

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA



CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma spp.*

ASOCIADAS A RAÍZ DE *BANANO*

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PRESENTA

DIANA CAROLINA RAMÍREZ TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Junio de 2020

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA



CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma spp.*

ASOCIADAS A RAÍZ DE BANANO

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PRESENTA

DIANA CAROLINA RAMÍREZ TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

ASESORES

DR. DELFINO REYES LÓPEZ

DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Junio de 2020

La presente tesis intitulada: **CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma spp.* ASOCIADAS A RAÍZ DE BANANO** y realizada por **Diana Carolina Ramírez Torres**, fue revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

Facultad de Ingeniería Agrohidráulica

Consejo particular integrado por:

Firma

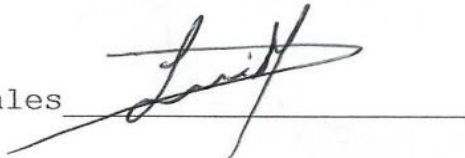
Director: Dra. Carmela Hernández Domínguez



Asesor: Dr. Delfino Reyes López



Asesor: Dr. Luis Antonio Domínguez Perales



San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Junio de 2020

El presente trabajo forma parte del Cuerpo Académico denominado: Agrobiotecnología y Recursos Naturales y de la Línea de Investigación: Control Biológico. Dicho trabajo fue financiado con recursos propios.

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este título a la persona que más adoro, admiro y respeto, a mi mamá Elvira Torres, quiero agradecerle por todos los sacrificios que ha tenido que hacer para darnos a mi hermano y a mí la oportunidad de convertirnos en profesionistas.

También quiero expresarle lo orgullosa que estoy de ella por lograr todo lo que se propone y lo afortunada que me siento al saber que es mi madre.

AGRADECIMIENTOS

A mi hermano A. Israel Ramirez, gracias por su apoyo y compañía de toda la vida.

A mi papá, Klever Aucapiña, gracias por dedicar su tiempo para cuidar de mamá, estoy muy feliz que sea parte de nuestra familia.

A mis abuelitos, Francisca Apolinar y Silvestre Torres, Yolanda Sorcia y Silvio Ramirez ustedes son una parte indispensable en mi vida.

A mis tíos y tías, gracias por el apoyo y el amor incondicional, estoy muy agraciada por la familia que tengo.

Y por último, pero no menos importante, a mi directora de tesis, gracias por su paciencia, por brindarme las herramientas necesarias y por prestarme parte de su tiempo.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESÚMEN	v
ABSTRAC	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. <i>General</i>	3
2.2. <i>Específicos</i>	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. <i>Origen y distribución del banano</i>	5
4.2. <i>Taxonomía del banano</i>	6
4.3. <i>Importancia del banano</i>	6
4.4. <i>Problemas del banano</i>	7
4.5. <i>Problemas del banano in vitro y adaptación en vivero</i>	7
4.6. <i>Trichoderma usado para el control de fitopatógenos</i>	8
4.7. <i>Taxonomía de Trichoderma</i>	10
4.8. <i>Mecanismos de acción de Trichoderma</i>	10
4.9. <i>Beneficios que aporta Trichoderma a las plantas</i>	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. <i>Lugar del experimento</i>	16
5.2. <i>Obtención del material vegetal y cepas de Trichdoerma</i>	17
5.3. <i>Preparación de concentración de cepas de Trichoderma</i>	17
5.4. <i>Inoculación de Trichoderma en plantas de plátano</i>	18

5.5. Colonización endófitas de especies de <i>Trichoderma</i> en plantas de banano inoculadas	20
5.6. Identificación de especies de <i>Trichoderma</i> de raíces de banano inoculadas en mezcla	20
5.7. Relación entre colonización endófitas, peso, elongación y diámetro de raíces de banano	23
5.8. Relación entre mortalidad de plantas de banano y colonización endófitas de <i>Trichoderma</i> en raíz	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	28
6.1. Colonización endófitas de especies de <i>Trichoderma</i> en plantas de banano inoculadas	28
6.2. Identificación de especies de <i>Trichoderma</i> de raíces de banano inoculadas en mezcla	36
6.3. Relación entre colonización endófitas, peso, elongación y diámetro en raíz de banano	40
6.4. Relación entre mortalidad de plantas de banano y colonización endófitas de <i>Trichoderma</i> en raíz	41
VII. CONCLUSIONES	44
VIII. LITERATURA CITADA	45
IX. ANEXOS	54

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i>	9
Cuadro 2.	Descripción de especies de <i>Trichoderma</i> utilizados..	17
Cuadro 3.	Primers para amplificación.....	22
Cuadro 4.	Cantidades de amplificación.....	22
Cuadro 5.	Condiciones de amplificación.....	22
Cuadro 6.	Datos reales de crecimiento endófito en raíz, usados en la prueba de Kruskal Wallis.....	30
Cuadro 7.	Medias de cuadrados mínimos para el efecto tratamiento.....	31
Cuadro 8.	Diferencia de colonización endófito de especies de <i>Trichoderma</i> en dos variedades de banano.....	32
Cuadro 9.	Datos reales de colonización endófito en bráctea, usados en la prueba de Kruskal Wallis.....	35
Cuadro 10.	Relación entre colonización endófito de <i>T. andinense</i> y peso de planta, longitud y diámetro en raíz.....	40
Cuadro 11.	Datos reales de crecimiento endófito en raíz, mortalidad de plantas y comparación de media de los rangos ajustados obtenidos con Kruskal Wallis.....	41
Cuadro 12.	Medias de cuadrados mínimos para el efecto Tratamiento.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Localización geográfica del experimento.....	16
------------------	--	----

Figura 2.	<i>Trichoderma</i> visualizada bajo microscopio.....	19
Figura 3.	Plantulas de banano en tubetes con sustrato.....	24
Figura 4.	Crecimiento de micelio interno en raíz de plantas de banano variedad Williams y Francés.....	28
Figura 5.	Micelio externo sobre la superficie de tejido de brácteas.....	29
Figura 6.	Diferencias de colonización endófito de especies de <i>Trichoderma</i> en dos variedades de banano.....	33
Figura 7.	Análisis de especies de <i>Trichoderma</i> incluidas en los tratamientos y comparadas con la mezcla usada en banano Francés y Williams.....	37
Figura 8.	Comparación de las secuencias de ADN de las especies de <i>Trichoderma</i> utilizadas como tratamientos y las secuencias pertenecientes a la mezcla.....	39
Figura 9.	Relación entre el número de plantas muertas y el crecimiento endófito de los diferentes tratamientos.....	42

CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma spp.*
ASOCIADAS A RAÍZ DE BANANO

RESÚMEN

Se evaluó el crecimiento endófito de una mezcla de cinco especies de *Trichoderma* (*T. spirale*, *T. longibrachiatum*, *T. parareesei*, *T. andinense* y *T. hamatum*) en dos variedades de banano y el efecto independiente de cada una, así como el enraizamiento y la mortalidad de las variedades colonizadas con especies endófitas.

Para lo cual se inoculó una concentración de 1×10^4 esporas/mL de *Trichoderma* en 35 plantas de banano *in vitro* de la variedad Williams y 35 plantas de la variedad francés repartidas en 7 frascos los cuales se incubaron a temperatura ambiente. Después de 10 días se evaluó el tipo de colonización en raíz y brácteas. Para evaluar la colonización en el tratamiento mezcla se realizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente, las unidades experimentales se sembraron en una mezcla 1:1:3 (una parte de agrolita y una parte de peatmoss por tres de tierra de monte) y después de 3 meses se evaluó la longitud, el diámetro de raíz y la mortalidad de las plantas.

La mayor colonización endófitas en raíz de bananos de la variedad Williams se observó con *T. hamatum* mientras que para los bananos de la variedad Francés, *T. parareesei* mostró mayor colonización endófitas sin embargo, no se obtuvieron resultados significativos de la colonización en bráctea. Por otra parte, en los tratamientos mezcla detectadas con la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las secuencias de *T. andinense* y *T. parareesei* mostraron mayor similitud a la mezcla en la variedad Francés, y *T. parareesei* en la variedad Williams. Finalmente, no se observó relación directa entre la colonización endófitas y el crecimiento radicular.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., colonización, banano, raíz.

COLONIZATION CAPACITY OF STRAINS OF *Trichoderma* spp.
ASSOCIATED WITH BANANA ROOTS

ABSTRAC

Growth was evaluated the increase endophytic in five species mixture of *Trichoderma* (*T. spirale*, *T. longibrachiatum*, *T. parareesei*, *T. andinense* y *T. hamatum*) in two variety of banana and the independent affect each one also was evaluated, as well as the rooting and the mortality of the colonized varieties with endophytic species.

For which a concentration of 1×10^4 spores/mL of *Trichoderma* was inoculated in 35 plants of banana *in vitro* Williams variety and 35 plants of French variety, which were repeated in 7 jars and incubated at room temperature. After 10 days, the type of colonization in roots and bracts was evaluated. To evaluate colonization in the mixed treatment, a polymerase chain reaction (PCR) test was performed. After, the experimental units were planted in a mixture 1:1:3 (a part of agrolita and a part of peat by three of mount earth) and after 3 months the length, diameter of root and plant mortality were evaluated.

The most endophytic colonization in banana roots of Williams variety was observed with *T. hamatum* while for bananas French variety, *T. parareesei* showed the most endophytic colonization, however, no significant results were obtained from colonization in the bract. On the other hand, in the mixed treatments that detected with the polymerase chain reaction test (PCR) the sequences in *T. andinense* and *T. parareesei* showed greater similarity to the mixture in the French variety, and *T. parareesei* in Williams variety. Finally, no direct relationship was observed between endophytic colonization and root growth.

Keywords: *Trichoderma* spp., colonization, banana, root.

I. INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprofitos y antagonistas, se pueden encontrar en suelos de todas las latitudes, desde zonas polares hasta la ecuatorial (Rodríguez, 1990). Este hongo es capaz de colonizar los órganos de las plantas creciendo también entre sus células (endofíticamente) dependiendo de la especie a la que pertenece (Dinesh y Prateeksha, 2015). La efectividad de colonización está condicionada por la habilidad de cada microorganismo para sobrevivir y proliferar sobre la raíz en el tiempo y en la presencia de microflora (De Wegeret et al., 1988; Lugtenberget et al., 1999).

La importancia de la colonización es que las plantas muestran mayor crecimiento de tallo, generación de raíz y capacidad de resistencia al ataque de enfermedades, además de inducir cambios en su transcriptoma y proteger del estrés abiótico (Fenget et al., 2015; Dinesh y Prateeksha, 2015).

Aunque existe información sobre crecimiento interno de hongos en las plantas, en plátano existen pocos estudios acerca de su colonización. Al respecto, estudios realizados por Xia et al., (2010) sobre la distribución endofíticas y epifíticas de especies en banano, encontraron que varios aislados de *T. asperellum* , *T. virens* , *T. brevicompactum* , y *H. lixicrecen* como especies endofíticas en raíces de bananos, por lo que estos autores infieren que *Trichoderma* puede adaptarse y crecer sobre y dentro de la raíz, sin embargo, a pesar de que existe información sobre su estilo de vida existen poco estudios que muestren la relación (endófito o epifito) entre la respuesta a la colonización de las diferentes variedades de bananos y la generación de raíces, elongación de tallo y el enraizamiento,

razón en por la cual el objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de enraizamiento de acuerdo a la capacidad de colonización de cada especie de *Trichoderma* y variedad de banano.

II. OBJETIVOS

2.1. General

Estudiar la capacidad de enraizamiento de acuerdo al grado y tipo de colonización endófito de cada especie de *Trichoderma* en las variedades de banano Francés y Williams.

2.2. Específicos

Evaluar el crecimiento endófito de cinco especies de *Trichoderma* en dos variedades de banano.

Determinar el número de especies endófitas recuperadas al inocular una mezcla de cinco especies de *Trichoderma* en raíces de dos variedades de banano.

Determinar la capacidad de enraizamiento (longitud y diámetro de raíz) de dos variedades de banano colonizados con especies de *Trichoderma*.

Determinar la mortalidad de plantas en relación al crecimiento endófito de especies de *Trichoderma* en dos variedades de banano.

III. HIPÓTESIS

La capacidad de enraizamiento en las variedades de banano Francés y Williams manifestada en elongación y grosor ocurre mayormente si existe una colonización endófitica de las especies de *Trichoderma*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Origen y distribución del banano

El banano es procedente del Sudeste Asiático, en específico de Papúa Nueva Guinea de acuerdo con vestigios encontrados que indican que este sitio fue el lugar de origen, aunque en la actualidad todavía se encuentra en estado salvaje en Filipinas e incluso en Papúa Nueva Guinea e Indonesia (Lassoudiere, 2010; Robinson y Galán, 2011).

Según Robinson y Galán (2011), no se conoce con exactitud cómo fue la difusión inicial del cultivo de banano desde su centro de origen a otros lugares, sin embargo, las principales etapas de distribución y comercialización fueron las siguientes:

- 500 d.C. -Introducción en África desde Indonesia a través de Madagascar.
- 1000 d.C. -Dispersión en la Polinesia e introducción en el Mediterráneo durante la expansión del Islam.
- 1300-1400 -Introducción en las Islas Canarias procedente de África Occidental.
- 1516 -Introducción en el nuevo mundo (Santo Domingo) desde las Islas Canarias.
- 1500-1800 -Distribución de bananas y plátanos en América tropical.
- Comienzos del siglo XIX -Introducción en al nuevo mundo de los cultivares "Pequeña Enana" y "Gros Michel" desde el Sudeste de Asia.
- Finales del siglo XIX -Inicio del comercio internacional.
- Comienzos XX -La banana se convierte en un alimento de consumo generalizado en los mercados de los países de

clima templado del hemisferio occidental y también del Sudeste de Asia.

- 1993 -Creación de la Organización Común del Mercado (OCM) para la banana en la Unión Europea basada en un sistema de contingentes y otras ayudas compensatorias para los productores europeos y países ACP (África, Caribe y Pacífico).
- Siglo XXI -Las continuas quejas de los países del área dólar conducen a la adopción de un sistema exclusivamente arancelario en el mercado de la Unión Europea. Las bajas tarifas aplicadas a las importaciones de bananas procedentes del área dólar acentúan la tendencia a un mercado de bananas más liberalizado. Se alcanza un acuerdo final en 2010.

4.2. Taxonomía del banano

Musa spp. se ubica taxonómicamente según Simmonds (1973) en:

Reino: Vegetal
 División: Angiosperma
 Clase: Monocotiledónea
 Orden: Escitamineae
 Familia: Musaceae
 Género: Musa

4.3. Importancia del banano

A nivel mundial los principales países productores de banano son India, Filipinas, China, Ecuador, Brasil, Indonesia, Tanzania, Guatemala, Costa Rica y México. Este último en el

2017 ocupó el décimo lugar con una producción de 2, 232,360 millones de toneladas, con una superficie de 75,810 hectáreas, las cuales tuvieron un rendimiento de 29.4 toneladas por hectárea, esto representó una producción del 2%. Actualmente, los estados que sostienen la producción mexicana de plátano son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Nayarit, Michoacán, Colima, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Puebla generando un total de 4, 787,969 millones de pesos mexicanos (FAO, 2017).

4.4. Problemas del banano

Además de la comercialización la cual es la última fase del proceso de producción de banano, existen problemas que repercuten evidentemente desde el inicio y durante el proceso de producción, entre los principales problemas están los relacionados con plagas y enfermedades, estas últimas han sido en muchos casos muy devastadoras y han llevado a la extinción casi total de algunos clones de bananos. Este es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen. (Xia et al., 2010) que acabó con el plátano manzano, y la raza 4 que es aún más agresiva y letal ya que ataca a la mayoría de las variedades de bananos y actualmente se dispersa en países productores de esta fruta.

4.5. Problemas del banano *in vitro* y adaptación en vivero

De acuerdo con la letalidad de las enfermedades presentes en banano, se buscan alternativas que disminuyan los riesgos de ataque de estas enfermedades y aseguren de sanidad del cultivo. De aquí que se ha optado por el uso de planta reproducida *in*

vitro las cuales disminuyen la posibilidad de transmisión y dispersión de enfermedades.

Sin embargo, aunque con esta técnica pareciera que se ha dado solución en gran parte al problema de enfermedades, existen limitantes en el proceso de reproducción de estas plantas debido a los requerimientos nutricionales y hormonales para su reproducción en el medio de cultivo y posteriormente en la fase de adaptación, que representa un cambio de las condiciones del medio en el que se desarrolla y las nuevas condiciones a las que se debe adaptar la planta.

Los principales factores que influyen en la adaptación de la planta y que están relacionados en mayor medida con su mortalidad durante esta fase se encuentran, la poca cantidad de raíces con que cuenta la planta al momento del trasplante, el tamaño de las plantas que se van a trasplantar, la sanidad del sustrato que se usará. Este último relacionado con la presencia de enfermedades causadas por hongos (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, entre otras) que puedan atacar a la raíz de plantas pequeñas y la presencia de nematodos comunes en banano como *Radophulus similis*.

4.6. *Trichoderma* usado para el control de fitopatógenos

Especies del género *Trichoderma* han probado ser efectivas contra especies del género *Fusarium* y también ha demostrado que puede disminuir los efectos negativos que causa *Rhizoctonia solani* Kuhn (Infante et al., 2009), e incluso Sitoka et al., (2008) reportan la disminución el uso de este género para el bio-control de nematodos, en el cuadro 1 se puede observar algunos fitopatógenos que son controlados con *Tricoderma*. En general el género *Trichoderma* induce a mayor crecimiento de

tallo, generación de raíz y capacidad de resistencia al ataque de enfermedades, además de inducir cambios en su transcriptoma y proteger del estrés abiótico (Fenget al., 2015; Dinesh y Prateeksha, 2015).

Cuadro 1. Fitopatógenos controlados por *Trichoderma*.

Fitopatógeno controlado por <i>Trichoderma</i>	Enfermedad	Cultivo	Especie de <i>Trichoderma</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Papa, tomate, frijol, fresa, flores, tomate.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. pseudokonigii</i> <i>T. aureoviride</i> <i>T. viride</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición	Maíz.	<i>T. harzianum</i> <i>T. virens</i> , <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Phytophthora infestans</i>	Gota	Papa, pepino de agua.	<i>T. asperellum</i> <i>T. harzianum</i>
<i>Phytophthora</i> sp.	Pudrición	Tabaco, flores, Frutales, etc.	<i>T. harzianum</i> <i>T. aureoviride</i> <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Pythium</i> spp.	Pudrición algodonosa, volcamiento	Varios cultivos.	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i> <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitamientos vasculares	Papa, tomate, frijol, plátano, maíz, clavel.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. lignorum</i> <i>T. aureoviride</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Zanahori, tomate, lechuga, col, café, papa, cebolla, ajo, pimentón.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. pseudokonigii</i> <i>T. virens</i> <i>T. viride</i> <i>T. hamatum</i> <i>T. longibranchiatum</i>

Fuente: Chet and Inbar, 1994, modificado por Cobos, 2010.

4.7. Taxonomía de *Trichoderma*

Trichoderma se ubica taxonómicamente según Villegas (2005) en:

Reino: Fungi
División: Mycota
Subdivisión: Eumycota
Clase: Hyphomycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: *Trichoderma*

4.8. Mecanismos de acción de *Trichoderma*

De acuerdo con Xiaet al., (2010) la acción biocontroladora de *Trichoderma* tiene diferentes mecanismos de acción como son; competencia, microparasitismo y antibiosis, los cuales regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizosfera de las plantas.

Además de los mecanismos anteriores se conoce que *Trichoderma* presenta otros cuya acción biorreguladora es de forma indirecta, por ejemplo, los que inducen mecanismos de defensa fisiológico y bioquímico como es la activación en la planta por compuestos relacionados con la inducción de resistencia (Harman, 2000), la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección, la solubilización de elementos nutritivos que en su forma original no son accesibles para las plantas (Infante et al., 2009). *Trichoderma* tienen además la capacidad de crear un ambiente favorable al desarrollo

radicular ya que existe competencia, microparasitismo y antibiosis lo que aumenta la tolerancia de las plantas al estrés (Harman, 2003).

1) Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este hongo tiene una excelente habilidad como competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie (Wardle et al., 1993). *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Pérez, 2004).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos) (Stefanova et al., 1999) y microelementos. Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en los suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz.

La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una

microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, juntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Infante et al., 2009).

2) Microparasitismo

El microparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas estructurales tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Ulloa, 1996).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de microparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas de este y se enrollan en ellas penetrándolas en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico (Carsolio et al., 1999) que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

Chet y Benhamou (1998) describieron cuatro etapas del microparasitismo para *Trichoderma*, el desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrótica del antagonista.

Crecimiento quimiotrófico: El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (Chet e Inbar, 1994). En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus

hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.

Reconocimiento: El reconocimiento es específico solo para ciertos tipos de patógenos. El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular.

Adhesión y enrollamiento: Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, todo esto está mediado por procesos enzimáticos (Pérez, 2004). La adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno (Martínez et al., 1994).

Actividad lítica: En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haramet al., 1996).

Trichoderma excreta muchos metabolitos dentro de ellos enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma*, que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno (Eveleigh et al., 1986).

3) Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos.

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas antibióticos (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

4.9. Beneficios que aporta *Trichoderma* a las plantas

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde zonas polares hasta la ecuatorial y se caracterizan por ser hongos saprofitos que sobreviven descomponiendo diferentes cantidades de materia orgánica del suelo, y en determinadas condiciones este hongo puede ser anaerobio facultativo. La distribución tan amplia de este género y su plasticidad ecológica está estrechamente relacionada con su alta capacidad enzimática para degradar sustratos, y con su metabolismo y resistencia versátil a inhibidores microbianos (Xia et al., 2010).

El género *Trichoderma* tiene efecto directo en la inhibición de fitopatógenos mejorando la nutrición de las plantas. Este último efecto ocurre en forma diferencial dependiendo de la especie empleada; por ejemplo, Calvet et al., (1993) reportaron un efecto significativo de crecimiento de plantas de *Tagetes erecta* al inocularlas con *T. aureoviride* y *T. harzianum*), en contraste con la inoculación de *T. pseudokoningii* a plantas de soya las cuales mostraron un efecto inhibitorio de crecimiento (Martínez et al., 2004).

En variedades de plátano este tipo de hongos ha sido pobremente estudiado en vivero, sin embargo, existe información de aislamiento de especies endofitas de *Trichoderma spp.* Del cilindro central del banano en campos de América Central (Pocasangre et al., 2000).

Un endófito es un endosimbionte, frecuentemente una bacteria o un hongo que vive dentro de la planta sin causarle aparentemente enfermedad alguna. Los endófitos pueden ser antagonistas efectivos de los patógenos de las plantas estimulando la producción de productos químicos del huésped, lo que inhibe el crecimiento de organismos patógenos e incluso pueden estimular el crecimiento de la planta. A pesar de que los endófitos son ubicuos y se han encontrado en todas las especies de plantas estudiadas hasta la fecha, la mayoría de las relaciones endófito-planta no se entiende bien (Robinson y Galán, 2011).

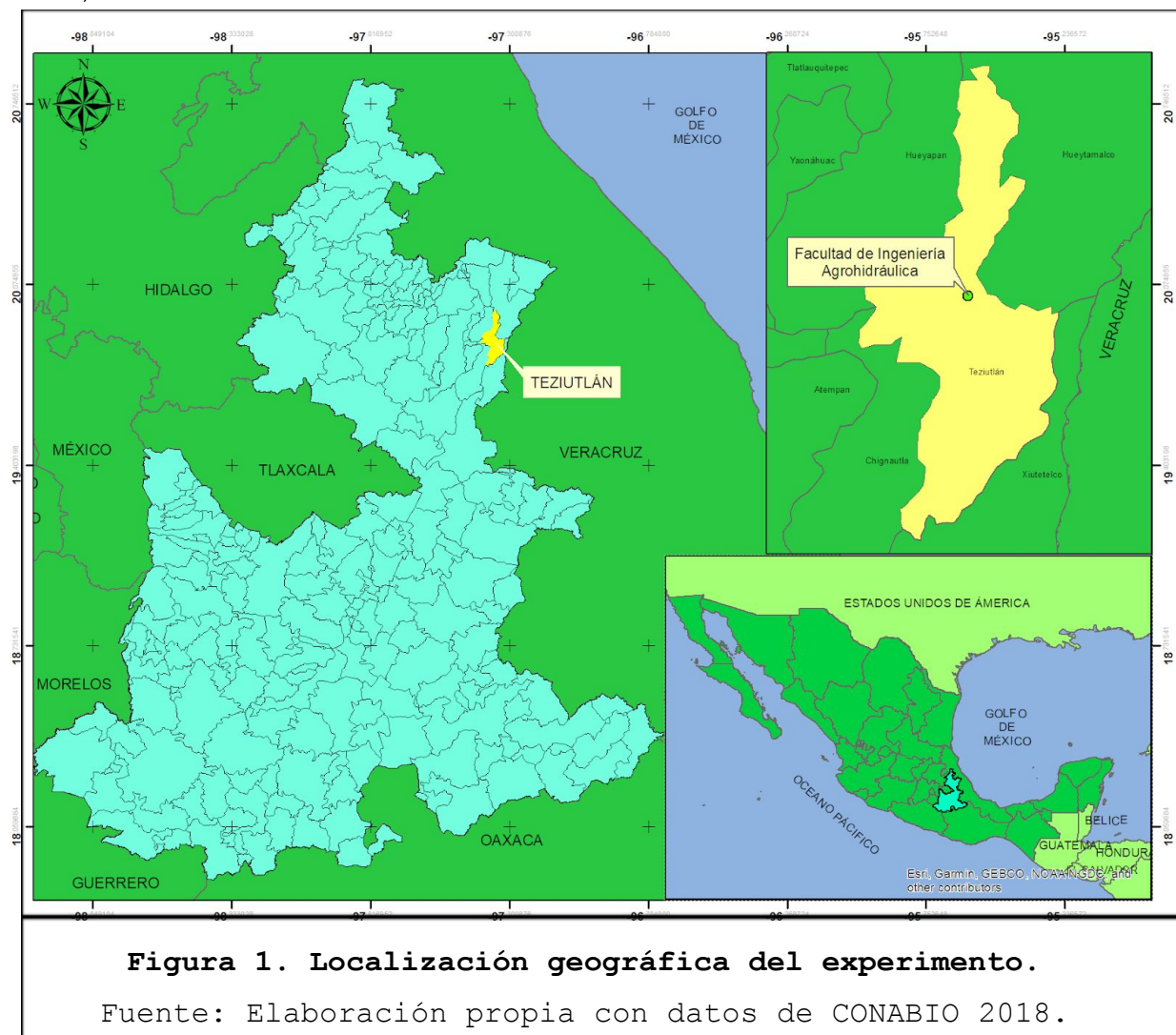
Por el contrario, los microorganismos simbioses epifitos son aquellos que viven en la superficie de las plantas y obtienen sus elementos nutritivos de la planta, pero no le causan ningún daño.

Zum Felde et al., (2006), aislaron hongos endófitos de cuatro plantas de plátanos en campos de Guatemala y descubrieron que *Fusarium* y *Trichoderma spp.* fueron los endófitos más comúnmente encontrados. Cinco años más tarde, Xia et al. (2010), analizaron raíces de plantas de banano y encontraron que las especies *T. asperellum* y *T. virens* son endofitas; mientras que las especies *T. asperellum*, *T. virens*, *T. koningiopsis*, y *T. atroviride* son epifitas. Solo dos especies en este estudio fueron encontradas en ambos nichos *T. asperellum* y *T. virens*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar del experimento

El experimento fue establecido en la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicada en San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, Mexico; el cual está localizado entre la latitud $19^{\circ}52'34.24''\text{N}$ y longitud $97^{\circ}21'38.77''\text{O}$ (Figura 1). Se encuentra a una altitud de 1669 metros sobre el nivel del mar. Se registran precipitaciones de 1100 a 3600 milímetros anuales (INEGI, 2009).



5.2. Obtención del material vegetal y cepas de *Trichoderma*

Se utilizaron 35 plantas de banano de la variedad Williams y 35 plantas de la variedad francés las cuales fueron obtenidas del laboratorio Nature Source Improved Plants. Estas plantas fueron de la cuarta generación *in vitro*, las cuales se agruparon en 5 plantas por frasco con el fin de establecer los tratamientos, los cuales se formaron con 5 cepas de *Trichoderma* (Cuadro 2) obtenidas de la colección de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con la siguiente descripción:

Cuadro 2. Descripción de especies de *Trichoderma* utilizados.

ESPECIE	NUMERO DE ACCESIÓN DEL BANCO DE GENES	NÚMERO DE AISLADO
<i>T. spirale</i>	MK086990	VB2IT2
<i>T. longibrachiatum</i>	MK086985	VB8IT1
<i>T. parareesei</i>	MK086987	VB10IT1
<i>T. andinense</i>	MK086991	VB26IT1
<i>T. hamatum</i>	MK086996	VB21IT2

De cada una de las especies se reactivó su crecimiento en placas de Petri con 15 mL de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) marca BD Bioxon esterilizado, preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexo 1) y posteriormente se preparó una concentración de esporas para su inoculación en plantas.

5.3. Preparación de concentración de cepas de *Trichoderma*

Con la ayuda de una micropipeta se colocaron 100 μ L de glicerol con esporas sobre el medio de cultivo y con un

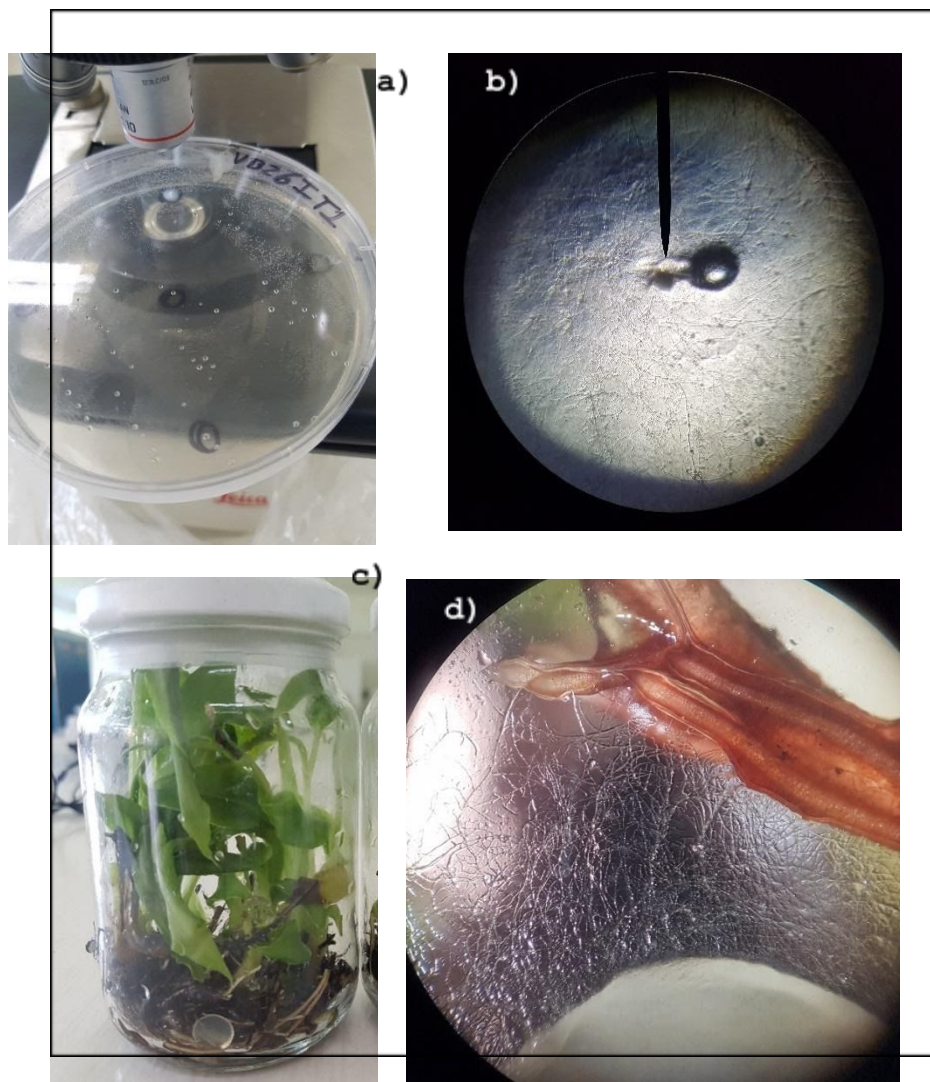
triángulo de cristal estéril se esparcieron, y cada una de las cajas se etiquetó y selló con cinta parafilm (Bemis) y posteriormente fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días observando constantemente su crecimiento. Pasado este tiempo, del crecimiento de esporas de cada especie de *Trichoderma* se cortó un círculo de 0.5 cm de diámetro y se colocó en contacto con el centro de un círculo de película de papel celofán adherido sobre medio de cultivo PDA contenido en una nueva placa Petri. Todas las cajas fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días.

Después de 5 días de crecimiento sobre la película de papel, de cada una de las especies crecidas se retiró con una espátula toda la espora de la superficie y se colocó en un vial con 5 mL de Tween 80 a 0.03 %, y a cada solución obtenida se le determinó la concentración de 1×10^4 esporas por mL^{-1} en una cámara de Neubauer (Anexo 2). Una vez obtenida la concentración de cada especie (tratamientos), en un tubo de 1500 μL se agregó 100 μL de cada una de éstas y se realizó una mezcla, la cual representó el tratamiento número seis. De cada tratamiento se colocaron 10 μL de solución en 4 puntos marcados con círculos sobre la superficie de una placa Petri con medio de cultivo PDA. Todas las cajas fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días (Figura 2c).

5.4. Inoculación de *Trichoderma* en plantas de plátano

Transcurridas las 24 horas de incubación cada una de las especies fue visualizada en el microscopio compuesto (Figura 2 a y b), y dos círculos de 0.5 cm de diámetro del medio de cultivo fueron cortados, extraídos y colocados entre la superficie del medio de cultivo y las paredes del frasco de las

plantas enraizadas (Figura 2 c). Las plantas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 120 horas. Posteriormente fue observado en un microscopio compuesto el crecimiento del micelio sobre el tejido de cada una de las plantas (Figura 2 d) enraizadas en cada frasco y se determinó el tipo de colonización.



5.5. Colonización endófitica de especies de *Trichoderma* en plantas de banano inoculadas

En raíz: Se tomaron 5 raíces secundarias de cada planta de las cuales se realizaron cortes longitudinales con una navaja marca Gillette®, se tiñeron con azul de lactofenol al 1 % y se colocaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos, posteriormente se visualizaron en el microscopio compuesto (LEICA) para detectar micelio intercelular.

Después de la observación se contó la cantidad de raíces colonizadas endófitamente por especie inoculada y por variedad analizada.

En brácteas: De la base del tallo se extrajeron y lavaron trozos de tejido de 0.5 cm cuadrados (cm²) de la segunda bráctea de cada una de las plantas del frasco. Cada trozo fue teñido con azul de lactofenol al 1 % y se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos, posteriormente se visualizó en el microscopio compuesto (LEICA) para detectar micelio endófito o epífita.

Para determinar el efecto de los tratamientos fue realizado un análisis de varianza con la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación de medias por la prueba Tukey con el paquete estadístico SAS versión 9.0 para Windows.

5.6. Identificación de especies de *Trichoderma* de raíces de banano inoculadas en mezcla

Crecimiento de micelio: Después de 120 horas de inoculación con la mezcla de las 5 especies de *Trichoderma* no se pudo identificar a simple vista la especie de hongo crecida, así que

se extrajeron trozos de tejido de 0.5 cm² de la segunda bráctea de cada una de las plantas y se colocaron sobre una película de papel celofán adherido sobre el medio del cultivo agar de papa dextrosa contenido en una placa de Petri la cual se selló con cinta parafilm (Marca Bemis) y fue incubada a 31°C± 2°C por 5 días. Pasado este tiempo el crecimiento micelial de cada caja se colocó en un tubo para microcentrífuga estéril de 1500 µL el cual fue liofilizado por 8 horas en un equipo de liofilización LABCONCO Freezone de 4,5 litros, para eliminar la humedad y realizar la extracción del ADN.

Extracción de ADN: En un tubo estéril de 1500 µL se colocaron de 0.05 g de micelio liofilizado producto de la mezcla de especies de *Trichoderma*. Cada tubo fue colocado en un flotador y éste a su vez en nitrógeno líquido, así mismo se agregó nitrógeno líquido en el interior de cada tubo y fue macerado con micro pistilo. Posteriormente se procedió de acuerdo al protocolo de extracción de ADN (Anexo 3) con ligeras modificaciones. Para evaluar la calidad del ADN extraído se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Marca ThermoScientific, modelo NANODROP 2000C) mediante un gel de agarosa al 1.5% que fue visualizado en un transiluminador (Marca UVP, Modelo 3UV-LMS26) de acuerdo al Anexo 4.

Posteriormente cada muestra de ADN fue almacenada en un refrigerador a -7°C, para la amplificación por PCR.

Amplificación por PCR del ADN extraído: El ADN obtenido de la mezcla de especies de *Trichoderma* fue amplificado para la región ITS del gen 5.8S rRNA con los primers (White et al., 1990), AppliedBiosystems, USA, (Cuadro 3).

Cuadro 3. Primers para amplificación.

Iniciador	Bases	Secuencia
ITS1	19	5´ - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3´
ITS2	20	5´ -GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC- 3´

Para lo cual se utilizó un kit para amplificación de PCR de la marca PROMEGA MADISON, de acuerdo al procedimiento descrito por Pavone y Dorta (2015) con una mezcla de acuerdo al cuadro4. Y de acuerdo al programa descrito en el cuadro 5, utilizando un termociclador de la marca MYCYCLER.

Cuadro 4. Cantidades de amplificación.

Reactivo	Concentración	Microlitros (µL)
Trehalosa	10 %	9.5
Buffer	5X	2.5
dNTPS	10 mM	1.5
MgCl ₂	25 mM	1.5
Primer ITS1	10 mM	0.75
Primer ITS2	10 mM	0.75
Taq Polimerasa	5 U/ µL	0.5 µL
ADN	20 mM	3 µL
Volumen final		20 µL

Cuadro 5. Condiciones de amplificación

Proceso	Grados (°C)	Tiempo (min)	Ciclo
	)	)	s
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	36
Alineamiento	56	1	36
Extensión	72	1	36
Extensión final	72	5	1

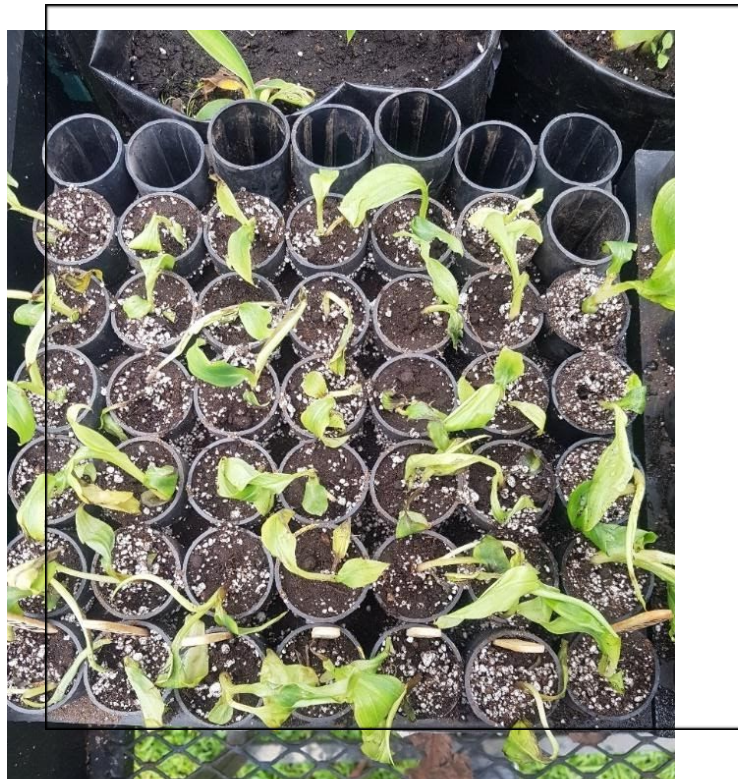
Para evaluar los productos de PCR obtenidos se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Marca Thermoscientific, modelo NANODROP 2000C) mediante un gel de agarosa al 1.5% y fue visualizado en un transiluminador (Marca UVP, Modelo 3UV-LMS26) (Anexo 4). De cada gel se tomaron fotos y cada una de las muestras amplificadas fue conservada en congelación a -10 °C.

Los resultados de la secuenciación del ADN amplificado fueron editados con el programa BioEdit versión 7.1.9 (Hall, 1999) (figura 8) y el árbol filogenético fue generado con el método Neighbor-joining utilizando el programa Mega versión 3.6 (Tamura et al., 2011) (figura 7).

5.7. Relación entre colonización endófitas, peso, elongación y diámetro de raíces de banano

Para determinar la capacidad de enraizamiento de cada una de las especies y la mezcla de las cinco especies de

Trichoderma, se preparó un sustrato de una mezcla de agrolita, tierra de monte y peatmoss a razón de 1:1:3; una parte de agrolita y una parte de peatmoss por tres de tierra de monte el cual se colocó en tubetes negros diseñados específicamente para plantulas (Figura 3).



Después de 10 días de la inoculación con *Trichoderma* todas las plántulas enraizadas se sacaron de los contenedores con medio de cultivo, el cual fue retirado con agua corriente y se dejó reposar en una solución de estreptomicina 50 mg por mL⁻¹. Posteriormente todas las plantas fueron sembradas en el sustrato preparado previamente y fueron mantenidas a temperatura ambiente por tres meses para determinar el efecto de los tratamientos en la generación de follaje y raíz. Para éste último paso se retiró toda la tierra de la raíz de cada planta, se pesó en una balanza de precisión y se midió la longitud y diámetro de la raíz con un vernier. Los datos obtenidos fueron recopilados en una libreta de notas para su análisis posterior.

Para el establecimiento del experimento se utilizaron 6 tratamientos (5 especies, una mezcla de las 5 especies) y un testigo para cada una de las variedades de banano, donde la unidad experimental fue una planta con 5 raíces y 5 repeticiones, en un diseño completamente al azar.

Como los datos obtenidos de colonización fueron nominales (presencia de colonización= 1, Ausencia de colonización= 0) y se distribuyeron de manera binomial y no como una distribución normal por lo que se realizó el análisis con la prueba de Kruskal- Wallis para conocer el efecto diferente entre los tratamientos:

$H_0: T_1=T_2=...T_{13}$ **VS** H_a : Al menos un T_i tiene un efecto diferente al de los demás.

Estadístico de prueba:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^K \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

N= Número total de datos en el experimento

R_i = Suma de los rangos de los datos que pertenecen al i-ésimo tratamiento

r_i = Número de repeticiones para el i-ésimo tratamiento

Y también conocerla existencia de diferencia mínima significativa entre las especies de *Trichoderma* en función a la variedad de banano probadaa través dela comparación múltiple de medias de los rangos:

Hipótesis a probar

$$H_o: T_i = T_j \text{ VS } H_a: T_i \neq T_j$$

Para conocer la relación entre el efecto de los tratamientos con las variables respuesta se realizo un análisis de regresión lineal:

$$H_o: \beta_1 = 0 \quad \text{vs} \quad H_a: \beta_1 \neq 0$$

El modelo de regresión no es adecuado para describir el comportamiento de los datos.

El modelo de regresión es adecuado para describir el comportamiento de los datos.

Y un análisis de correlación entre los datos de colonización endófitas y los datos de peso, longitud y diámetro de raíz en las plantas de la variedad Francés al ser inoculadas con *T. andinense*:

Ha: Existe correlación entre los datos de colonización endófitica y los datos de peso, longitud y diámetro de raíz en las plantas de la variedad Francés al ser inoculadas con *T. andinense* si el coeficiente de correlación es $\neq 0$

$$H_0: r_{xy} = 0 \quad \text{vs} H_a: r_{xy} \neq 0$$

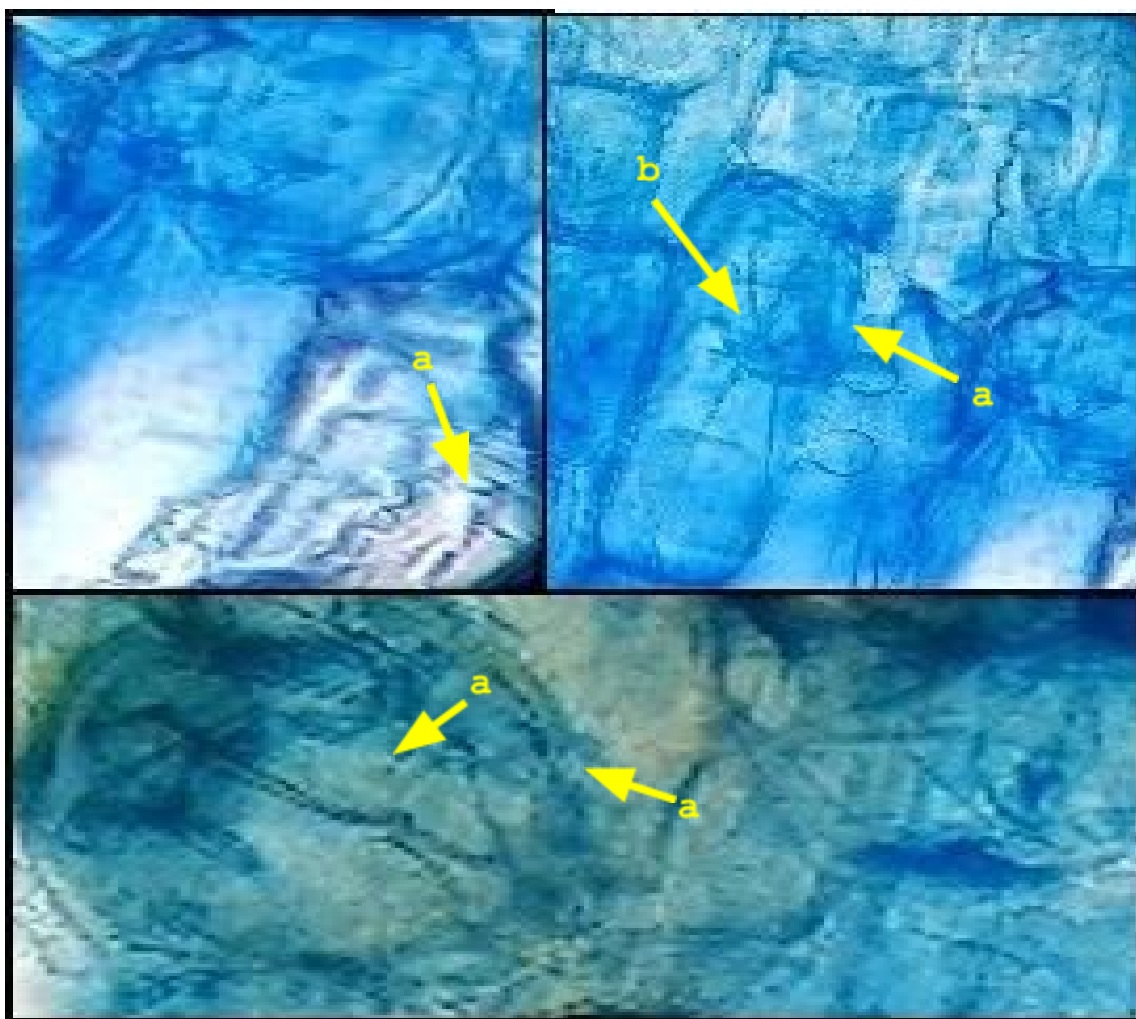
5.8. Relación entre mortalidad de plantas de banano y colonización endófitica de *Trichoderma* en raíz

Para determinar la relación entre la mortalidad de plantas de bananos y la colonización endófitica de especies de *Trichoderma* en raíz, después tres meses de llevarse a cabo el experimento se contabilizaron las plantas muertas y las que sobrevivieron, y con los datos numéricos obtenidos hizo un análisis con la prueba de Kruskal-Wallis con una confiabilidad del 95 % y una prueba de correlación simple entre los datos de colonización endófitica y el número de plantas muertas. El análisis se realizó con el paquete estadístico SAS version 9.0 para Windows.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Colonización endófitica de especies de *Trichoderma* en plantas de banano inoculadas

Se observó micelio interno en los tejidos de plantas inoculadas con todas las especies de *Trichoderma*, tanto en la variedad William como en la variedad Francés e incluso en tejidos de plantas inoculados con la mezcla de las 5 especies de *Trichoderma* (Figura 4).



También se observó presencia de micelio externo sobre la superficie de las brácteas de la base del tallo de algunas plantas (Figura 5a), dicho micelio no se observó que pudiera estar dentro del tejido (Figura 5c).

Figura 4. Crecimiento de micelio interno en raíz de plantas de banano variedad Williams y Francés (a),

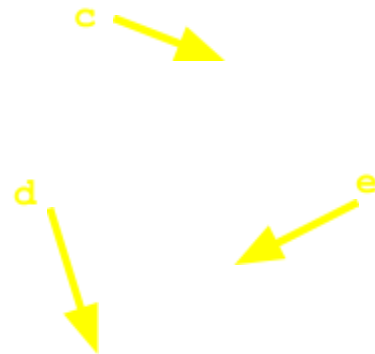
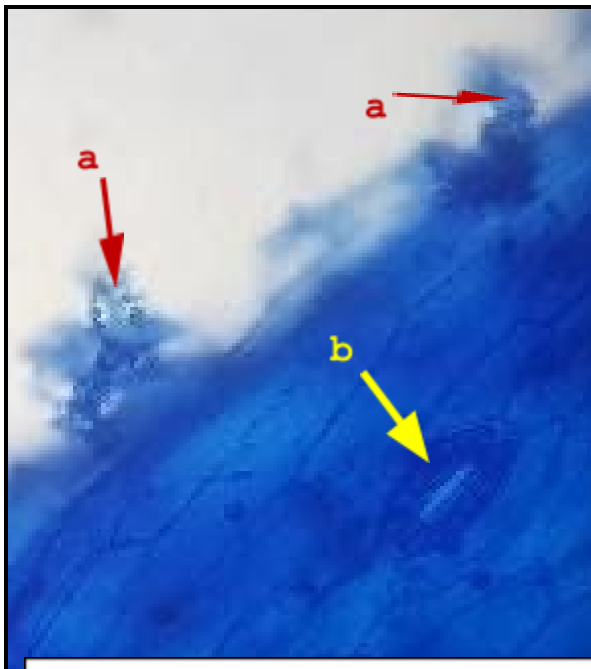
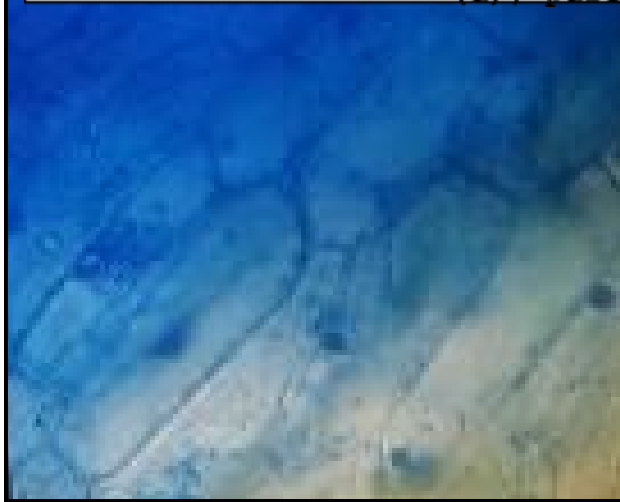


Figura 5. Micelio externo sobre la superficie de tejido de brácteas (a), Estoma abierto (b), Células de tejido de bráctea con ausencia de micelio interno (c), núcleo celular (d), pared celular.



En raíz: De acuerdo al análisis de suma de rangos de los tratamientos formados para la prueba de **Kruskal Wallis** (Cuadro 6), al menos un tratamiento produjo un efecto diferente a los demás ($P \leq 0.05$) debido a que el estadístico **H** (Chi cuadrada) fue de 31.13 y $Pr > \text{Chi cuadrada}$ de **0.0019**.

Cuadro 6. Datos reales de crecimiento endófito en raíz, usados en la prueba de Kruskal Wallis.

TRATAMIENTOS (T)		VARIABLE RESPUESTA				
		Número de raíces con crecimiento endófito en plantas				
		R1	R2	R3	R4	R5
En variedad Williams						
<i>T.spirale</i>	(T1)	2	2	1	2	2
<i>T.parareesei</i>	(T2)	2	2	2	1	2
<i>T.andinense</i>	(T3)	3	3	3	2	1
<i>T.longibrachiatum</i>	(T4)	2	2	4	2	2
<i>T.hamatum</i>	(T5)	4	3	3	3	1
Mezcla	(T6)	3	0	1	1	1
Testigo	(T7)	0	0	0	0	0
En variedad Francés						
<i>T.spirale</i>	(T8)	0	2	3	2	4
<i>T.parareesei</i>	(T9)	3	2	3	1	3
<i>T.andinense</i>	(T10)	0	3	2	1	0
<i>T.longibrachiatum</i>	(T11)	3	2	2	3	0
<i>T.hamatum</i>	(T12)	3	2	3	0	1
Mezcla	(T13)	1	0	0	0	1
Testigo	(T14)	0	0	0	0	0

Mientras que la comparación múltiple de medias de los rangos indicó que $(pr>|T|) < 0.05$ al menos un tratamiento tiene efecto diferente. Esto se puede ver en el cuadro 7, donde los valores en negrita que toma $(pr>|T|)$ son $< a 0.05$ establecido para una **confiabilidad de 95%**. Por lo tanto, al comparar las medias de los rangos en los diferentes tratamientos, resultó que el mejor tratamiento; que mostró mayor capacidad endófito fue *T.hamatum* en la variedad de banano Williams (Figura 6) a diferencia de los demás tratamientos especialmente con las mezclas en Williams y Francés, y el testigo (Cuadro 8).

Cuadro 7. Medias de cuadrados mínimos para el efecto tratamiento.

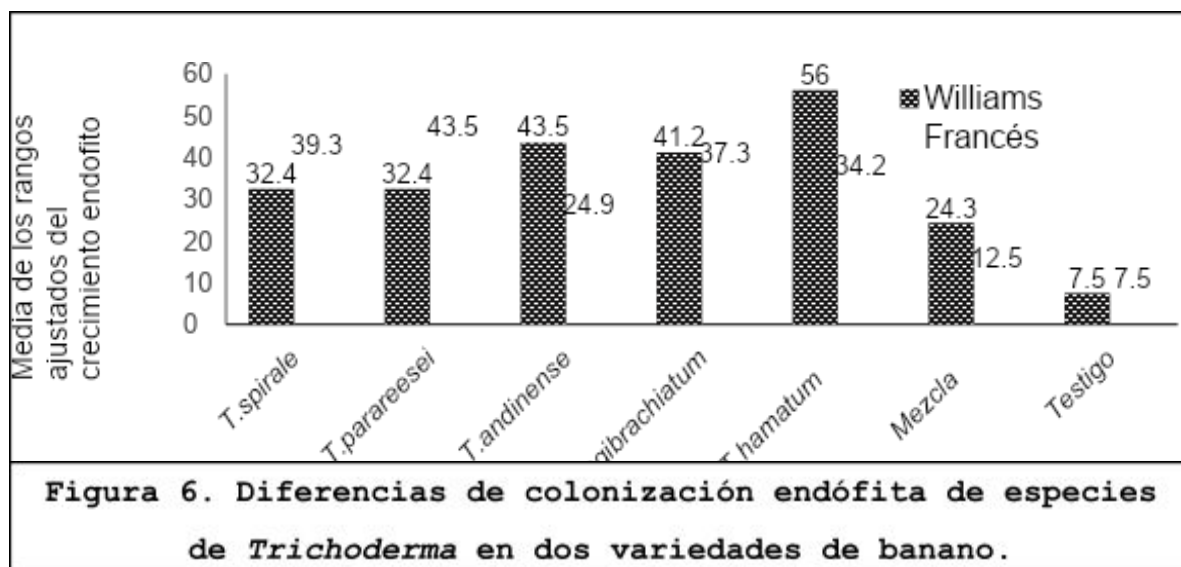
(T para H0: LS Mean (i)=LS Mean (j) / Pr > |t|), Variable dependiente: rangos de plantas con crecimiento endófito.

i\j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0	-1.20543	-0.95566	-2.5629	0.87964	-0.74932	-1.20543	0.814481	-0.53213	-0.19548
		1.0000	0.2335	0.3437	0.0133	0.3831	0.4570	0.2335	0.4191	0.5969	0.8458
2	0		-1.20543	-0.95566	-2.5629	0.87964	-0.74932	-1.20543	0.814481	-0.53213	-0.19548
	1.0000		0.2335	0.3437	0.0133	0.3831	0.4570	0.2335	0.4191	0.5969	0.8458
3	1.205432	1.205432		0.249774	-1.35747	2.085072	0.456109	0	2.019913	0.673304	1.009957
	0.2335	0.2335		0.8037	0.1805	0.0420	0.6502	1.0000	0.0486	0.5037	0.3172
4	0.955658	0.955658	-0.24977		-1.60724	1.835298	0.206335	-0.24977	1.770139	0.42353	0.760182
	0.3437	0.3437	0.8037		0.1141	0.0722	0.8373	0.8037	0.0826	0.6737	0.4506
5	2.562901	2.562901	1.357469	1.607243		3.442541	1.813578	1.357469	3.377382	2.030773	2.367425
	0.0133	0.0133	0.1805	0.1141		0.0011	0.0755	0.1805	0.0014	0.0474	0.0217
6	-0.87964	-0.87964	-2.08507	-1.8353	-3.44254		-1.62896	-2.08507	-0.06516	-1.41177	-1.07512
	0.3831	0.3831	0.0420	0.0722	0.0011		0.1094	0.0420	0.9483	0.1640	0.2873
7	0.749323	0.749323	-0.45611	-0.20634	-1.81358	1.628962		-0.45611	1.563804	0.217195	0.553847
	0.4570	0.4570	0.6502	0.8373	0.0755	0.1094		0.6502	0.1239	0.8289	0.5821
8	1.205432	1.205432	0	0.249774	-1.35747	2.085072	0.456109		2.019913	0.673304	1.009957
	0.2335	0.2335	1.0000	0.8037	0.1805	0.0420	0.6502		0.0486	0.5037	0.3172
9	-0.81448	-0.81448	-2.01991	-1.77014	-3.37738	0.065158	-1.5638	-2.01991		-1.34661	-1.00996
	0.4191	0.4191	0.0486	0.0826	0.0014	0.9483	0.1239	0.0486		0.1839	0.3172
10	0.532128	0.532128	-0.6733	-0.42353	-2.03077	1.411767	-0.21719	-0.6733	1.346609		0.336652
	0.5969	0.5969	0.5037	0.6737	0.0474	0.1640	0.8289	0.5037	0.1839		0.7377
11	0.195475	0.195475	-1.00996	-0.76018	-2.36743	1.075115	-0.55385	1.00996	1.009957	-0.33665	
	0.8458	0.8458	0.3172	0.4506	0.0217	0.2873	0.5821	0.3172	0.3172	0.7377	
12	-2.16109	-2.16109	-3.36652	-3.11675	-4.72399	-1.28145	-2.91041	-3.36652	-1.34661	-2.69322	-2.35657
	0.0353	0.0353	0.0014	0.0030	<.0001	0.2057	0.0053	0.0014	0.1839	0.0095	0.0222
13	-2.70408	-2.70408	-3.90951	-3.65974	-5.26698	-1.82444	-3.4534	-3.90951	-1.8896	-3.23621	-2.89955
	0.0092	0.0092	0.0003	0.0006	<.0001	0.0738	0.0011	0.0003	0.0644	0.0021	0.0055

Los valores en négrita son < 0.05, establecido para una confiabilidad de 95%.

Cuadro 8. Diferencia de colonización endófitica de especies de *Trichoderma* en dos variedades de banano.

Tratamiento (T) Especies de <i>Trichoderma</i> en función a la variedad de banano	Media de los rangos ajustados de crecimiento endófito en raíz	Diferencia con tratamientos
En variedad Williams		
<i>T. spirale</i> (T1)	32.40	T5, T12 y T13
<i>T. parareesei</i> (T2)	32.40	T5, T12 y T13
<i>T. andinense</i> (T3)	43.50	T6, T9, T12 y T13
<i>T. longibrachiatum</i> (T4)	41.20	T11, T12 y T13
<i>T. hamatum</i> (T5)	56.00	T1, T2, T6, T7, T9, T10, T11, T12 y T13.
Mezcla (T6)	24.30	T3, T5 y T8
Testigo (T7)	7.50	T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T10 y T11
En variedad Francés		
<i>T. spirale</i> (T8)	39.30	T12 y T13
<i>T. parareesei</i> (T9)	43.50	T6, T9, T12 y T13
<i>T. andinense</i> (T10)	24.90	T3, T5, y T8
<i>T. longibrachiatum</i> (T11)	37.30	T5, T12 y T13
<i>T. hamatum</i> (T12)	34.20	T5, T12 y T13
Mezcla (T13)	12.50	T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T10 y T11
Testigo (T14)	7.50	T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T10 y T11



Aunque existe poca información de crecimiento endófito de *T. hamatum* en banano, Bae et al., (2009) encontraron crecimiento endófito en cacao donde observaron que las plantas con presencia de estos endófitos tuvieron mayor tolerancia a la sequía y una recuperación más rápida, dicho efecto fue atribuido a que la colonización indujo el crecimiento de las raíces y con ello hubo un aumento del contenido de agua que causó un retraso en muchos aspectos de la respuesta a la sequía.

De acuerdo con Contreras et al., (2009) muchas especies de *Trichoderma* spp. producen y modulan señales hormonales para facilitar la colonización de las raíces. El hongo produce auxinas que promueven el crecimiento de la raíz que, a su vez, facilita la colonización al aumentar el área de superficie disponible.

Trichoderma despliega pequeñas proteínas secretadas similares a la hidrofobina ricas en cisteína para facilitar el anclaje / fijación. Se ha encontrado que dos de estas proteínas facilitan la unión a las raíces TasHyd1 de *T. asperellum* y

Qid74 de *T. harzianum* (Samolskiet al., 2012). Qid74 tiene un papel importante en el crecimiento lateral de la raíz y la formación y alargamiento del cabello. *Trichoderma* spp. secreta proteínas similares a expansina con módulos de unión a celulosa y endopoligalacturonasa para facilitar la penetración de la raíz (Dinesh y Prateeksha 2015).

Por otra parte, los resultados con el tratamiento *T. hamatum* el cual fue el mejor en la variedad Williams no tuvo igual adherencia en variedad de banano Francés, lo que sugiere que la variedad tiene influencia en la adherencia de especies de *Trichoderma*, siendo *T. parareesei* la especie de hongo que tuvo mayor adherencia en la variedad Francés. Al respecto Badri et al., (2009) indican que la composición de exudados de las raíces varía con el tipo de cultivar o especie, y los estados de desarrollo y los factores ambientales, incluyendo el tipo de suelo, pH, temperatura y comunidades microbiales lo que pudo tener influencia en el resultado de éste estudio.

El menor efecto en ambas variedades fue presentado por el tratamiento mezcla, esto es posible debido a que este hongo tiene una excelente habilidad como competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie (Wardle et al., 1993), esta competencia también suele darse entre organismos de la misma especie, si no existen suficientes nutrientes en el sustrato las 5 especies de *Trichoderma* se disputaran el espacio y nutrientes para crecer.

En bráctea: De acuerdo al análisis de los datos reales de crecimiento endófito en brácteas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Datos reales de colonización endófito en bráctea, usados en la prueba de Kruskal Wallis.

TRATAMIENTOS (T)		VARIABLE RESPUESTA				
		Número brácteas con crecimiento endófito en plantas				
		B1	B2	B3	B4	B5
En variedad Williams						
<i>T.spirale</i>	(1)	1	1	0	1	0
<i>T.parareesei</i>	(2)	0	0	1	0	1
<i>T.andinense</i>	(3)	0	1	0	0	0
<i>T.longibrachiatum</i>	(4)	1	0	0	0	1
<i>T.hamatum</i>	(5)	1	1	1	0	0
Mezcla	(6)	1	1	0	1	1
Testigo	(7)	0	0	0	0	0
En variedad Francés						
<i>T.spirale</i>	(8)	0	1	1	1	1
<i>T.parareesei</i>	(9)	0	1	1	0	1
<i>T.andinense</i>	(10)	1	0	0	0	0
<i>T.longibrachiatum</i>	(11)	0	1	0	1	1
<i>T.hamatum</i>	(12)	0	0	1	0	1
Mezcla	(13)	0	1	1	1	1
Testigo	(14)	0	0	0	0	0

Con la prueba de Kruzkal Wallis se obtuvo que **H=** Chi cuadrada= **19.74**, $Pr > \text{Chi cuadrada} = 0.1017$. No existe diferencia de crecimiento endófito en brácteas de las diferentes especies de *Trichoderma* dependiendo de la variedad de banano debido a que $(pr > \text{Chi cuadrada}) > 0.05$. Lo que muestra que las brácteas no son sitios adecuados para la colonización ni difieren entre especies. Al respecto Zhang et al., (2014) al realizar estudios de inoculación de *Trichoderma harzianum* y *Beauveria bassiana* en raíz y semilla de cacao y banano confirmaron que la

colonización fue mayor en las partes subterráneas que en partes aéreas de ambas especies. Así mismo, este autor argumenta el hecho de que estos hongos son transmitidos por el suelo y pueden ser capaces de vivir y colonizar la rizosfera, aumentando así la reinfección en las raíces. Por otro lado, Yuan et al., (2018) mencionan que el desarrollo de la comunidad microbiana de la rizosfera está altamente correlacionado con los exudados de la raíz de la planta huésped, de esta manera las comunidades microbianas que viven en la rizosfera son determinadas por las raíces de la planta huésped y la comunidad microbiana existente en el suelo.

6.2 Identificación de especies de *Trichoderma* de raíces de banano inoculadas en mezcla

Los resultados de la amplificación de ADN permitieron la secuenciación de 650 bp (figura 8). El diagrama de árbol obtenido mostró una menor distancia genética entre la mezcla aplicada para banano francés (MF) con las especies *T. andinense*, *T. hamatum*, *T. spirale* y *T. parareesei*; mientras que existió una mayor distancia genética entre la mezcla aplicada a banano Williams (MW) con las especies *T. andinense*, *T. hamatum*, *T. spirale* y *T. parareesei* (Figura 7).

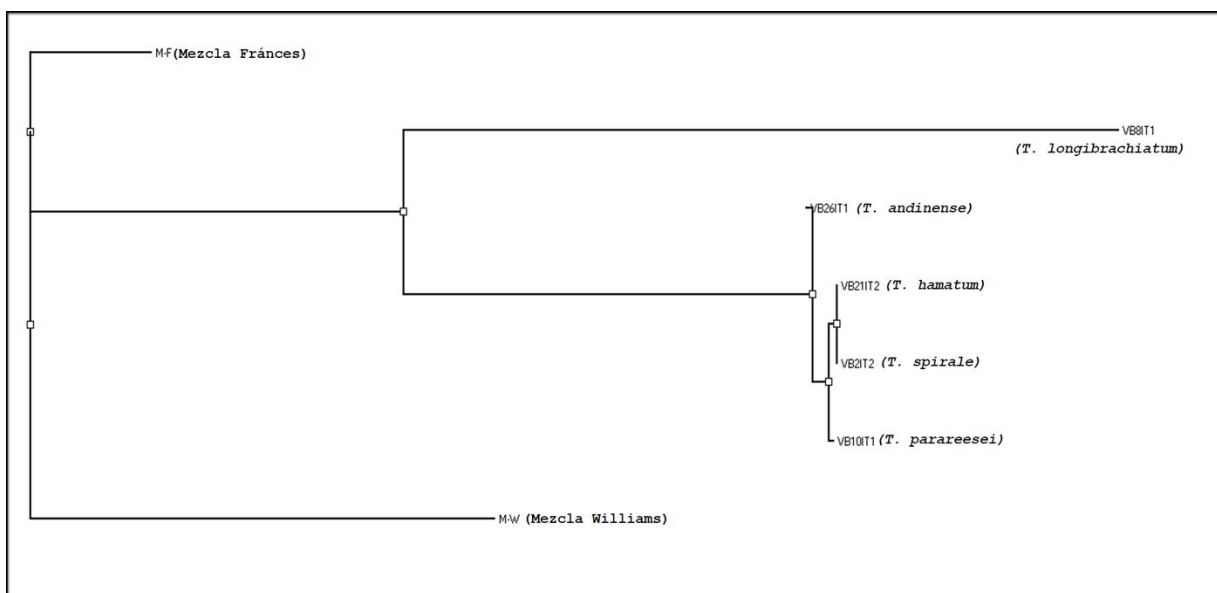


Figura 7. Análisis de especies de *Trichoderma* incluidas en los tratamientos y comparadas con la mezcla usada en banano francés y Williams. El árbol filogenético fue generado con el método Neighbor-joining utilizando el programa Mega versión 3.6 (Tamura et al., 2011).

Sin embargo, al observar la alineación de todas las secuencias de las especies probadas se puede observar que en el sitio 440 bp existe una similitud entre *T. andinense* con las mezclas probada en banano (MF) y en el sitio 550 bp existe una similitud entre *T. pararesei* con las mezclas probada en banano Francés y Williams (Figura 8), lo que sugiere la colonización endófitas de estas dos especies al inocularlas como mezcla de varias especies de *Trichoderma*. De acuerdo a Stefanova et al. (1999) se puede dar una competencia por nutrientes como puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos) y microelementos lo que no permiten que proliferen distintas especies a la vez, por lo es posible que

en este estudio sólo se desarrollaron aquellas que tuvieron efecto dominante sobre las demás.

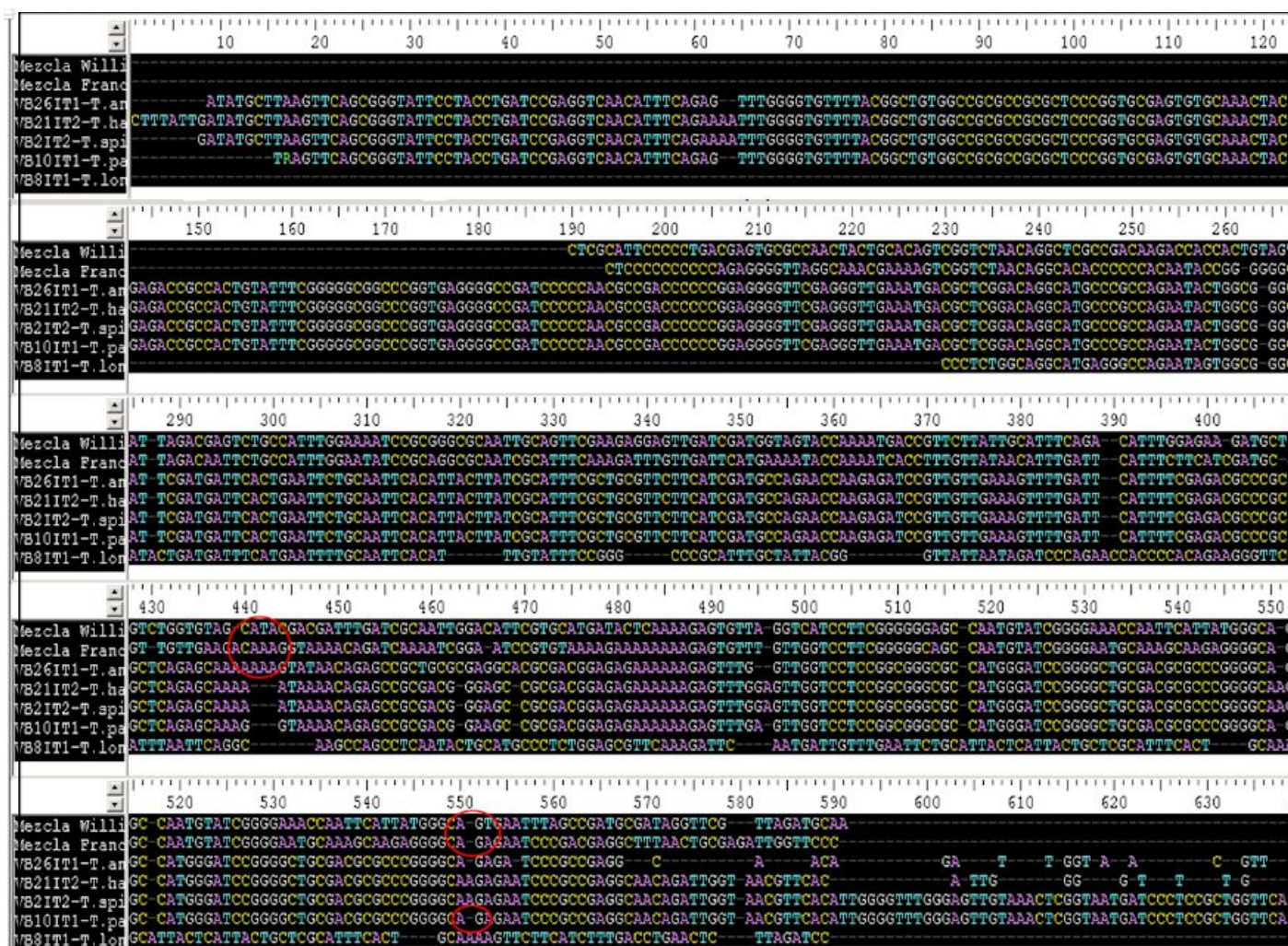


Figura 8. Comparación de las secuencias de ADN de las especies de T utilizadas como tratamientos y las secuencias pertenecientes a la m. Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit versión 7.1.9 (Ha

6.3. Relación entre colonización endófitas, peso, elongación y diámetro en raíz de banano

Aunque en las dos variedades probadas se observó crecimiento endófito en mayor o menor medida de todas las especies de *Trichoderma*, no se observó una relación entre la colonización de la raíz de las unidades experimentales con cada uno de los tratamientos y las variables respuesta peso de planta, longitud y diámetro de raíz en las plantas que sobrevivieron (Cuadro 13), como es el caso de plantas de la variedad Francés al ser inoculadas con *T. andinense* (Tratamiento 3).

Cuadro 10. Relación entre colonización endófitas de *T. andinense* y peso de planta, longitud y diámetro en raíz.

	Colonización endófitas en raíz (%)	Peso de planta(gr)	Longitud de raíz(cm)	Diámetro de raíz (cm)
Colonización endófitas en raíz (%)	1.00000	-0.08575	-0.08575	0.77174
	0.8910	0.8910	0.1263	
Peso de raíz (gr)	-0.08575	1.00000	1.00000	-0.25000
	0.8910	<.0001	0.6850	
Longitud de raíz (cm)	-0.08575	1.00000	1.00000	-0.25000
	0.8910	<.0001	0.6850	
Diámetro de raíz (cm)	0.77174	-0.25000	-0.25000	1.00000
	0.1263	0.6850	0.6850	

Hilera superior de datos numéricos= r_{xy}

Esto es posible debido a que *T. andinense* se encuentra más asociado a suelo cultivado con plátano y no asociado directamente a raíz de plantas de plátano (Hernández et al.,

2019). Sin embargo, se observó una correlación superior a 0.75 (aceptable) entre la colonización y el diámetro de la raíz principal (Cuadro 10), donde el coeficiente de correlación r_{xy} es $\neq 0$ si $(\text{prob} > |R|) < \alpha$, donde $\alpha = 0.05$ (95 % de confiabilidad), esto a pesar de que no se ha reportado un efecto sobre esta variable con esta especie de hongo, pero siendo común en especies como *T. harzianum* (Ozbay y Newman, 2004).

6.4. Relación entre mortalidad de plantas de banano y colonización endófitica de *Trichoderma* en raíz

Se presentó una alta tasa de mortalidad de plantas de ambas variedades (Cuadro 11).

Cuadro 11. Datos reales de crecimiento endófito en raíz, mortalidad de plantas y comparación de media de los rangos ajustados obtenidos con Kruskal Wallis.

Tratamientos (T)		Variable respuesta		Media de los rangos ajustados	
		RCCE/T	PM/T	CER	PM/T
En variedad Williams		Promedio			
<i>T.spirale</i>	(1)	7.4	5	32.40	38.0
<i>T.parareesei</i>	(2)	7.4	5	32.40	38.0
<i>T.andinense</i>	(3)	2.4	5	43.50	38.0
<i>T.longibrachiatum</i>	(4)	2.4	5	41.20	38.0
<i>T.hamatum</i>	(5)	2.8	5	56.00	38.0
Mezcla	(6)	1.2	5	24.30	38.0
Testigo	(7)	0	4	7.50	31.0
En variedad Francés		Promedio			
<i>T.spirale</i>	(8)	2.2	5	39.30	38.0
<i>T.parareesei</i>	(9)	2.4	5	43.50	38.0
<i>T.andinense</i>	(10)	1.2	2	24.90	17.0

CONTINUACIÓN CUADRO 11		2.0	5	37.30	38.0
<i>T. longibrachiatum</i>	(11)				
<i>T. hamatum</i>	(12)	1.8	5	34.20	38.0
Mezcla	(13)	0.4	5	12.50	38.0
Testigo	(14)	0	4	7.50	31.0

RCCE= Promedio de raíces con crecimiento endófito/tratamiento, PM/T= Plantas muertas/tratamiento, CER=Crecimiento endófito en raíz. Coef. var=27.52

Así mismo el análisis de suma de rangos de los tratamientos (Cuadro 11) indicó que al menos uno de ellos tuvo efecto diferente sobre la mortalidad de plantas $H = \text{Chi cuadrada} = 27.3877$, $\text{Pr} > \text{Chi cuadrada} = 0.0110$ y $(\text{pr} > \text{Chi cuadrada}) < 0.05$. Este efecto fue observado en el tratamiento 10 (*T. andinense*) en banano Francés ($\text{pr} > |T| < 0.05$ en el i -ésimo tratamiento $\neq$ al j -ésimo tratamiento (Cuadro 12), mostrando una menor mortalidad sobre esta variedad de plantas. Sin embargo, el estudio de correlación indicó que dicha mortalidad no está relacionada con los tratamientos ($R^2 = 0.0432$) (Figura 9).

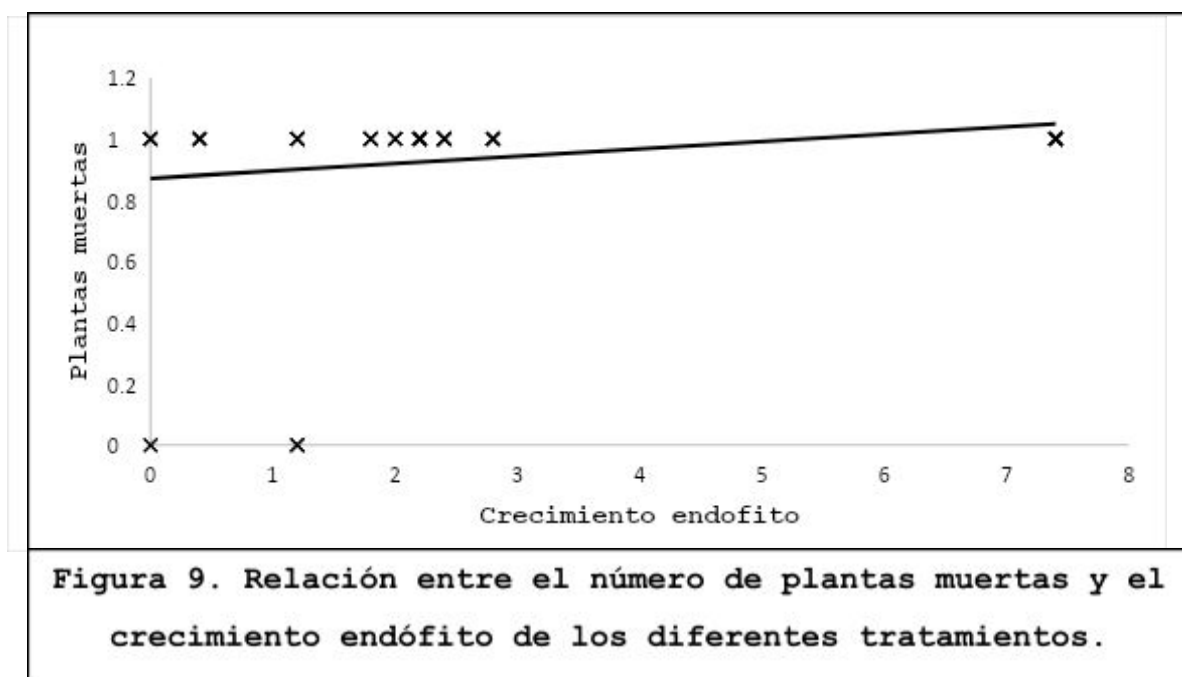


Figura 9. Relación entre el número de plantas muertas y el crecimiento endófito de los diferentes tratamientos.

	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0998.	1.0000	1.0000	<.0001	1.0000
1.0000	1.0000										

Los valores en negrita son < 0.05 , establecido para una confiabilidad del 95%.

VII. CONCLUSIONES

Todas las especies de *Trichoderma* probadas en este estudio tienen la capacidad de crecimiento endófito en raíz, ya que se observó colonización de todas las especies inoculadas tanto en la variedad William como en la variedad Francés, e incluso en tejidos de plantas inoculados con una mezcla de las 5 especies.

El tipo y grado de colonización en raíz se vio influenciado por la especie de *Trichoderma* y la variedad de banano ya que *T. hamatum* fue el mejor tratamiento en colonización endófito en la variedad Williams. Mientras que para la variedad Francés fue *T. parareesei* la que presentó mayor colonización.

La competencia por espacio y recursos nutricionales entre cepas de *Trichoderma* disminuye la capacidad de colonización en raíz, por lo que se observa que *T. andinense* y *T. parareesei* son cepas dominantes en la mezcla inoculada en banano Francés, mientras *T. parareesei* es la cepa dominante en la mezcla inoculada en banano Williams.

La colonización fue más efectivo en raíz que en brácteas posiblemente porque la raíz y el suelo proveen de los elementos necesarios que necesita esta especie para poder desarrollarse.

Solo *T. andinense* mostró una correlación significativa entre la colonización y el diámetro de raíz de banano, el peso de planta y la longitud de raíz, mas no se observó que la colonización endófito tuviera relación con la mortalidad de plantas de banano que se presentó en este estudio.

VIII. LITERATURA CITADA

- Badri DV, Quintana, N., El Kassis EG, Kim HK, Choi YH and A. Sugiyama. 2009. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. *Plant Physiol.* 151(4):2006-2017.
- Bae, H., Sicher, C.R., Kim, S.M., Kim, S.H., Strem, D.M., Melnick L.R. and B. Bailey. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany.* 60(11): 3279-3295.
- Calvet, C., Pera, J. and J.M. Barea. 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta*) to inoculation with *Glomus mossae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil.* 148: 1-6.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutierrez, A., Chet, I. and E. Herrera. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol.* 65(3): 929-935.
- Castro, R., Pesantez, M., Flores, V., Diaz, C., Castro, L. y Y. Alvarado-Capo. 2015. Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista Protección vegetal.* 30(2):133-138.

- Chet, I. and J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 48: 37-43.
- Chet, I. and S.H. Benhamou S.H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Edición de Gary E. Harman y Christian P. Kubicek. Londres, Reino Unido.
- Cobos, C.G.C. 2010. Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma spp.* para el control de sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* m.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio. Escuela politécnica del ejército departamento de ciencias de la vida carrera de ingeniería en ciencias agropecuarias santo domingo. Santo Domingo, Ecuador.
- Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). 2018. Portal de geoinformación: Sistema nacional de información sobre biodiversidad. Consultado el 27 de Septiembre del 2019, en línea bajo la dirección: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>.
- Contreras H.A., Macías R.L. Cortes P.C. and J. López. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. *Plant Physiol*. 149: 1579-1592.

- De Weger, L.A., Van Arendonk, J.J.C.N., Recourt, K., Van Der Hofstad, G.A.J.M., Weisbeek, P.J., and B. Lutenberg. 1988. Siderophore-Mediated Uptake of Fe^{3+} by the Plant Growth-Stimulating *Pseudomonas putida* Strain WCS358 and by Other Rhizosphere Microorganisms. *Journal of Bacteriology*. 170(10): 4693-4698.
- Dinesh, R. and M. Prateeksha. 2015. A review on interactions of *Trichoderma* with plants and pathogens. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 3(2):20-23.
- Evaleight, D.E., Demian, A.L. and N. Solomon. 1986. Biology of industrial microorganisms. 1986. *Biotech Ser.* (Ed). Cap.16: 489-500.
- Feng, C., Wei, C., Zhong, W., Guan, P., Ruixia, L., Wei, R. and Q. Shen. 2015. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant and Soil*. 388(1-2):337-350.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*: 41(1):95-98.
- Haram, S., Schickler, H.L. and I. Chet. 1996. Molecular mechanisms of lictin enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*. 142: 2321-2331.

- Harman, G. 2000. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Disease.84:377-393.
- Harman, G. 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum*. Deuteromycetes: Moniliales. Consultado el 25 de Noviembre de 2019, en línea bajo la dirección: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>.
- Hernández, D.C., Vázquez, B.J.A., Vázquez, M.F., Berdeja, A.R., Morales, F.S.D. and D. Reyes, L. 2019. Abundance and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma* sp. in muse AAB. Revista Mexicana Ciencias Agrícolas. 10(8): 1783- 1796.
- Hjeljord L. and A. Tronsmo. 1998. *Trichoderma* and *gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma&Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. 2: 131-151.
- Infante, D., Martinez, B., Gonzales, N. y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista Protección vegetal. 24(1):14-21.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009. Prontuario de Información Geográfica de los Estados Unidos Mexicanos: Teziután, Puebla. Consultado el 27 de Septiembre del 2019, en línea bajo la dirección: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21174.pdf.

- Kavino, M., Harrish, S., Kumar, N. and R. Samiyappan. 2009. Rizobacteria-mediated growth promotion of banana leads to protection against banana bunchy top virus under field conditions. *Acta Horticulturae* 828:69-76.
- Lassoudiere, A. 2010. Le bananier: taxonomie, évolution, dispersion: Origine des Musacées. *In: L'histoire du bananier*, Editions Quae, France.
- Lugtenberg B.J. and L.C. Dekkers. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environ Microbiol.* 1(1): 9-13.
- Martínez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. and A. Godeas. 2004. Interactions between *Trichodermapseudokoningiis* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigasporarosea*. *Mycorrhiza*. 14(2):79 - 84.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2017. Situación del Mercado del banano 2015-2016. Consultado el 27 de Septiembre del 2019, en línea bajo la direccion: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/es/>.
- Ozbay, N. and S. E. Newman. 2004. Effect of *Trichoderma harzianum* strains to colonize tomato roots and improve transplant growth. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7(2): 253-257.

- Pavone, M. D. y B. Dorta. 2015. Diversidad del hongo *Trichodermaspp.* en plantaciones de maíz de Venezuela. *Interciencia*. 40(1):23-31.
- Pérez N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 p.
- Pocasangre, L., Sikora R.A., Vilich, V. and R.P. Schuster. 2000 Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholussimilis*). *Acta horticulturae*. 9(531):3-5.
- Robinson, J. y V. Galán. 2011. Plagas: Papel de hongos y bacterias endofitos en el control de las plagas y enfermedades del banano. In: Plátanos y Bananas. Ediciones Mundi-Prensa, España. pp. 265-267.
- Rodríguez, I. 1990. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana.
- Samolski, I., Rincon A.M., Pinzon L.M., Viterbo A., and E. Monte. (2012). The Qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization, *Microbiology*. 158: 129-138.
- Shoresh, M., Harman, G.E. and F. Mastouri. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal

biocontrol agents. Annual Reviews of Phytopathology. 48: 21-43.

Sikora, R.A., Pocasangre, L., Zum Felde, A., Niere, B., Vu, T.T. and A.A. Dababat. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. Biological Control. 46(1):15-23.

Simmonds, N.W. 1973. Los plátanos. Colección agricultura tropical. Editorial Blume. Barcelona, España.

Stefanova, M., Leiva, A., Larriganaga, L., y M.F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. Para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía. Universidad de Zulia. Volumen 16, Número 5. Septiembre-Octubre, 509-516.

Tamura, K., Paterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 28(10): 2731-2739.

Ulloa, C.J. 1996. Enzimas miolíticas producidas por agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*. En: Actas del simposio sobre control biológico. Foz de Iguaçu-Parana-Brasil. pp 234-238.

Villegas, M.A. 2005. *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura

sostenible. OriusBiotech USA. Consultado el 27 de noviembre de 2019, en línea bajo la dirección: https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible.

- Wardle, D.A., Parkinson, D. and J.E. Waller. 1993. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Ecology* 94: 165-17.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor J.W., Innis, M.A., Gelfand, D.H. and J. Sninsky. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. London. pp. 315-322.
- Xia, X., Lie, T.K., Quian X., Zheng, Z., Huang, Y. and Y. Shen. 2010. Species Diversity, Dystrubution, and Genetic Structure of Endophytic and Epiphytic *Trichoderma* Associated with Banana Roots. *Microbial Ecology*. 61:619-625.
- Yuan, J., Raza, W. and Q. Shen. 2018. "Root Exudates Dominate the Colonization of Pathogen and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria" in B. Giri et al. (eds.), *Root Biology, Soil Biology* 52. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018.
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q. and R. Zhang. 2014. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation

and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant Soil*. 374:689-700.

Zum Felde, A., Pocasangre, L. and R.A. Sikora. 2005. The potential use of microbial communities inside suppressive banana plants for banana root protection. *In*: Turner DW, Rosales FE (ed) *Banana root system: Towards a better understanding for its productive management*, proceedings of an international symposium held in San Jose, Costa Rica. pp: 169-177.

Zum Felde, A., Pocasangre, L., Carñizares, C., Sikora, R.A., Rosales, F. and A.S. Riveros. 2006. Effects of combined inoculations of endophytic fungus on biocontrol of the burrowing nematode (*Radopholussimilis*) in banana. *InfoMusa*. 15(1-2):12-18.

IX. ANEXOS

1. Preparación medio de cultivo papa dextrosa agar

En un matraz Erlenmeyer agregar 1 litro el agua des-ionizada y calentar en un agitador termo-magnético. Cuando el agua este caliente agregar 39 gramos de agar de papa dextrosa y disolver hasta que no queden grumos, hervir durante 1 minuto. Esterilizar a una presión de 15 lb/in² por 15 minutos. Vaciar 15 mililitros en cada Placa de Petri y sellar con cinta parafilm para evitar contaminación y entrada de aire. Almacenar a 4°C.

2. Metodología de la cámara de Neubauer

Para preparar el Tween 80 Al 0.03%, en un frasco de laboratorio con tapa, agregar 250 mililitros de agua des-ionizada y agregar 75 microlitros (μL) de Tween 80. Esterilizar a una presión de 15 lb/in² por 15 minutos. Almacenar cerrado a temperatura ambiente.

Raspar con una espátula los cultivos de hongo con 5 días de crecimiento y se retira la espora, colocar en un vial estéril 5 mililitros (ml) de Tween 80 a 0.03 %. Agitar la suspensión de esporas en un vortex durante 5 minutos.

Agitar la suspensión de esporas en un vortex durante 1 minuto. Colocar un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, de la suspensión de conidios se toma 10 microlitros (μL) y colocan en la cuadrícula, dejar reposar por dos minutos para estabilizar el movimiento de los conidios. La muestra cargada se visualiza en el microscopio compuesto utilizando el aumento 40X, se cuentan las esporas

Para realizar el cálculo de las concentraciones, obtenido el promedio de cada una de la suspensión de esporas, se aplica las siguientes formulas:

Fórmula para calcular el número de esporas por mililitro

$$\text{Numero de esporas/mL} = (\text{Promedio de esporas}) (1 \times 10^4)$$

Fórmula para calcular el volumen

$$\text{Volumen a disolver} = (1 \times 10^4 \cdot \text{Volumen requerido}) / \text{Numero de esporas por mL.}$$

Por último tenemos que agregar el Volumen a disolver (V) en el volumen requerido.

3. Protocolo de extracción de ADN (QUIAGEN modificado).

1. En un tubo para microcentrífuga de 1500 µL pulverizar con nitrógeno líquido la muestra y se macera con micro pistilo.
2. Añadir 400 µL de Buffer AP1, 4 µL de RNasa A y 6 µL de β-Mercaptoetanol.
3. Agitar 30 segundos e incubar por 10 minutos a 6°C, agitar 2-3 veces durante la incubación.
4. Agregar 20 µL de proteínasa K.
5. incubar a 65°C durante 60 minutos, agitar cada 15 minutos.
6. Añadir 130 µL de Buffer P3. Incubar en hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo con filtro (QIAshredder mini Spin Column).
9. Centrifugar por 2 minutos a 14,000 rpm.
10. Desechar el filtro y transferir el líquido a un nuevo tubo, añadir 1.5 volúmenes de Buffer AW1, mezclar por pipeteo.
11. Transferir 650 µL a un tubo con filtro (DNeasy Mini Spin Column), centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm y descartar el líquido. Repetir hasta que todo el líquido sea filtrado.
12. Agregar 500 µL de Buffer AW2 y centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm, descartar el líquido. Transferir el filtro a un nuevo tubo.
13. Añadir 25 µL de Buffer AE. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm.
14. Repetir el paso 13.
15. Descartar el filtro y cerrar el tubo. Almacenar a 4°C.

4. Protocolo de electroforesis horizontal.

1. En un matraz Erlenmeyer agregar 80 mL de Buffer TAE 1X y 1.2 gramos de Agarosa LE de grado analítico y disolver. Agregar 10 μ L de bromuro de etidio.
2. Dejar solidificar con los peines puestos. Colocar en la cámara de Electroforesis, agregar Buffer TAE 1X.
3. En los pocillos agregar 3 μ L de tinte y 7 μ L ADN si es para evaluar calidad de ADN. Para ADN amplificado agregar 3 μ L de tinte y 3 μ L ADN.
4. En el último pocillo agregar 5 μ L de marcador de peso molecular.
5. Dejar correr a 80 voltios durante 30 minutos y visualizar en un transiluminador UV.

5. Cálculos de concentraciones para amplificación.

Para obtener la concentración dese realiza la siguiente operación:

$$C1.V1=C2.V2$$

Despejando:

$$V1=C2.V2/C1$$

Dónde, C1 es concentración inicial, V1 es volumen requerido, C2 es concentración deseada y V2 es volumen final deseado.

Para obtener Trehalosa al 10%:

$$V1= (10\%.20\mu\text{L})/100\%$$

$$V1= 2 \mu\text{L}$$

Para obtener la concentración de los primers:

Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, agregar 369 μL de Buffer TE al primer ITS1 y 353 μL al primer ITS2. Agitar en vortex por 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. En un tubo agregar 50 μL del primer y 450 μL de TE.

Primer ITS1

$$V1= (10\text{mM}.20\mu\text{L})/100\%$$

$$V1= 2 \mu\text{L}$$

Primer ITS2

$$V1= (10\text{mM}.20\mu\text{L})/100\%$$

$$V1= 2 \mu\text{L}$$