elevada construida de metal de 2.5 m de largo y 1 m de ancho, dicha estructura fue cubierta por malla sombra al 80%. Asimismo se le instaló un sistema de riego por nebulización. En el mes de junio de 2023 se realizaron siete riegos con los horarios de 7 am - 10 am, 1 pm - 4 pm, 7 pm con una duración de 2 minutos por riego. Para el mes de julio de 2023 se realizaron cuatro riegos con los horarios de 7 am - 11 am, 3 pm y 7 pm con duración de 2 minutos por riego.

### **5.16. Crecimiento del hongo a partir de la raíz**

Con la finalidad de conocer la presencia de hongos en las raíces, se realizó un medio de cultivo PDA descrito anteriormente. Se obtuvo un trozo de raíz de las plantas de vainilla con edad aproximada de 8 meses, con dimensiones de 0.5 cm y se pusieron en el medio de cultivo, con la finalidad de que los hongos endófitos crecieran en dicho medio.

### **5.17. Observación del crecimiento de los hongos en medio de cultivo**

Después de 5 días, al observar la presencia del crecimiento de los micelios de los hongos se realizó un conteo y estimación del porcentaje del endofitismo, infiriendo que aquellas cajas Petri que presentaban micelio desarrollado fueron los hongos que se encontraban dentro de las raíces de las plantas de vainilla. La estimación se realizó de manera visual considerando la coloración y forma desarrollada de los micelios que son típicos en cada especie de hongo.

### 5.18. Observación de endofitismo de los hongos en la raíz

Se tomaron unas secciones de raíz de las plantas en las que si se observó un crecimiento del hongo. Se lavaron con agua del grifo, se secaron con sanitas y después se cortaron 0.5 cm de raíz para poder ser observada al microscopio, se utilizó azul de lactofenol y naranja de metilo para teñir y detectar cada parte de la raíz y confirmar el endofitismo que se tuvo dentro de la raíz.

### 5.19. Obtención del peso fresco y porcentaje de materia seca

Se seleccionaron nueve plantas por cada tratamiento, después se llevaron al laboratorio para lavar las raíces con agua del grifo de cada planta, se secaron con sanitas y se hizo un corte para separar la raíz de la parte aérea. Una vez cortadas las secciones con ayuda de una balanza digital se pesaron cada una de las secciones y posteriormente se fueron colocando dentro de una bolsa de papel, para después llevarlas a una estufa de secado a  $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$  durante tres días.

Posteriormente al secarse las plantas, se retiraron las plantas de las bolsas de papel y con la ayuda de una balanza digital se registró el peso seco.

El porcentaje de materia seca se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Can ( Kg) materia seca (MS)}}{\text{Can ( Kg) materia verde (MV)}} \times 100 = \% \text{ MS}$$

### 5.20. Variables a evaluar

- Número de hojas (NH). Se contabilizó el número de hojas totalmente desarrolladas.
- Diámetro de tallo (DT). Con ayuda de un vernier electrónico se midió el diámetro del tallo en la parte media.
- Longitud de la planta (LP). Con ayuda de una regla graduada en cm se midió la longitud de la planta desde la base del tallo hasta la última hoja.
- Número de raíz primaria (NRP). Se contabilizó el número de raíces primarias desarrolladas en el sistema radicular.
- Diámetro de raíz (DR). Con ayuda de un vernier electrónico se midió el diámetro de la raíz principal en la parte media.

- Longitud de raíz (LR). Con ayuda de una regla graduada en cm se midió la longitud de la raíz desde el comienzo del tallo hasta el término del sistema radicular.

### **5.21. Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos los cuales consistieron en el tipo de hongo utilizado, siendo T1: *Trichoderma longibrachiatum*, T2: *Trichoderma harzianum*, T3: *Trichoderma reesei* y T4: Testigo, con cinco repeticiones y cada unidad experimental consistió en 4 plantas.

### **5.22. Análisis estadístico**

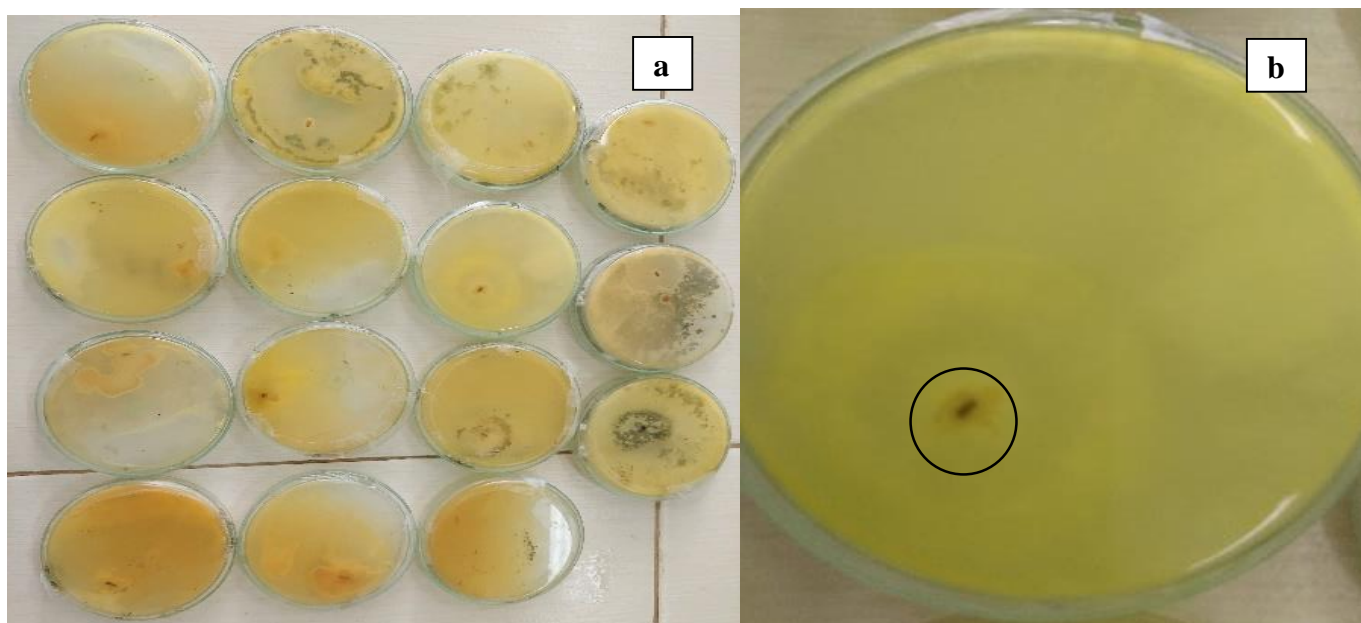
Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y prueba de medias de Tuckey ( $P \leq .05$ ), con el paquete estadístico SAS versión 9.0

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Endofitismo

#### 6.1.1. *Trichoderma longibrachiatum*

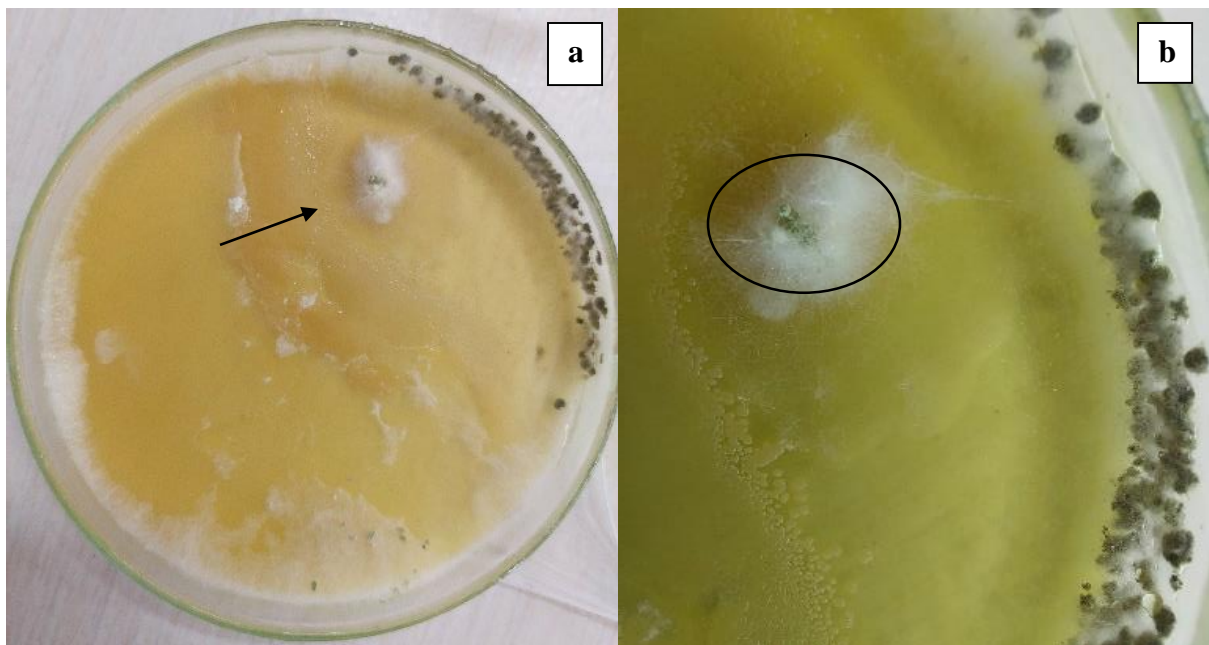
Se observó el 85 % de plantas inoculadas para el tratamiento 1 (*T. longibrachiatum*) (Figura 2a). También se observó una colonización del hongo que nace a partir de la muestra de raíz y que fue creciendo de forma radial hasta ocupar la superficie total de la caja Petri (Figura 2b).



**Figura 2 a: Infestación de *Trichoderma longibrachiatum* en medio de cultivo; b: Crecimiento de micelio a partir de raíz**

Así mismo se observó una coloración amarillada, dicho color es debido a los metabolitos liberados por parte de esta especie de *Trichoderma* (Figura 3a). Se observó una coloración blanca con apariencia algodonosa y una esporulación gris oscuro en los márgenes de la coloración blanca (Figura 3b). El color y la forma del desarrollo de los micelios son típicos de *Trichoderma longibrachiatum*. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Gupta *et al.* (2014) quienes mencionan que algunas cepas de *Trichoderma longibrachiatum* a veces pueden tener una coloración verde oscuro. En este sentido Osorio-Concepción *et al.* (2013) describen que *Trichoderma longibrachiatum* presenta micelio de apariencia esponjosa y abundante, de una pigmentación amarilla, para el caso de los conidiales presenta una coloración que va desde verde claro a verde oscuro.

Las características de *Trichoderma longibrachiatum* fueron similares a las descritas por Barnett y Hunter (1972) donde la forma y pigmentación del micelio corresponde a la especie *Trichoderma longibrachiatum*



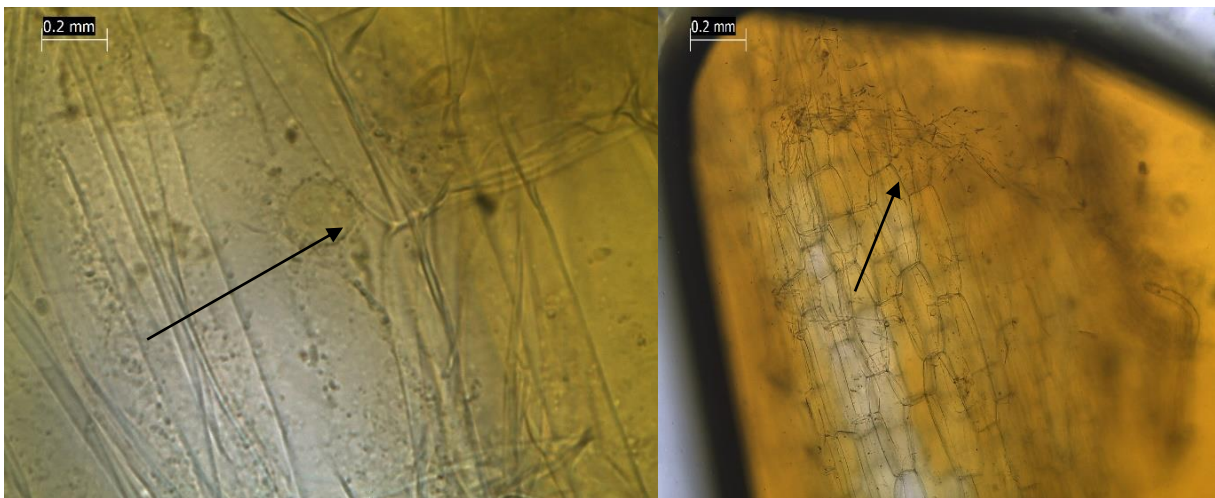
**Figura 3 a:** Crecimiento de micelio en *Trichoderma longibrachiatum*, **b:** Coloración blanquecina de *Trichoderma longibrachiatum*

Al observar al microscopio biológico compuesto se puede notar que las conidias fueron de forma ligeramente ovaladas, las clamidosporas, abundantes y globosas, los conidióforos fueron ramificados (Figura 4), dichas características coinciden con lo reportado por Samuels *et al.* (2010).

Hernández (2023) reporta que utilizando las mismas tres especies de *Trichoderma* en el cultivo de higo no presentó endofitismo, debido a que los hongos no lograron penetrar las capas de la pared celular, en este sentido se sabe que las orquídeas tienen una gran relación con los hongos micorrízicos (Shan *et al.*, 2002; Ortega-Larrocea, 2008). por lo cual fue posible la invasión de estas especies de *Trichoderma* en las raíces de vainilla (Figura 5).



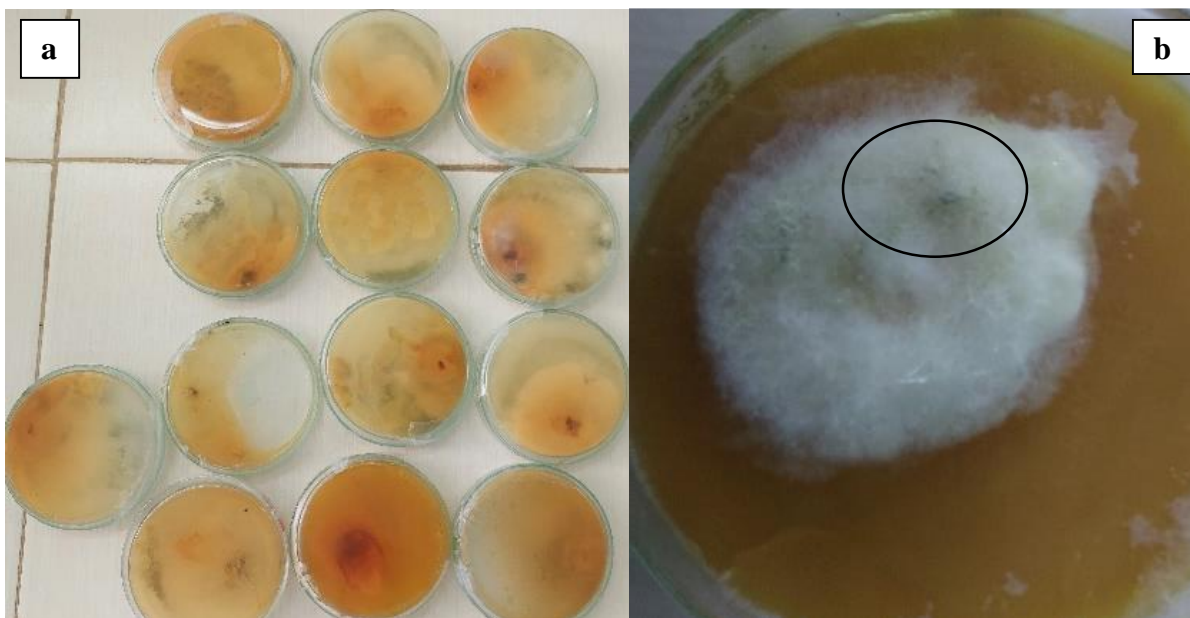
**Figura 4** *Trichoderma longibrachiatum* visto al microscopio a 100 x



**Figura 5** Invasión de *Trichoderma longibrachiatum* en raíces de vitroplantas de vainilla visto al microscopio a 40 X

### 6.1.2 *Trichoderma harzianum*

En relación al tratamiento dos, correspondiente a *Trichoderma harzianum* se obtuvo el 65 % de endofitismo (Figura 6a). Se observó en el fondo de la caja Petri una coloración amarilla oscura (Figura 6b), que corresponde al metabolito que libera esta especie al ir colonizando el medio de cultivo.



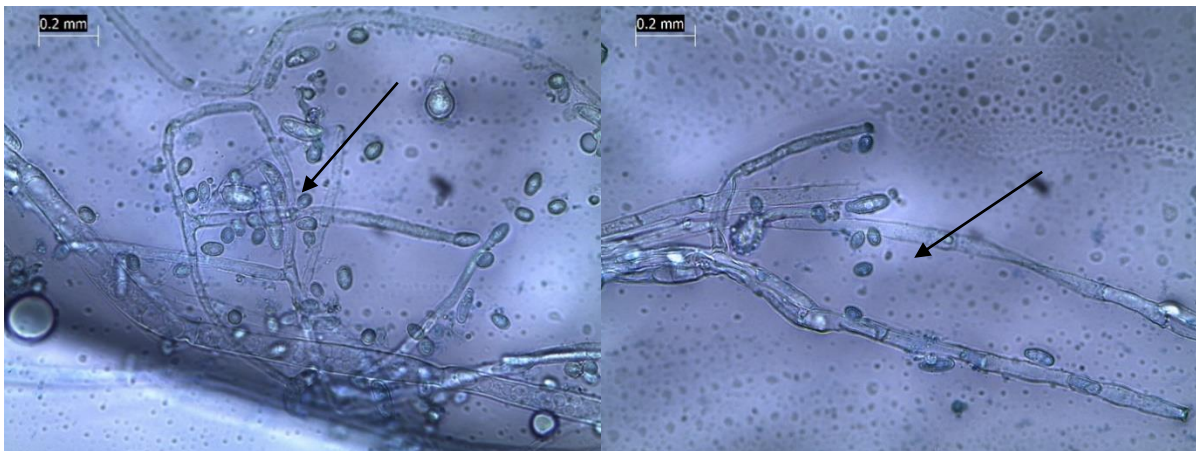
**Figura 6. a: Porcentaje de endofitismo de *Trichoderma harzianum* en medio de cultivo; b: Crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* en raíces de vainilla**

Por otro lado, también se observó una coloración blanquecina con apariencia algodonosa abultada (Figura 7b) y una esporulación color verde musgo (Figura 7a). En este sentido Rifay (1969) menciona que en las primeras etapas de crecimiento de *Trichoderma harzianum* se puede observar un micelio color blanco, conforme va comenzando la esporulación el color va cambiando a verde oscuro, estas características son similares a los resultados que se pudieron observar en este trabajo. Así mismo se compararon las características anteriormente mencionadas con las descripciones realizadas por Gams y Hissett (1998); Samuels *et al* (1996).

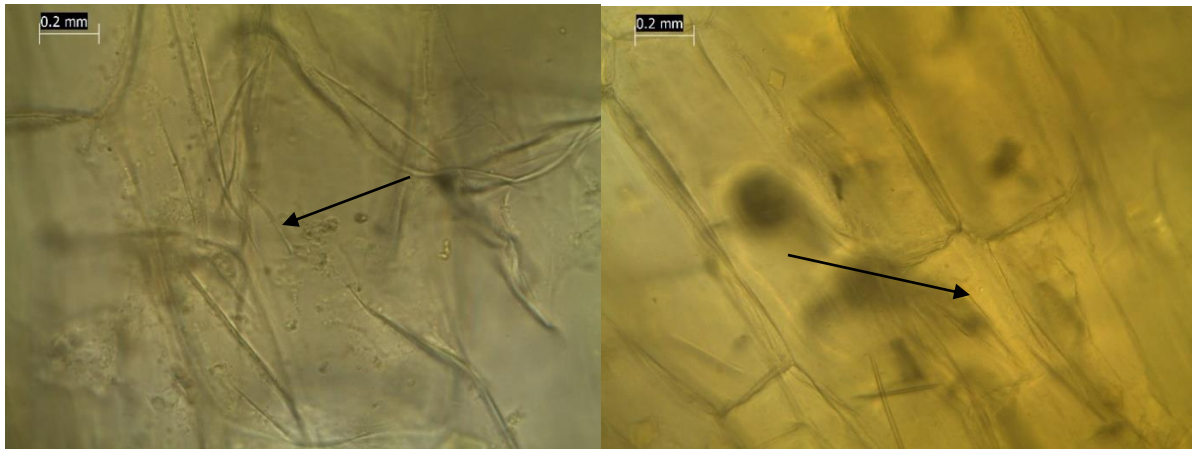


**Figura 7. a** Coloración verdosa de *Trichoderma harzianum* **b** Apariencia algodonosa de *Trichoderma harzianum*

Visto al microscopio la especie *harzianum* presenta conidios de ramificación piramidal (Figura 8) se puede observar que las ramas que están más cerca del eje principal son mucho más largas que las de más, esta descripción coincide con lo reportado por Samuels *et al.* (1996) que indica que las ramas que se encuentran más cerca a la punta forman un ángulo de  $90^\circ$  con respecto al eje de donde nacen (Figura 9). En cuanto a las ramas que están más lejos a la punta forman un ángulo menor de  $90^\circ$  con respecto al eje donde surgen, menciona que las filiales presentan una forma de botella y es debido a que pueden ser más anchas en el centro y se van adelgazando conforme se van alejando, reflejando así la forma de botella.



**Figura 8** *Trichoderma harzianum* visto al microscopio a 100X



**Figura 9. Invasión de *Trichoderma harzianum* en raíces de vainilla visto al microscopio a 100X**

### 6.1.3 *Trichoderma reesei*

Se observó el 35 % de endofitismo en el tratamiento tres (*Trichoderma reesei*). Se observó que el crecimiento del hongo nace a partir de las raíces dejando una coloración café rojizo, siendo más claro en las partes cercanas a la raíz y más oscuro hacia las partes más alejadas a la raíz (Figura 10a), así mismo se observa que en el área circundante de la raíz, muestra el crecimiento de micelios de color blanco algodónoso y abultado (Figura 10b) y en la periferia de esta área se observó la esporulación de color verde alga (Figura 11). Estas descripciones coinciden con lo definido por Barnett y Hunter (1972) que menciona que las colonias presentan una coloración verde claro a oscuro con una textura polvosa y algodónosa, con conidios, conioforos, y micelio de color verde.

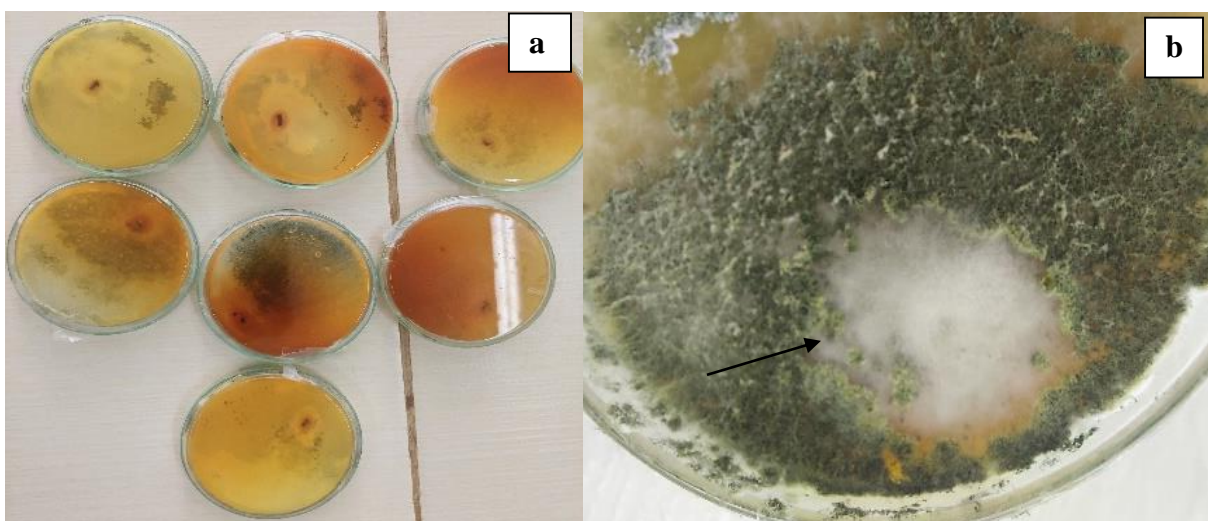


Figura 10. a: Endofitismo de *Trichoderma reesei*. b: Apariencia algodónosa de *Trichoderma reesei*

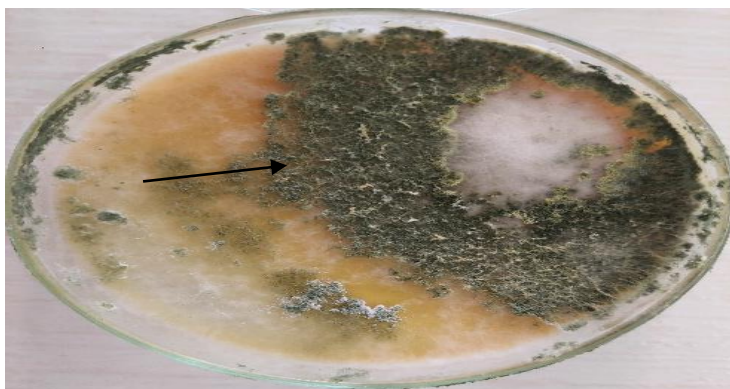
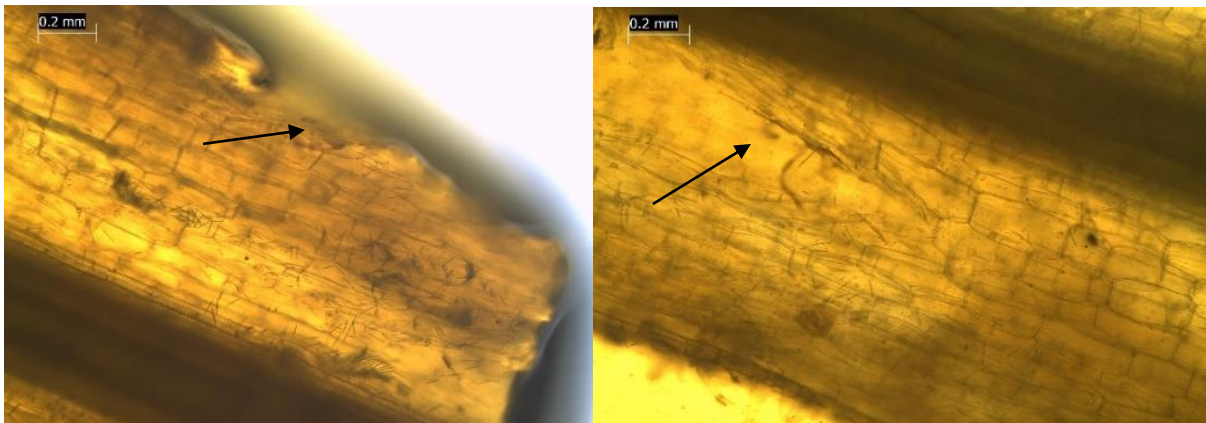


Figura 11. Coloración verdosa de *Trichoderma reesei*

A observarlo al microscopio (Figura 12) se puede ver que presenta micelio aéreo y su estructura es en ramificaciones piramidales. Las estructuras características en la forma de las esporas y filiales son correspondientes a *Trichoderma* presentando características y color de acuerdo a la especie *T. reesei* que coincide con lo reportado por Jaklitsch y Voglmayr (2015).



**Figura 12. *Trichoderma reesei* visto al microscopio a 100x**



**Figura 13. Invasión de *Trichoderma reesei* en raíces de vainilla visto al microscopio a 100 X**

## 6.2 Variables morfológicas de plantas *in vitro* inoculadas con tres tipos de hongos del género *Trichoderma*

### 6.2.1 Longitud de tallo de vitroplantas de vainilla

Los resultados con respecto a longitud de tallo de las vitroplantas inoculadas con tres tipos de hongos del género *Trichoderma* se muestran en la figura 14, donde las medias de T1 (*Trichoderma longibrachiatum*) presentó la mayor longitud de tallo con 14.55 cm, T3 (*Trichoderma reesei*) y T2 (*Trichoderma harzianum*) presentaron una longitud de tallo de 12.05 cm y 11.65 cm, respectivamente, estas diferencias entre T2 y T3 no fueron estadísticamente significativas. El testigo (T4) presentó la menor longitud de tallo con 10.63 cm, diferencia que fue estadísticamente significativa en comparación a los demás tratamientos. Con estos resultados se deduce que el hongo *Trichoderma longibrachiatum* tuvo mayor efecto en las plantas para tener un mayor desarrollo en la longitud del tallo. Verma *et al.* (2007) detallaron que *Trichoderma* spp. produce enzimas hidrolíticas que aumentan el movimiento de materia orgánica presente en el sustrato y de esta forma se mejora la absorción de compuestos que son más simples por la planta y posteriormente estas influyen en su estado nutricional. Asimismo, tienen la capacidad de solubilizar los fosfatos y otros nutrientes. De esta manera se mejora el desarrollo de la planta (Youssef *et al.*, 2016).

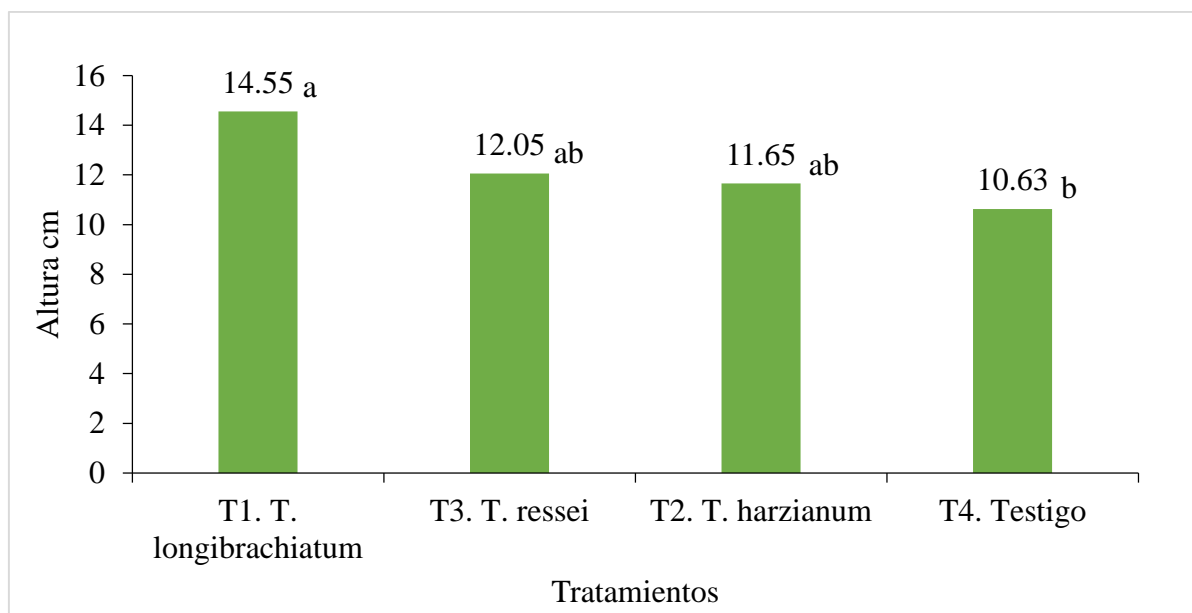
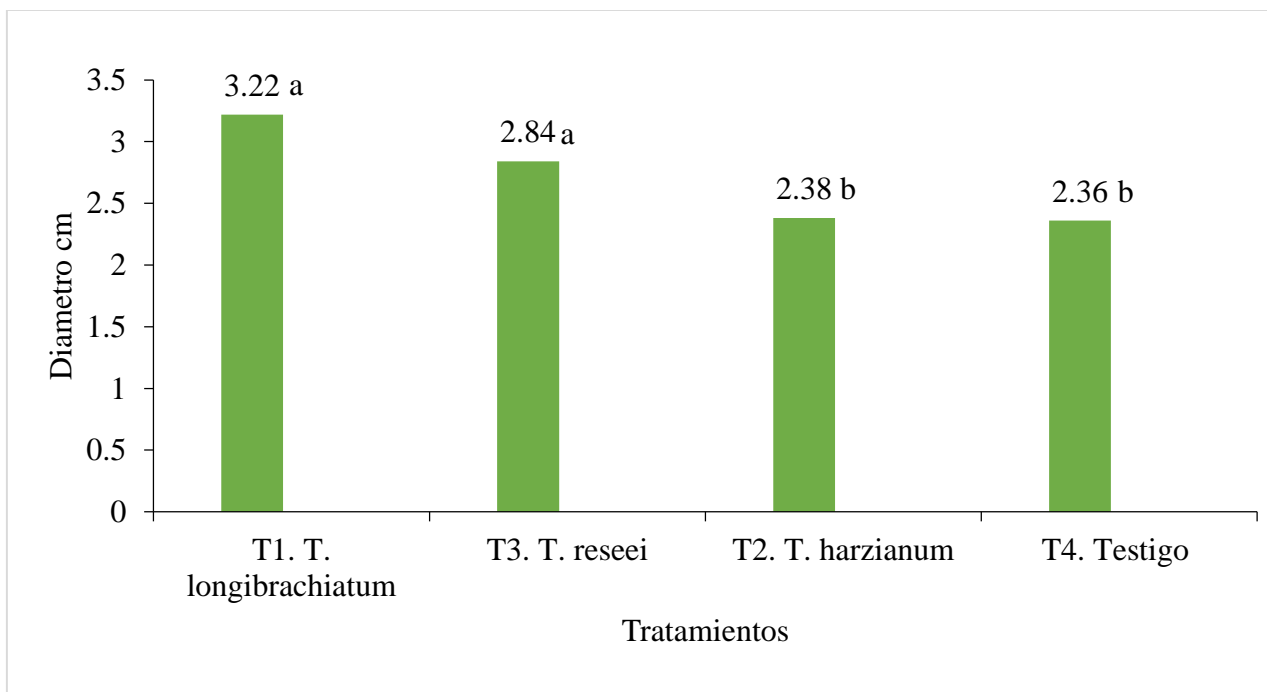


Figura 14 Longitud de tallo de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )

### 6.2.2 Diámetro de tallo de vitroplantas de vainilla

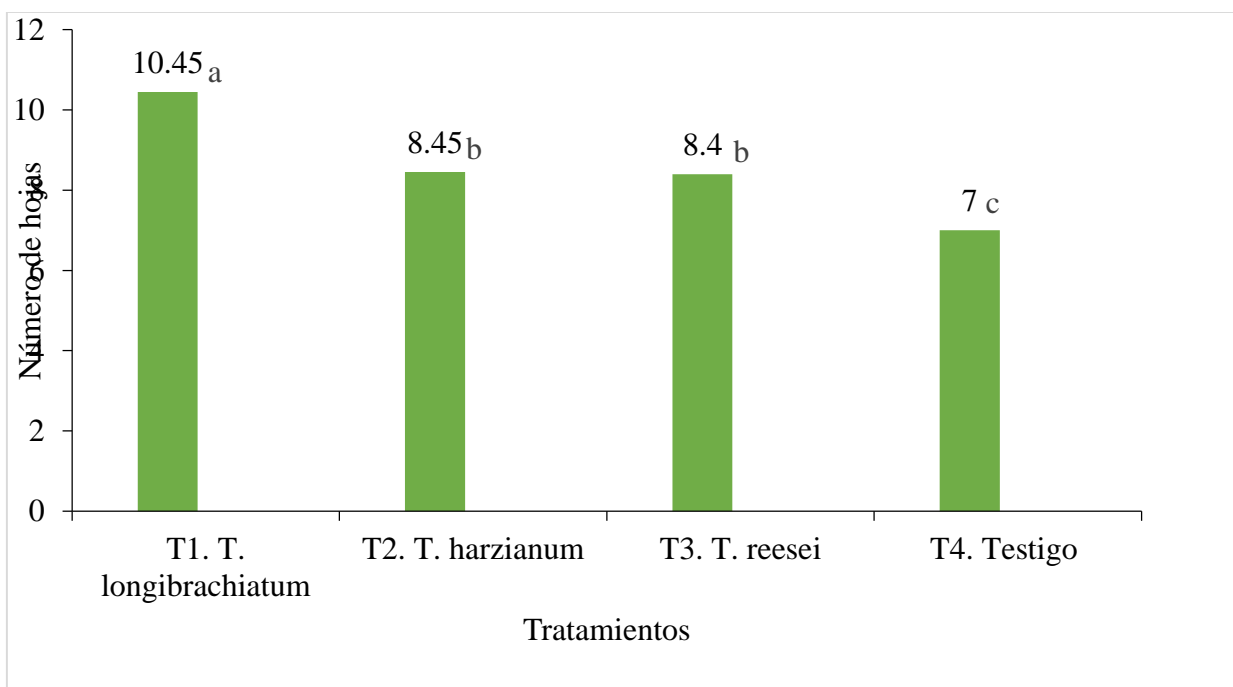
Los resultados para el diámetro de tallo (Figura 15) indican que el tratamiento 1 (*Trichoderma longibrachiatum*) presentó un diámetro de 3.22 cm y el tratamiento 3 (*Trichoderma reesei*) con 2.84 cm, estos tratamientos sus medias no fueron estadísticamente diferentes. Así mismo los tratamientos 2 (*Trichoderma harzianum*) y 4 (Testigo) con 2.38 y 2.36 cm respectivamente, también resultaron ser estadísticamente iguales. Se encontraron diferencias estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos T1, T3 con T2 y T4. Con estos resultados se infiere que los hongos *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma reesei* tuvieron un efecto positivo en el desarrollo del diámetro de tallo en las vitroplantas. Bailey y Lundén (1998) mencionan que uno de los mecanismos antagonistas que presenta el género *Trichoderma* spp. consiste en la estimulación en el crecimiento vegetal. Algunos aislados de este controlador biológico producen más de 70 metabolitos, algunas de ellas son sustancias que estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta (Singh *et al.*, 2016).



**Figura 15. Diámetro de tallo de vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )**

### 6.2.3 Número de hojas en vitroplantas de vainilla

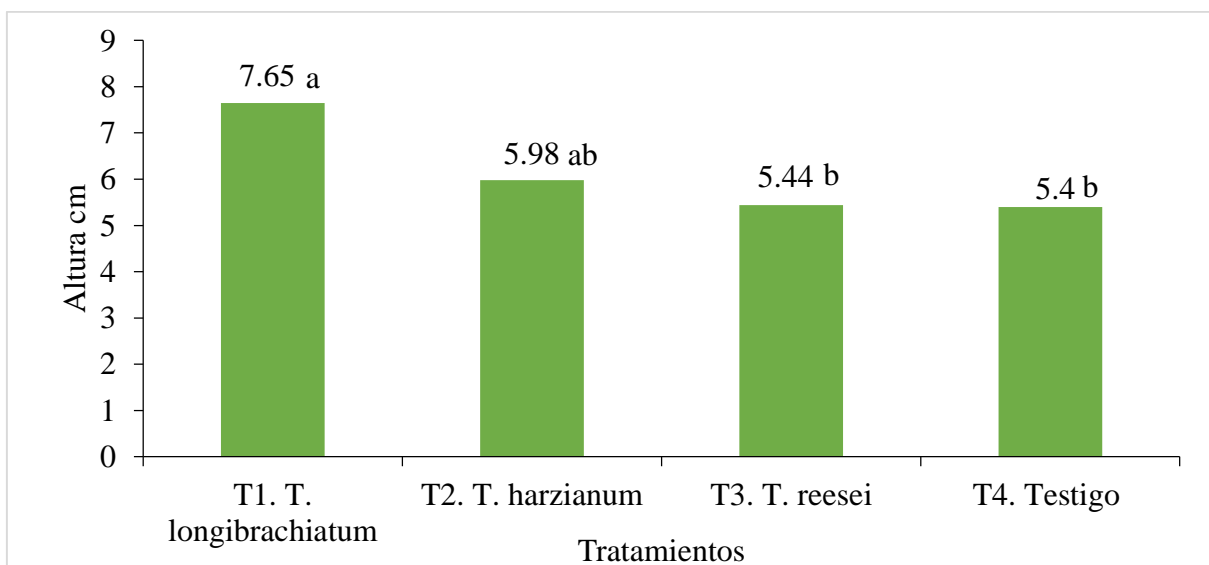
Para la variable número de hojas los resultados que se presentan en la Figura 16, se observa que el tratamiento 1 (*Trichoderma longibrachiatum*) tuvo el mayor número de hojas con un promedio de 10.45, el tratamiento 2 (*Trichoderma harzianum*) y el tratamiento 3 (*Trichoderma reesei*), presentaron un promedio de 8.45 y 8.4 hojas, respectivamente, mientras que T4, presentó el menor número de hojas, estas diferencias encontradas entre los tratamientos resultaron ser estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). Debido a estos resultados, se relaciona que el uso de *Trichoderma* puede mejorar los efectos en el crecimiento de la planta. Cubillos-Hojosa (2009) ha señalado que *Trichoderma* sp. puede solubilizar fosfatos, micronutrientes y minerales los cuales tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por otro lado, García *et al.* (2017) indica que una característica que tiene *Trichoderma* spp. es su potencial de crecimiento, los cuales son capaces de producir fitohormonas que la planta utiliza para su desarrollo.



**Figura 16.** Número de hojas en vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )

### 6.2.4 Longitud de raíz en vitroplantas de vainilla

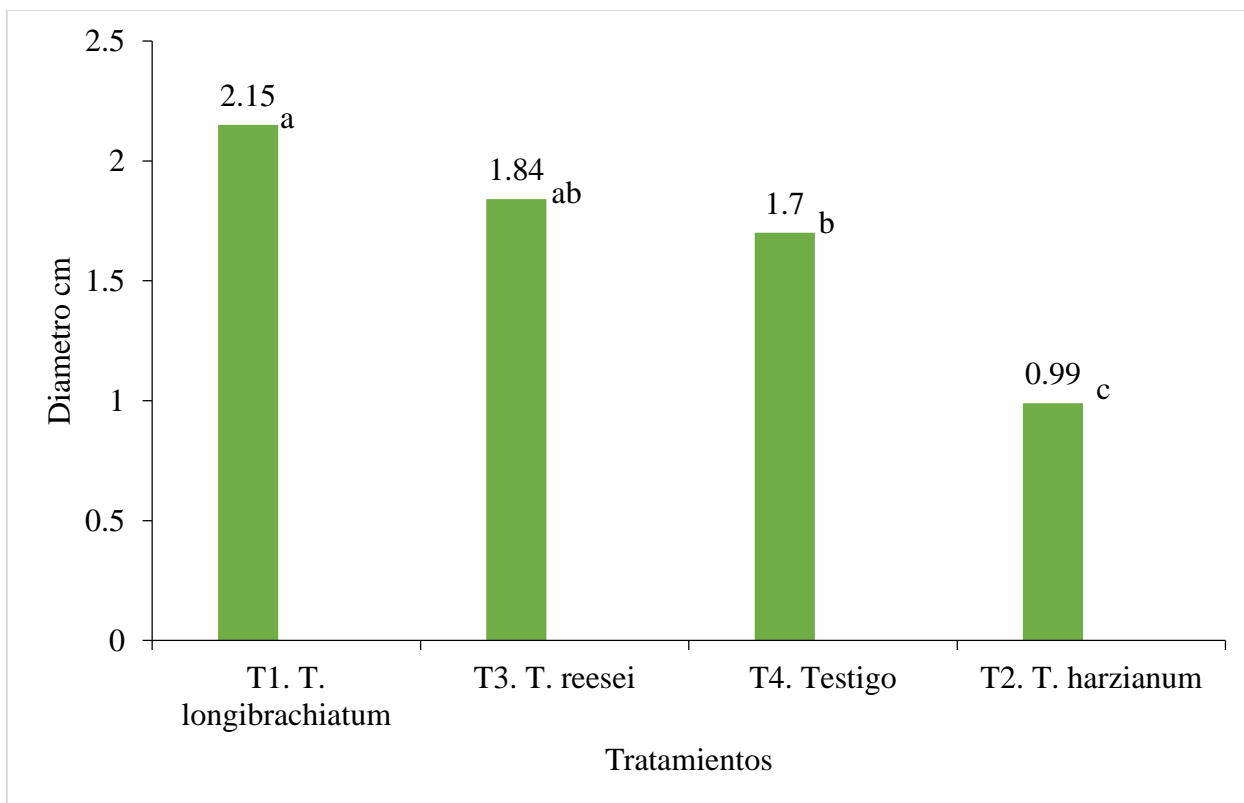
Los resultados de longitud de raíz se presentan en la figura 17 donde el tratamiento 1 (*Trichoderma longibrachiatum*) presentó una longitud de 7.65 cm, el tratamiento 2 (*Trichoderma harzianum*) 5.98 cm y seguido del tratamiento 3 (*Trichoderma reesei*) y tratamiento 4 (Testigo) con 5.44 y 5.40 cm respectivamente. Estos dos últimos sus resultados fueron muy similares. Sin embargo, el tratamiento 1 y tratamiento 2 sus medias resultaron ser diferentes estadísticamente significativas en comparación a tratamiento 3 y tratamiento 4. Con estos resultados se infiere que el hongo *Trichoderma longibrachiatum* pudo haber tenido un efecto positivo para obtener mayor longitud de raíz. Malusa *et al.* (2007) examinaron el efecto que se produce en el crecimiento y los cambios morfológicos en las raíces en cultivos de fresa tratados con el hongo *Trichoderma spp.* obteniendo diferencias visibles en el crecimiento de las raíces, que pueden depender de la modificación de los procesos de la rizósfera por el desarrollo de microorganismos y la respuesta genotípica del cultivo ante la inoculación. De la misma manera, Gryndler *et al.* (2002) descubrieron un efecto positivo en el desarrollo de las plantas de fresa inoculadas con *Trichoderma spp.* en este sentido, Hiran (2000), menciona que mientras la raíz posea un mayor desarrollo tendrá una mayor tolerancia al estrés biótico, de acuerdo a esto el enraizamiento mejorado podría producir un efecto positivo en la tolerancia a plagas que puedan afectar a la planta.



**Figura 17.** Longitud de raíz de vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )

### 6.2.5 Diámetro de raíz en vitroplantas de vainilla

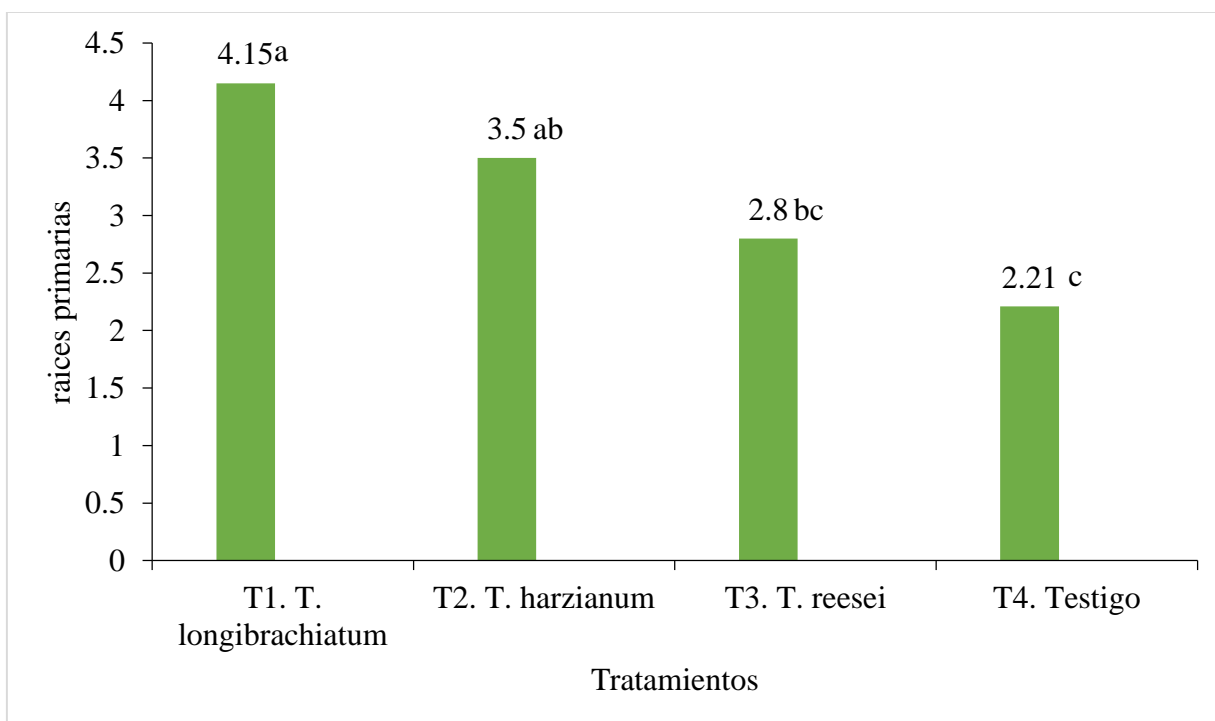
Los resultados de diámetro de raíz (Figura 18) muestran que el tratamiento 1 (*Trichoderma longibrachiatum*) tuvo 2.15 cm de diámetro, el tratamiento 3 (*Trichoderma reesei*) 1.84 cm seguido del tratamiento 4 (Testigo) con 1.70 y finalmente el tratamiento 2 (*Trichoderma harzianum*) con 0.99 cm de diámetro de raíz. Las diferencias encontradas entre los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). Al respecto, Chang *et al.* (1986) menciona que cuando se usa *Trichoderma* en los cultivos, ayuda al desarrollo de las plantas, debido a que colonizan las raíces desplazando a otras microfloras resultando una protección para enfermedades y disminución al estrés, permitiendo que las raíces sean más robustas y grandes. Así mismo, Pascale *et al.* (2017) mencionan que con el uso de *Trichoderma* se tienen diversos beneficios en las plantas, ya que la presencia de metabolitos secundarios y enzimas promueve el desarrollo y crecimiento en la planta, mejora el control sobre enfermedades y patógenos, también presenta mayor disponibilidad de nutrientes.



**Figura 18.** Diámetro de raíz de vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )

### 6.2.6 Número de raíces primarias en vitroplantas de vainilla

Para el caso de número de raíces primarias se puede observar los resultados en la figura 19, donde el tratamiento 1 (*Trichoderma longibrachiatum*) tuvo un promedio de 4.15 de raíces primarias el tratamiento 2 (*Trichoderma harzianum*) 3.5, el tratamiento 3 (*Trichoderma reesei*) 2.8 y el tratamiento 4 (Testigo) 2.21 de raíces primarias. El tratamiento 1 y 2 tuvieron diferencias estadísticas significativas con respecto del tratamiento 3 y 4. Para el caso del tratamiento 3 y 4 no hubo diferencias estadísticas significativas. Ezziyyani *et al.* (2003), infieren que *Trichoderma* posee la capacidad de crear un ambiente propicio para el desarrollo radical en plantas, lo que amplifica la tolerancia de las plantas al estrés. De igual forma Harman (2006) menciona que los *Trichodermas* están asociados a las raíces de varios cultivos lo cual ayuda a que su masa radical aumente y así se puede mejorar la absorción de nutrientes por la planta y también puede ayudar a liberar los mecanismos de defensa de la planta lo cual hace que se encuentre capacitada para la llegada de patógenos.



**Figura 19.** Número de raíces primarias en vitroplantas de vainilla, donde medias con la misma letra en cada barra son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )

### 6.3 Porcentaje de materia seca (MS)

El crecimiento de una planta puede medirse por diversas formas en donde se incluye la elongación de los tallos, número de ramas, número de nudos, área foliar, producción de materia seca (MS), entre otras. El peso de la materia seca es producto de los diferentes procesos llevados a cabo en la fotosíntesis que realizan las plantas, la cual es una de las herramientas utilizadas para estudiar las diferentes etapas de desarrollo en una planta. Así mismo, para conocer la plasticidad de un cultivar, la respuesta a los insumos, respuesta a cambios ambientales y también para diferenciar cultivos (Araújo *et al.*, 2009; White e Izquierdo, 1991).

Los pesos de la materia seca del presente trabajo se muestran en el cuadro 1, donde se observa que el tratamiento 1 (*Trichoderma longibrachiatum*) presentó el mayor porcentaje con 7.24 % seguido de tratamiento 3 (*Trichoderma reesei*), tratamiento 2 (*Trichoderma harzi anum*) y T4, con 5.85 % 5.83 % y 5.23 % respectivamente. Las diferencias encontradas entre los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). Este mismo comportamiento se observa para el porcentaje de materia seca en raíz y la parte aérea. También se observa que hubo mayor acumulación en la parte radical que en la parte aérea. Estos resultados, indican que el tratamiento 1, correspondiente a *Trichoderma longibrachiatum* fue el que ayudo a acumular mayor peso de la materia seca.

**Cuadro 1. Porcentaje de materia seca (MS) en plantas inoculadas con hongos del género *Trichoderma***

Tratamientos	% MS A	%MS R	% MS T
T1	6.82 a	8.00 a	7.24 a
T2	5.82 ab	5.86 ab	5.83 b
T3	5.81 ab	6.26 ab	5.85 ab
T4	5.12 b	5.69 b	5.23 b

% MS A = porcentaje de materia seca de la parte aérea, %MS R = porcentaje de materia seca de la raíz, % MS T = porcentaje de la materia seca total; Médias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).

## VII. CONCLUSIONES

Las vitroplantas de vainilla tienen la capacidad de permitir el endofitismo de *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei* en su sistema radicular.

*Trichoderma longibrachiatum* fue el hongo que presentó mayor endofitismo en el sistema radicular y el que presentó efectos positivos en el desarrollo de las vitroplantas de vainilla por presentar mayores valores de longitud de tallo, diámetro de tallo, número de hojas, longitud de raíz, diámetro de raíz, número de raíces primarias y peso de la materia seca.

La *Vanilla planifolia* G. Jackson por ser una de las especies pertenecientes a las orquídeas, tienen la capacidad de convivir con diferentes tipos de hongos que pueden ser benéficos para su desarrollo vegetativo y *Trichoderma longibrachiatum* puede ser una opción para ser incluido en la fabricación de sustratos para el cultivo comercial de vainilla.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Arújo J. R., M A P. Ramalho, A T. Bruzi and Â F B. Abreu. 2009. Dry matter accumulation in genotypes of bean submitted to different levels of nitrogen. *Gênica e Agroneologia* 33: 985-992.
- Bailey B A y Lumsden R D 1998. Directed effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In *Trichoderma and Gliocladium* Harman GE, Kubicek CP (eds). Taylor and Francis Inc, London. pp. 185-204.
- Baldía M M, Sanchez C D, Rosales P. K, y Lugo M D 2017. Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Protección Vegetal*. Vol. 32 no. 2. En línea: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522017000200005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000200005). Consultado: el 03 de septiembre 2023.
- Barnett H and Hunter B 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*, EE UU Burgess Publ. Co., 241p.
- Barrales-Cureño H J., Herrera-Cabrera B E 2023. La vainilla: una esencia muy Mexicana. *Revista de divulgación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Saber más*. En línea: <https://www.saber.mas.unich.mx/archivo/articulos/599-numero-67/1194-la-vainilla-una-esencia-muy-mexicana.html>. Consultado el 03 de septiembre 2023.
- Castañón O F, Cuellas Z J. F, Montes de G M E y Gámez P. M R 2017. Germinación *in vitro* de semillas planifolia Jacks y comparación de métodos de micropropagación. *Avances en Innovación Agropecuaria*. 21(2): 69-83.
- Castillo A 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INA Uruguay*.
- Chang Y C, Chang Y-C y Baker R 1986. Increases Growth of Plants in the Presence of the Biological Control Agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70(2): 148.
- Christianson M y Wernik D 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Developmental Biology* 95:288-293.

- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E & Larsen J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), few036.
- Cubillos-Hnojosa J., Mejía L, y Valero N 2009. *Trichoderma Harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *Havicarpa* Degener). *Agron. Colomb* 27: 81-86.
- De Aguiar R A, MG da Cunha and ML Junior. 2014. Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control* 74: 1-5.
- Ezziyani M, Perez-Sánchez C, Sidahmed A, Requena M E, Candela M E 2004. *Trichoderma harzianum* como fungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Fernandez A S, Salas Z A y Vázquez B N 2014. La productividad de la vainilla (*vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 9(47): 50-69.
- Gams W y J. Hissett. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma* and *Glomerium* London: Taylor and Francis.
- García H, Martínez A, Hermosa M, Monte E, Aguiar C y González C 2017. Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana fitopatología* 35(1): 58-79.
- Gupta V G, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay R S, Druzhinina I., Tuohy M editors. 2014. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier. Amsterdam 650 p.
- Gryndler M, Vosatka M, Helova H, Catska V, Chvatalova I., Jansa J. 2002. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria on growth and mineral nutrition of strawberry. *J. Hort. Nutr.* 25: 1342-1358.
- Harman G E 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma Harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4): 377-393.

- Harman G E 2006. Overview of mechanisms and uses of *trichoderma* spp. Phytopath 96: 190-194.
- Hardoi m P, R Van O L S, Berg G Hrttila A M Compant S Campisano A Doring M & Sessitsch A 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiology and Molecular Biology 79 (3):293-320.
- Hermosa R, Uterbo A, Chet I, Monte E 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158(1): 17–25.
- Hernández–Hernández J. 2011 Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento (Programa Estratégico para el desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur-Sureste: Trópico Húmedo). Tlapacoyan, Veracruz: SAGARPA-INIFAP. pp. 1-27.
- Hernandez L M 2023. Multiplicación *in vitro* de higo e inoculación con *Trichoderma* spp. tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Puebla. Tezuitlán, Puebla. 38 p
- Hernández- Melchor, D J., Ferrera-Cerrato, R, y Alarcón, A 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean journal of agricultural & animal sciences, 35(1), 98-112.
- Herrera-Cabrera, B (2018). Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. AgroProductividad, 9(1): 10-17.
- Hussain A, Qarshi I. A, Nazir H, & Ulah I. 2015. Plant tissue culture: current status and opportunities. En A Leva, & L M Rinaldi, Recent Advances in Plant *in vitro* Culture En línea: <http://dx.doi.org/10.5772/50568>. consultado el 03 de septiembre de 2023.
- Infante D, Martínez B, González Nand Reyes Y 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal 24(1): 14-21.
- Insuasty E, Acosta R, Salazar G, Betancourth G 2014. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum* Ciencia y Tecnología Agropecuaria 15: 237-249.

- Jaklitsch W M and Volgmayr H 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Micronesia. *Studies in Mycology*. 80: 1-87.
- Malusa E Sas-Paszt, L, Popinska W Zurawicz E. 2007. The effect of a substrate containing Arbuscular Mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms (*Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces*) and foliar fertilization on growth response and rhizosphere pH of three strawberry cultivars. *Internat J. Fruit Sci.* 6(4): 25-41.
- Marcello C M, A S Seindorff, S P Silva, R N Silva, L A M Bataus, and C J. Uhoa. 2010. Expression analysis of the exo-p-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165: 75-81.
- Martinez B, I. Danay, Y Duarte, M Moreno. 2013. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Dymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Rev. Protección Veg.* 28: 192-198.
- Mirashiige T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tocacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Navaneetha T, Prasad R D and Venkateswara R L. 2015. Liquid formulation of *Trichoderma* Species for management of Gray mold in Castor (*Ricinus communis* L) and Alternariaster Leaf Blight in Sunflower (*Helianthus annuus* L) *J Biofertil Biopesticides* 6: 149.
- NOM 059 SEMARNAT 2010. Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* 30 diciembre, 2010.
- Ochoa-Villarreal M, Hwat S, Jang MO, Kim I.S, Jin Y W, Lee E K 2015. Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology* 32(6), 581-587.
- Qims S, Luciani G y Caldeano E 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. INTA Argentina. pp. 351-376.

- Osorio- Concepción M, Casas F S, Cortés P. C 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la condición de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegos a la luz. *Revista Mexicana de Micología* 37: 41-40.
- Ortega-Larrocea P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. In: *Técnicas de Estudio de las asociaciones micorrízicas y sus aplicaciones en la restauración*. J. Álvarez-Sánchez y A. Monroy A. UNAM Facultad de Ciencias. pp. 85-96
- Pacheco K R, Viscardi B S M, de Vasconcelos T M M, Moreira G A M, do Vale H M M & Bum L E B 2016. Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. *Bioscience Journal* 32(2): 412–421.
- Palacios L A, Bozada R L, Pacheco C I, Torres B B, y Vdríales Ch. G 2021. La vainilla de México. *H Jarocho cuántico al son de la ciencia*. Número 16 pp. 1-8
- Pascali A, Vnale F, Manganiello G, Ngro M, Lanzuise S, Ruocco M, Marra R, Lombardi N, Woo S L, y Lorito M 2017. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. En línea: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.010>, Consultado el 10 de octubre 2023.
- Perea M 2010. *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*. 1ª Impresión. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá pp. 7-8.
- Quesada K J., Quesada M K, y Moreira G I. 2015. Aislamiento de una bacteria endofita de vainilla (*Vanilla planifolia*) con actividad biocontroladora *in vitro* contra *Fusarium Oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Tecnología en maecha* 28(2): 116-125.
- Rifai M A 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers* 116: 1-56.
- Ríos V C, Caro C J. M, Berlanga R D I, Ruiz C M F, Gnelas P. J. J., Salas M M A, Villalobos P. E and Guerrero PVM 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3(12): 84–99.

- Rodríguez-López T y Martínez-Castillo J. 2019. Exploración actual sobre el conocimiento y uso de la vainilla (*vanilla planifolia* Andrews) en las Tierras Bajas Mayas del Norte, Yucatán, México. *Poli botánica* 48: 169-184.
- Romero-Cortes T, P. A López-Pérez M Ramírez-Lepe y J. A Cuervo-Parra 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Gencia* 31(3): 32-45.
- Rosenblueth M, & Martínez-Romero, E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interaction: MP M*, 19(8), 827–837.
- Ruiz-Espinosa, H (2018). Caracterización fisicoquímica y sensorial de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews con diferentes esquemas de beneficiado. *AgroProductividad*, 9(1). Luna G M, y Amador E G 2016. Caracterización fisicoquímica y sensorial de *vanilla planifolia* Jacks ex Andrews con diferentes esquemas de beneficiado. *Agroproductividad*, 9 (1): 34-40.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) 2010. Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. En línea: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/VAI\\_N\\_LLA.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAI_N_LLA.pdf). Consultado: el 03 de septiembre de 2023.
- Samuels G J. y A Ismael. 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldiae*: two new *T. hamatum* like species. *Mycologia* 101(1): 142-156.
- Samuels G J., Adnan I., Marie C B, Shopie De., R, Glando P. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102(4): 944-966.
- Samuels G, P. Chaverri, D Farr y E McGray. 1996. *Trichoderma*, *Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA (A U Systemic Mycology and Microbiology Laboratory, Productor.*
- SADER (Secretaría de agricultura desarrollo rural) 2022. Sabías qué ... México es el centro de origen de la vainilla. En línea <https://www.gob.mx/agricultura/pueblos/articulos/sabias-que-mexico-es-el-centro-de->

- [origen-de-la-vainilla#:~:text=La%20ixtililx%C3%B3chitl%20\(flora%20negra\)%20Cnorte%20de%20Veracruz%20y%20Puebla.](#) Consultado el 03 de septiembre de 2023.
- SER (Secretaría de relaciones exteriores) 2022. Contexto internacional. En línea: [https://portal.es.sre.gob.mx/atlasprospectivo/es/contexto-internacional-seagro#:~:text=Michos%20de%20los%20pa%C3%ADses%20exportadores,Guinea%20\(4%25\)%20C%20Uganda](https://portal.es.sre.gob.mx/atlasprospectivo/es/contexto-internacional-seagro#:~:text=Michos%20de%20los%20pa%C3%ADses%20exportadores,Guinea%20(4%25)%20C%20Uganda). Consultado el 03 de septiembre de 2023.
- Shan X C, E C Y Liew, M A Weatherhead y I. J. Hodgkiss. 2002. Characterization and taxonomic placement of Rhizoctonia-like endophytes from orchid roots. *Mycologia* 94 (2): 230-239.
- Singh V, Upadhyay R, Sarma B, Singh H 2016. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research* 193: 74-86.
- Schwarz O y Beaty R 1996. Propagation from nonmeristematic tissues or anagenesis. In: *Hart Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Gray D y Trigiano R (Ed). CRC Press, Boca Raton pp. 95-104.
- Soto-Arenas M A 1999. Elogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Project J101, CONABIO México.
- Vázquez, A P., García G J. A & Azofeifa B. J. B 2014. Importancia y desafíos de la conservación de vainilla spp. (orquídeas) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25(1): 189-202.
- Verma M, Bar S, Tyagi R D, Surampalli R Y Valero J. R 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. Panoply of biological control. *Biotechnical engineering Journal* 37: 1-20.
- White J. W and J. Izquierdo 1991. Physiology of yield potential and stress tolerance. In: *Common Beans. Research for Crop Improvement*. A van Schoonhoven and O Voysest (eds.). CAB International. Willingford, U K pp.287-382.
- Youssef S, Tartoura K, Abdelraouf G 2016. Evaluation of *Trichoderma Harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging

enzymes and tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control* 100: 79-86.

## Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 21-nov-2023 5:30 p. m. CST

Identificador: 2235604136

Número de palabras: 11382

Entregado: 1

Tesis Por Adriana Marlenne Hernández Hernández

Similitud según fuente	
Índice de similitud	N/A
21%	21%
Internet Sources:	N/A
Publicaciones:	21%
Trabajos del estudiante:	N/A

2% match (Raúl Berdeja Arbeu, Citlalli Moreno López, José Méndez Gómez, Guillermo Jesuita Pérez Marroquín et al. "Las aplicaciones de etefón aumentan rendimiento de fruto de lima 'Persa' de exportación", Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan, 2022)

[Raúl Berdeja Arbeu, Citlalli Moreno López, José Méndez Gómez, Guillermo Jesuita Pérez Marroquín et al. "Las aplicaciones de etefón aumentan rendimiento de fruto de lima 'Persa' de exportación", Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan, 2022](#)

1% match (Diana Milena Avendaño Torres, Elberth Hernando Pinzón Sandoval, Pablo Antonio Serrano Cely. "Aspectos biotecnológicos en la propagación in vitro de magnoliáceas", Ciencia y Agricultura, 2022)

[Diana Milena Avendaño Torres, Elberth Hernando Pinzón Sandoval, Pablo Antonio Serrano Cely. "Aspectos biotecnológicos en la propagación in vitro de magnoliáceas", Ciencia y Agricultura, 2022](#)

1% match (Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas, María Julia Verde-Star. "Investigación en plantas de importancia médica", Omnia Publisher SL, 2016)

[Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas, María Julia Verde-Star. "Investigación en plantas de importancia médica", Omnia Publisher SL, 2016](#)

1% match (Ramiro Daniel Acurio Vásquez, Cinthia Karina España Imbaquingo. "AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE Trichoderma spp. COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS (Lolium perenne) Y TRÉBOL BLANCO (Trifolium repens)", La Granja, 2016)

[Ramiro Daniel Acurio Vásquez, Cinthia Karina España Imbaquingo. "AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE Trichoderma spp. COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS \(Lolium perenne\) Y TRÉBOL BLANCO \(Trifolium repens\)", La Granja, 2016](#)

1% match (Dagoberto Durán Hernández, Olivia Tzintzun Camacho, Onécimo Grimaldo-Juárez, Daniel González-Mendoza et al. "Compendio Científico en Ciencias Agrícolas y Biotecnología (Vol 2)", Omnia Publisher SL, 2019)

[Dagoberto Durán Hernández, Olivia Tzintzun Camacho, Onécimo Grimaldo-Juárez, Daniel González-Mendoza et al. "Compendio Científico en Ciencias Agrícolas y Biotecnología \(Vol 2\)", Omnia Publisher SL, 2019](#)

