



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

**MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE HIGO E INOCULACIÓN CON *Trichoderma sp***

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA**

**PRESENTA**

**MARIBEL HERNÁNDEZ LORENZO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES**

**San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Junio de 2023**



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

**MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE HIGO E INOCULACIÓN CON *Trichoderma sp***

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA**

**PRESENTA**

**MARIBEL HERNÁNDEZ LORENZO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES**

**ASESORES**

**DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ**

**DR. DELFINO REYES LOPEZ**

**M.C. FABIEL VÁZQUEZ CRUZ**

**San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Junio de 2023.**

La presente tesis titulada: Multiplicación *in vitro* de higo e Inoculación con *Trichoderma* sp realizada por Maribel Hernández Lorenzo, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Consejo Particular integrado por:

Firma

Director: Dr. Luis Antonio Domínguez Perales

\_\_\_\_\_

Asesor: Dra. Carmela Hernández Domínguez

\_\_\_\_\_

Asesor: Dr. Delfino Reyes López

\_\_\_\_\_

Asesor: M.C. Fabiel Vázquez Cruz

\_\_\_\_\_

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Junio 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**. Dicho trabajo, fue financiado por el **Programa para el Desarrollo Profesional Docente, tipo superior, ejercicio fiscal 2021; Apoyo para el Fortalecimiento de los Cuerpos Académicos**.

## **DEDICATORIA**

Gracias Dios por estar conmigo y guiarme en buen camino, por estar presente en mi mente y corazón, me has enseñado mucho y aun sigo aprendiendo. Estoy agradecida con la vida que me ofreciste, por permitirme soñar, experimentar y mostrarme que cada etapa es transitoria y que todo se basa en el amor.

Se la dedico a mis padres Dionicio Hernández y Trinidad Lorenzo por apoyarme en mis días felices y tristes, por darme esperanza y fe en el camino y enseñarme el verdadero valor de la vida. Gracias por guiarme siempre y ser siempre mi motivación. Los amo mucho.

A ti hermana Marilu por ser mi ejemplo a seguir y brindarme tu amor, apoyo, sinceridad y amistad. A mis hermanas: Caro, Lety, Tere y Soky, por brindarme palabras de aliento, apoyarme cuando lo necesite, a escucharme y ser tan importantes en mi vida, he compartido tantas cosas lindas con todas, gracias por estar conmigo y no dejarme sola.

A Isac por permitirme compartir contigo experiencias lindas y amor en cada momento, eres el mejor compañero y amigo que pude encontrar. Gracias.

A todas aquellas personas que compartieron y estuvieron conmigo, aprendí cosas muy importantes y valiosas de ello(a)s, amigos los recordaré siempre. Y estoy agradecida con todos mis maestros que siempre estuvieron para brindarme sus experiencias y conocimientos, los recordaré siempre. Muchas gracias a todos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias por haberme dado la oportunidad, el apoyo y brindarme todo el conocimiento para crecer profesional y emocionalmente durante mi estadía universitaria. Me llevo grandiosas experiencias y buenos recuerdos.

Agradezco mucho a mi director de tesis, Dr. Luis Antonio por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación, así como también ofrecerme mucha paciencia y dedicación durante este período para que pudiera concluir, me llevo aprendizaje, conocimiento y constancia. Aprendí muchas cosas de usted, Gracias doctor.

Dra. Carmela gracias por haberme brindado su tiempo, ofrecido su paciencia y dedicación, gracias por todo el conocimiento que aprendí durante esta etapa. Lo recordaré, Gracias doctora.

Agradezco al Dr. Delfino y al M. C Fabiel por brindarme un poco de su tiempo y conocimiento durante mi estadía en la escuela. Me llevo de cada uno enseñanza y dedicación. Infinitamente Gracias.

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1    Objetivo general.....	3
2.2    Objetivos específicos.....	3
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>4</b>
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
4.1    Importancia económica.....	5
4.1.1    Importancia económica mundial.....	5
4.1.2    Importancia económica nacional.....	5
4.2    Descripción morfológica.....	5
4.3    Propagación asexual.....	6
4.3.1    Propagación por estacas.....	6
4.3.2    Propagación por acodos.....	6
4.4    Cultivos de tejido o propagación <i>in vitro</i> .....	6
4.4.1    Morfogénesis u organogénesis.....	7
4.5    Fases de la propagación <i>in vitro</i> .....	7
4.5.1    Manejo de 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	Reguladores de crecimiento .....	8
4.6.1	Auxinas .....	8
4.6.2	Giberelinas.....	9
4.6.3	Citocininas.....	9
4.7	Propagación de higo .....	9
4.7.1	Propagación de higo por estacas.....	9
4.7.2	Propagación <i>in vitro</i> de higo.....	9
4.8	Generalidades de <i>Trichoderma</i> sp. ....	10
4.9	Importancia de <i>Trichoderma</i> como agente de biocontrol .....	10
4.9.1	Uso de <i>Trichoderma</i> en cultivos.....	11
4.10	Enfermedades del higo.....	12
4.10.1	Roya.....	12
4.10.2	Negrilla de la higuera.....	12
4.10.3	Podredumbre radicular .....	12
4.10.4	Virus del mosaico .....	12
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
5.1	Localización del experimento .....	14
5.2	Material vegetal.....	14
5.3	Medio de cultivo.....	14
5.4	Etapas 1. Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de higo .....	14
5.4.1	Colecta .....	14
5.4.2	Lavado .....	14
5.4.3	Desinfección.....	15
5.4.4	Establecimiento o implantación .....	15
5.5	Etapas 2. Multiplicación.....	15

5.5.6	Diseño experimental .....	16
5.6	Etapa 3. Enraizamiento .....	16
5.7	Inoculación de especies de <i>Trichoderma</i> en raíces de vitroplantas de higo.....	16
5.8	Etapa 4. Aclimatación.....	17
5.9	Análisis de raíz para la detección de crecimiento de <i>Trichoderma</i> .....	17
5.10	Análisis estadístico .....	17
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
6.1	Etapa de establecimiento <i>in vitro</i> .....	18
6.2	Etapa de multiplicación <i>in vitro</i> .....	20
6.3	Inducción de peso y longitud en vitroplantas de higo inoculadas con <i>Trichoderma</i> .....	23
6.4	Endofitismo de <i>Trichoderma</i> en vitroplantas de higo de la variedad Brown Turkey.....	25
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>29</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA. ....</b>	<b>30</b>

## ÍDICE DE FIGURAS

Contenido	página
<b>Figura 1.</b> Porcentajes de contaminación fúngica, bacteriana y de explantes sanos de higo de la variedad ‘Brown Turkey’ a partir de ocho siembras.....	18
<b>Figura 2.</b> Porcentajes de oxidación del explante de higo variedad ‘Brown Turkey’ en la etapa de establecimiento a partir de ocho siembras realizadas.....	19
<b>Figura 3.</b> Porcentajes de oxidación del explante de higo variedad ‘Brown Turkey’ en la etapa de establecimiento a partir de ocho siembras realizadas.....	20
<b>Figura 4.</b> Aspecto de la plantas <i>in vitro</i> de <i>Ficus carica</i> L. producidas bajo los tratamientos a) <i>T reesei</i> , b) Testigo c) <i>T harzianum</i> , c) <i>T longibrachatum</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> Representación de crecimiento de <i>Trichoderma</i> , en el exterior de la raíz en <i>Ficus carica</i> L, variedad Brown Turkey durante 60 días de aclimatación. A) PIII5= Ausencia de <i>Trichoderma</i> B) Presencia de <i>Trichoderma</i> en raíz, C) Presencia de <i>Fusarium</i> sp. ....	26
<b>Figura 6.</b> Porcentajes de presencia o ausencia de <i>Trichoderma</i> en vitroplantas de higo ( <i>Ficus carica</i> L) de la variedad Brown Turkey obtenidas durante las inoculaciones durante 60 días. PIII5= <i>Trichoderma reesei</i> , OI5MO2= <i>Trichoderma harzianum</i> , OI3.2= <i>Trichoderma longibrachatum</i> .....	27

**ÍNDICE DE CUADROS**

---

<b>Contenido</b>	<b>página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Análisis de varianza de los tratamientos en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de brotes ( <i>Ficus carica</i> L.) de la variedad Brown Turkey.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de la concentración de BAP en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de higo ( <i>Ficus carica</i> L.) de la variedad Brown Turkey, evaluados 30 días después del establecimiento de los tratamientos.....	22
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de longitud de raíz y peso en vitroplantas de higo ( <i>Ficus carica</i> L.) variedad Brown Turkey inoculados con <i>Trichoderma</i> sp, evaluadas 60 días después de la aclimatación.....	24

---

## RESUMEN

La higuera (*Ficus carica* L) es uno de los frutos cultivados en México, sin embargo, la demanda y la presencia de enfermedades requieren el uso de genotipos más resistentes. La propagación *in vitro* es una alternativa viable para producir plantas de manera intensiva y libre de patógenos, siendo su desarrollo promovido por los reguladores de crecimiento como las citocininas. Por otro lado, una forma de promover el manejo integrado de enfermedades es alternar a *Trichoderma* sp en la propagación *in vitro* el cual es caracterizado por ser un hongo simbiote oportunista dando protección a la planta de agentes patógenos. El objetivo de este trabajo fue propagar vitroplantas de higo (*Ficus carica* L) variedad 'Brown Turkey' inoculadas con *Trichoderma* sp, durante la etapa de multiplicación se utilizaron brotes de 1.5 cm de longitud constituido de medio MS suplementado de sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, myo-inositol 10 mL L<sup>-1</sup>, vitaminas 1.0 mL L<sup>-1</sup> y diferentes concentraciones de BAP para los tratamientos (0, 25, 50 y 100 µmol) en un diseño completamente al azar, evaluando número de brotes longitud de brotes, número de nudo del brote inicial, longitud del brote inicial, coeficiente de multiplicación. Para la inoculación se utilizaron plantas de 8-10 cm de longitud y cuatro tratamientos (*T. reesei*, *T. harzianum*, *T. longibrachatum* y el testigo) analizados de manera nominal (presencia de colonización =1, Ausencia de colonización = 0). La adición de 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP en el medio de cultivo, tuvo mejor respuesta al aumentar el número de brotes (2.95) con respecto al testigo, así como un mayor coeficiente de multiplicación (6.48), en la inoculación no hubo efecto en los tratamientos, siendo optima *T. harzianum*.

**Palabras clave:** *Ficus carica* L, concentración, brotes, propagación, endofitismo.

## ABSTRACT

The fig (*Ficus carica* L.) is one of the fruits grown in Mexico, however, the demand and presence of diseases require the use of resistant genotypes. *In vitro* propagation is an alternative to produce plants intensively and free of pathogens, the developments of vitroplants is promoted by growth regulators like cytokinins. One way to promote the integrated disease management is to alternate *Trichoderma* sp with the in vitro propagation, this fungus is characterized by being an opportunistic symbiont giving the protection to the plant from pathogens. The objective of this research was to propagate vitroplant of variety 'Bronw Turkey' of fig inoculated with *Trichoderma* sp. Shoots of fig were obtained and put in Murashige and Skook media supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), myo-inositol (10 mL L<sup>-1</sup>), vitamins (1.0 mL L<sup>-1</sup>) and different concentrations of BAP were used for treatments (0, 25, 50 and 100 µmol) the statistical analysis was a completely randomized design. The varieties evaluated were shoots number, length of initial shoot, number of nodes of initial shoot, length of shoot, and multiplication coefficient. For inoculation, plants of 8 – 10 cm were used and established in four treatments (*T. reesei*, *T. brunneum*, *T. longibrachatum* and the witness). The addition of 1.0 de BAP in the media had a better response to increasing the number of shoot (2.95), as well as a higher multiplication coefficient (6.48). The inoculation doesn't have effect in the response of vitroplants. Being optimal *T. harzianum*.

**Key words:** *Ficus carica* L, concentrations, shoots, propagation, endophytism.

## I. INTRODUCCIÓN

La higuera (*Ficus carica* L) es uno de los frutales más antiguos y de los más cultivados en la cuenca del Mediterráneo (Valdés *et al.*, 2009), en México este cultivo se ha venido practicando desde la colonia como una especie marginal, de excelente valor nutricional para autoconsumo (Villalobos *et al.*, 2015).

México tiene potencial para convertirse en importante productor mundial, por la gran demanda que existe en los mercados extranjeros y de las favorables condiciones climáticas en el territorio mexicano, con una superficie cosechada de 12,010 y un rendimiento promedio de 6.5 ton ha<sup>-1</sup> (INTAGRI, 2020). El estado de Puebla es considerado como uno de los principales productores de higo en México con una superficie de 33.5 hectáreas (SADER, 2015), sin embargo, su producción anual registrada es baja, pudiéndose ver afectada por la presencia de enfermedades fúngicas que afectan a los cultivos y elevándose los costos de producción debido al incremento uso de fungicidas sintéticos, y que además generan problemas de resistencia, efectos tóxicos en la salud, en el ecosistema y representando un riesgo para la población de las zonas agrícolas (González-Soto *et al.*, 2017).

Aunque la producción podría aumentarse mediante el uso de nuevos genotipos que ofrezcan mayor diversidad en el mercado y un sistema adecuado de propagación como lo es el cultivo *in vitro*, el cual ha demostrado ser una alternativa para producir plantas libres de agentes patógenos en corto plazo, y cubrir la fuerte demanda de plantas que existen hoy en día.

Sin embargo, la producción *in vitro* está directamente relacionado por los reguladores de crecimiento vegetal que intervienen en el desarrollo de las plantas, las cuales son encargadas de regular una variedad de procesos en el crecimiento y desarrollo, no obstante, tener una distribución espacial y temporal adecuada de los reguladores induce en el progreso vegetativo como las citocininas que son capaces de inducir la proliferación y división celular aumentando la producción de brotes a nivel vegetal (Alcantara *et al.*, 2019). Pero recientemente se han comenzado a realizar investigaciones sobre los mecanismos moleculares por los cuales estas hormonas interactúan para producir un desarrollo específico (Ortiz-Sánchez *et al.* 2021), y como esto tiene un efecto en la reproducción vegetativa en las plantas de higo.

Una manera de promover el manejo integrado de enfermedades es alternar la producción *in vitro*, con el uso de *Trichoderma*, el cual es un género fúngico de la rizosfera considerado simbiote oportunista de plantas, que es capaz de producir elicitores que inducen la defensa vegetal contra patógenos e insectos, disminuyendo de esta manera el uso de agroquímicos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

Estudios realizados mencionan a *Trichoderma* como un agente potenciador exitoso de biocontrol, por su alta capacidad antagónica sobre patógenos fúngicos como *Fusarium* spp, *Alternaria* spp y *Helminthosporium* spp a nivel *in vitro* (López-Valenzuela *et al.*, 2022), asimismo induciendo a la promoción de crecimiento, la regulación positiva de los genes de resistencia a enfermedades, la resistencia sistémica inducida, la producción de compuestos volátiles orgánicos, el micoparasitismo y la competencia directa (Rees *et al.*, 2022).

Finalmente, es necesario establecer o modificar protocolos específicos de propagación *in vitro* adecuados para higo, y conocer el comportamiento de las vitroplantas de higo inoculadas con especies de *Trichoderma*.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Propagar vitroplantas de higo (*Ficus carica* L) inoculadas con *Trichoderma* sp.

### 2.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 6-benzilaminapurina sobre la proliferación de brotes *in vitro*.

Evaluar la inducción de peso y longitud de planta después de la inoculación de tres especies de *Trichoderma*.

Determinar la capacidad de endofitismo de tres especies de *Trichoderma* en vitroplantas de higo.

### **III. HIPÓTESIS**

El uso de reguladores de crecimiento favorece la morfogénesis de brotes de higo, y las vitroplantas generadas permiten el endofitismo de *Trichoderma* sp en su raíz al ser inoculadas con sus esporas.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Importancia económica

#### 4.1.1 Importancia económica mundial

El arraigo en el cultivo del higo se ha mantenido a lo largo de los siglos en los países de origen. En la actualidad los principales países productores se encuentran en la cuenca del Mediterráneo y se ha establecido con éxito en países distantes como EE. UU., Brasil, China, Sudáfrica, Japón y México. Para el año 2019 el cultivo de higo se reportó en 54 países alrededor del mundo, con una producción obtenida de 1,315,588 toneladas y una superficie cosechada de 289,818 hectáreas, con un rendimiento promedio mundial de 4.5 ton ha<sup>-1</sup> (INTAGRI, 2020).

#### 4.1.2 Importancia económica nacional

En México se cultivan cerca de 1 809 hectáreas a nivel nacional con una producción estimada de 11 896.31 toneladas en el 2020 (FAOSTAT, 2021). Los principales productores de higo son los estados de Morelos, Baja California Sur, Puebla e Hidalgo; siendo Morelos el principal productor con 58 por ciento del total (SADER, 2019).

Sin embargo, registraron 23 huertos de higo con una superficie de 63 hectáreas en Morelos y tres huertos en Puebla equivalentes a 33.5 hectáreas, siendo de gran importancia para el mercado de exportación de higo a Estados Unidos el cual puede impulsar el incremento de la superficie plantada de esos cultivos en México, asimismo puede generar un gran incremento de la tasa económica (SADER, 2015).

### 4.2 Descripción morfológica

El higo (*Ficus carica* L.) es un árbol de porte bajo, perteneciente a la familia de las Moráceas y al género *Ficus*, el cual pertenecen más de 600 especies, el tronco puede medir de 3 a 9 metros con un diámetro de 17.5 cm, donde se dispersan muchas ramas (Mendoza, 2019).

La higuera tiene un vigoroso sistema radicular, las raíces principales son abultadas y superficiales, que en condiciones favorables se encuentra cerca de la superficie entre 20 a 45 cm de profundidad, el tronco es corto y tiene tendencia a formarse como arbusto rastrero (Melgarejo, 1999), grueso y de madera frágil que al romperse exuda látex y se descompone fácilmente (Nievas *et al.*, 2021). Posee yemas axilares y terminales; tiende a formar hojas

grandes, de 10.0 a 20.0 cm, los cuales tienen un grosor de 4.0 a 8.0 mm, las flores se encuentran dentro del siconio que las engloba y encierra el cual tiene solo una salida llamada ostilo. Los verdaderos frutos se llaman aquenios, los cuales son duros y pequeños (1.0 mm; el fruto se encuentra dentro del receptáculo carnoso llamado siconio (Lucero, 2018).

### **4.3 Propagación asexual**

La propagación vegetativa, se define como la multiplicación de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano (raíces tallos, ramas, hojas) (Rojas *et al.*, 2004) conduciendo a la perpetuación de genotipos superiores con una gran ventaja en el mejoramiento genético obteniendo un número grande de individuos genéticamente idénticos (Hartman y Kester, 1997), la cual depende de las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes, sanidad) (Rojas *et al.*, 2004). Entre los métodos más utilizados se citan la reproducción por estacas y por acodos aéreos.

#### **4.3.1 Propagación por estacas**

La estaca es una porción separada de la planta, provista de yemas caulinares y hojas, e inducida a formar raíces y brotes a través de condiciones ambientales; con la finalidad de obtener nuevas plantas (Baldini, 1992). Por otro lado, no todas las partes vegetativas de la planta sirven para estacas, las de madera dura son aptas para enraizar, pero en cambio las de madera tierna tienen poca probabilidad de enraizar (Rojas *et al.*, 2004).

#### **4.3.2 Propagación por acodos**

El acodo es un método de propagación vegetativa en el que se induce la formación de raíces adventicias en la rama de la planta cuando aún permanece unida a la planta madre y una vez enraizado el brote, este es cortado de la planta madre, con la finalidad de desarrollarse sobre sus propias raíces, produciendo una nueva planta (Hartman y Kester, 1997).

### **4.4 Cultivos de tejido o propagación *in vitro***

El cultivo de tejidos está basado en la “totipotencia celular”, es decir, que una sola célula vegetal tiene la capacidad de dar origen al desarrollo de una planta completa, dando comienzo a la regeneración rápida y masiva de plantas exactas a la planta madre (clones), a partir de cualquier fragmento aislado de la planta (Pierik, 1990).

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

La morfogénesis se define como la formación o la génesis de órganos que está comprendida por el crecimiento y la diferenciación celular, sin embargo, en células o tejidos cultivados *in vitro* el proceso morfogenético puede inducirse porque las células vegetales bajo determinados estímulos son capaces de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo. (Gisbert, 2011). En la organogénesis el explante sigue una de las vías para dar origen a una planta, esta puede ser embriogénesis directa o indirecta, así como organogénesis directa o indirecta, la cual va a depender del tipo de explante (Rojas *et al.*, 2004).

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

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

El cultivo de tejidos se inicia con el empleo de pequeñas porciones u órganos de la planta denominados explantes. Estas plantas deben estar sanas, vigorosas y con una estabilidad climática, con el fin de que no se modifiquen los niveles de carbohidratos, proteínas y reguladores hormonales endógenos que puedan llegar a alterar los procesos *in vitro* (Perea, 2010). El explante es sometido a procedimientos de desinfección en la que se ocupan compuestos químicos tales como etanol al 70%, hipoclorito de cloro (NaOCl) del 1% al 3% o Twyn-20 en algunos casos, con la finalidad de eliminar todo residuo y agentes patógenos (Mroginsky y Roca, 1991) que puedan afectar la etapa de establecimiento.

#### **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 o quince días, comenzando el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

#### **4.5.3 Multiplicación**

En esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo (Castillo, 2004). A medida que el explante comienza a crecer y multiplicarse es subdividido (propágulo) que es cultivado individualmente en un nuevo medio, cuando este se multiplique y crezca será nuevamente subdividido, a esto se le llama subcultivo (Rojas *et al.*, 2004).

#### **4.5.4 Enraizamiento**

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines 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 desarrolladas *in vitro* son transferidas 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 Reguladores de crecimiento**

Se conocen como hormonas vegetales y son sustancias sintetizadas en un determinado lugar de la planta donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo vegetal (Perea, 2010). Estos reguladores son capaces de controlar toda la actividad metabólica en función de garantizar la homeostasis intracelular y extracelular. Las principales fitohormonas utilizadas en el crecimiento vegetal son las auxinas, giberelinas, citoquininas, entre otras (Alcántara-Cortes, 2019).

#### **4.6.1 Auxinas**

Las auxinas son hormonas vegetales, que intervienen en actividades de la planta como el crecimiento, dominancia apical, enraizamiento, la inhibición, la abscisión y en la activación de las células del cambium (Hartman y Kester, 1997), la regulación de la concentración hormonal endógena implica procesos metabólicos de biosíntesis, conjugación y oxidación (Azcon-Bieto y Talón, 2013).

Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indolacético (AIA) que es la principal auxina derivada de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (NAA) (Alcántara-Cortes *et al.*, 2019).

#### 4.6.2 Giberelinas

Las giberelinas son terpenos. Su síntesis se origina en todos los tejidos de los diferentes órganos y puede estar afectada por procesos internos de retroalimentación negativa o por factores externos como la luz, que según su duración lleva a la producción de giberelinas o de inhibidores del crecimiento. Su transporte ocurre vía xilema y vía floema (Perea, 2010).

#### 4.6.3 Citocininas

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que derivan de adeninas y promueven la división celular en tejidos no meristemáticos. También son producidas a partir de órganos en crecimiento y en el meristemo de la raíz (Perea, 2010). Se encuentran en forma natural y sintética, las conocidas son: zeatina, kinetina y benzilaminapurina (BAP) (Rojas *et al.*, 2004).

### 4.7 Propagación de higo

#### 4.7.1 Propagación de higo por estacas

La propagación de higo por estacas en cuatro variedades de higo según Juárez (2019), que para un buen enraizamiento se recomiendan estacas de 5 cm con 2 nudos a concentraciones entre los 500 a 1500 ppm de AIB, por lo que las diferencias entre variedades son debido a la sensibilidad del tejido de la concentración de la auxina, a pesar de ser de la misma especie.

#### 4.7.2 Propagación in vitro de higo

Según Hepaksoy y Aksoy (2006) para determinar las condiciones y los medios más adecuados para la propagación de tres clones de higos previamente seleccionados (*Ficus carica* L.) en el cultivo de tejidos, el medio adecuado en la etapa de multiplicación, es el medio Murashige y Skoog (MS) que contiene  $1 \text{ mg dm}^{-3}$  de ácido  $\alpha$ -indol-3-butírico (IBA),  $1 \text{ mg dm}^{-3}$  de ácido giberélico y  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  6-benciladenina fue la mejor en comparación con el medio MS complementado con IBA 1.2 y 2.5  $\mu\text{M}$  o ácido 1-naftaleno acético (NAA) teniendo mejor respuesta respecto al enraizamiento.

Por otro lado, el uso de 1- triacontanol a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  incrementa un mayor número de brotes en Black Mission, Kadota y Gomez, en agar a 2.8, 2.9 y 3.4 brotes por explante, mientras que a concentraciones de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  incrementa el número de brotes de “Netzahualcoyotl” a 4.2 brotes. Por lo que, el genotipo marca diferencias en la etapa de multiplicación (Juárez, 2019).

De acuerdo con Flores-Mora *et al.* (2009), en la etapa de multiplicación realizaron la separación de brotes desarrollados, empleando como medio base Murashige y Skoog (1962) completo, suplementado con 1,0; 0,5 y 0 mg<sup>-1</sup> de BAP, obteniéndose un promedio mayor de brotes por explante en el tratamiento con 1,0 mg<sup>-1</sup> de BAP. Mientras que, en la etapa de enraizamiento, se implementaron dos tratamientos, medio MS completo con 0,5 y 0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, obteniendo porcentajes mayores de enraizamiento en el tratamiento sin regulador. Finalmente, en la etapa de aclimatación, obtuvieron resultados de un 100 % de supervivencia.

#### **4.8 Generalidades de *Trichoderma* sp.**

El género *Trichoderma*, esta taxonómicamente ubicado dentro de la división Mycota, subdivisión Eumycota, clase Hyphomycetes, orden Moniliales y en la familia Moniliaceae (Druzhinina *et al.*, 2006). Estos hongos endófitos se distribuyen en una gran diversidad de suelos, madera y climas; los cuales son empleados como biocontroladores, actuando de manera positiva en el efecto antagónico con enfermedades como *Sclerotinia* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Fusarium* spp (Mukherjee *et al.*, 2012).

El control biológico es una estrategia que puede aumentar su efecto en combinación con otras estrategias. En este sentido, la aplicación preventiva de *T. harzianum* como controlador tiene potencial para su uso en programas de manejo integrado (Martinez *et al.*, 2022). Asimismo, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma inhamatum* presentan porcentajes de inhibición sobre los agentes patógenos, así como la producción de enzimas líticas (glucanasas y quitinasas) siendo importantes para la formulación de productos de control biológico e incorporación en sistemas de manejo integrado (Hernández-Morales *et al.*, 2021). De esta manera, el uso de microorganismos para el control de plagas y enfermedades es hoy en día una alternativa viable para lograr aumentos en el rendimientos, calidad en cultivos y reducir el impacto negativo de los agroquímicos en el medio ambiente (Companioni *et al.*, 2019).

#### **4.9 Importancia de *Trichoderma* como agente de biocontrol**

La agricultura de hoy en día enfrenta muchos retos, siendo una de las más importantes el poder alimentar la creciente población a través de una producción más sostenible y respetuosa con el medio ambiente, por lo que las inoculaciones o el uso de microorganismos tienen efectos positivos en aplicaciones en diversos cultivos, ofreciendo un efecto positivo en el

crecimiento vegetal. Este género es utilizado como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos debido a sus múltiples mecanismos de acción, destacando la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios (Poveda y Eugui, 2022; Hernández-Melchor *et al.*, 2019). *Trichoderma* es caracterizado por ser versátil, teniendo una alta adaptabilidad a las condiciones ambientales y la capacidad de establecer interacciones sofisticadas con otros microorganismos, una de las bondades que tiene *Trichoderma* es su capacidad de antagonismo hacia patógenos provocando respuestas de defensa en contra al estrés biótico/abiótico en las plantas, por lo que es utilizado en biopesticidas y biofertilizantes comerciales (Vicente *et al.*, 2022).

Además, se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos de acción, permitiendo tener un control a fitopatógenos, como la competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros, cuya acción puede ser más eficiente para el control de patógenos y así reducir significativamente el daño en el cultivo el cual lo ocasionan los plaguicidas químicos (Infante *et al.*, 2009).

#### 4.9.1 Uso de *Trichoderma* en cultivos

Según Rees *et al.* (2022) demostraron que *trichoderma spp.*, particularmente *T. brunneum*, puede usarse para proteger las plantas jóvenes de la muerte y el daño por ARR, causado por el patógeno agresivo *A.mellea*, y que estos hongos son capaces de proteger durante varios meses formando una asociación endofítica dentro de las raíces de las plantas de fresa. Barboza-García *et al.* (2022) mencionan que *Trichoderma viride* y *T. harzianum* presentan un efecto antagónico característico contra el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* causante de la marchitez radicular en plantaciones de aguacate; y una eficiencia en el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en raíces de plantas de tomate (Guedez *et al.*, 2012)

De igual manera, *trichoderma* forma colonizaciones eficientes en plántulas de cacao, así como también en la parte aérea, produciendo una relación endofítica contra enfermedades patógenas (Bailey *et al.*, 2008) como *Fusarium spp.* también forma un ambiente equilibrante con densidades en sustratos y raíces que oscilan entre los 2 y 2.5 log (UFC mL<sup>-1</sup>) obteniendo así una mayor capacidad de establecimiento en plántulas *Agave tequilana* entre otras especies (Tlapal *et al.*, 2014)

## **4.10 Enfermedades del higo**

### **4.10.1 Roya**

La roya (*Cerotelium fici*) es una enfermedad que afecta al higo. Los síntomas de la enfermedad aparecen en las hojas y en el fruto, estas esporas se dispersan o se agrupan alrededor del borde de la hoja, pero en algunos casos se encuentran en forma de gotas de rocío sobre la lámina de la hoja, son de color marrón rojizo pálido, circulares y llegan a medir 0.5 mm de diámetro, las plantas infectadas arrojan follaje prematuro y frutos inmaduros (McKenzie, 2014). *C. fici* está ampliamente distribuida en los trópicos y subtrópicos, causando defoliación y pérdida de los rendimientos (Verga y Nelson, 2014).

### **4.10.2 Negrilla de la higuera**

La enfermedad también conocida como fumagina es producida por diversos hongos capnodiáceos; el micelio de los hongos recubre la superficie aérea de todos los órganos de la planta imposibilitando el desarrollo normal de las funciones vegetativas (Domínguez, 1976). Esta enfermedad se asocia con presencia de insectos secretores de sustancias azucaradas que depositan sobre zonas de tallos, hojas y frutos, generando el favorecimiento del crecimiento del hongo (Tamayo, 2007).

### **4.10.3 Podredumbre radicular**

*Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Roesleria hipogea* destruyen el sistema radicular de las plantas atacadas. pudriéndolo, las cuales muestran un aspecto esponjoso y con raíces con aspecto ennegrecidas, con olor a moho; desprendimiento de la corteza con facilidad, observándose masas lanosas de color blanco, unidas unas con otras por cordones micelares denominados rizomorfos, los primeros con un color blanquecino y después pardos, que se entrecruzan bajo la corteza (Melgarejo, 1999).

### **4.10.4 Virus del mosaico**

La enfermedad del mosaico causada por el virus del mosaico del higo (FMV) es considerada la plaga del higo a nivel mundial (Shahmirzaie *et al.*, 2020). La incidencia de este virus en los cultivos comerciales afecta al desarrollo de los árboles, mermando, en mayor o menor medida, su rendimiento y rentabilidad (INFOAGRO, 2020). Por lo que su distribución se encuentra asociados en todo el mundo 12 virus, incluidos un agente causal

confirmado y tres viroides. Los síntomas incluyen clorosis foliar, deformación y patrones de mosaico (SIC, 2021).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Localización del experimento

El experimento se realizó en el laboratorio de propagación *in vitro* de la Facultad de Ciencias agrícolas y Pecuarias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla campus Teziutlán, con coordenadas geográficas en los paralelos 19° 47'06" y 19° 58' 12" latitud norte y 97° 18' 54" y 97° 23' 18" de longitud occidental a 1617 m.s.n.m.

### 5.2 Material vegetal

La primera etapa consistió en, establecer explantes de higo de plantas madre de las variedades: Brown Turkey que es una de las más cultivadas en México, estas se mantuvieron en condiciones óptimas de nutrición y sanidad mediante aplicaciones de fungicida (Bencimidazol), bactericida (sulfato de estreptomycin, oxitetraciclina) e insecticida.

### 5.3 Medio de cultivo

Se empleó es el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup>, myo-inositol 10 mL·L<sup>-1</sup>, tiamina mL·L<sup>-1</sup>, CA 0.5 g L<sup>-1</sup> y PVPP 0.25 g·L<sup>-1</sup>. El medio de cultivo se esterilizó 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 20 minutos.

### 5.4 Etapa 1. Establecimiento *in vitro* de explantes de higo

#### 5.4.1 Colecta

La colecta de explantes, se realizó a partir de yemas secundarias y ápices de crecimiento obtenidas de las plantas madre durante los meses de marzo a mayo, estas se cortaron con tijeras de podar y se sumergieron los explantes en una solución de polivinilpirrolidone (PVPP) al 5% previamente esterilizado, para evitar su oxidación.

#### 5.4.2 Lavado

Los explantes se colocaron en frascos y se realizó un lavado con agua y jabón biodegradable, agitándolo durante un lapso de 10 minutos, y posterior mente se enjuagaron con agua del grifo para eliminar restos del jabón.

Después se procedió a la aplicación de alcohol al 70% durante un minuto, seguido de un enjuague con agua estéril.

### **5.4.3 Desinfección**

La desinfección de los explantes se llevó a cabo dentro de una cabina de flujo laminar, con bicloruro de mercurio al 0.5% durante 10 minutos, después se realizaron enjuagues con la solución de PVPP (polivinilpirrolidone) al 5% para retirar el exceso de bicloruro de mercurio.

### **5.4.4 Establecimiento o implantación**

De acuerdo con la metodología de Castillo (2004) una vez realizada la desinfección se procedió a la siembra, que se realizó en tubos de manera individual, los cuales contenían 10 mL de medio de cultivo MS descrito anteriormente. Y fueron colocados en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Después de diez días de iniciar el cultivo *in vitro* se realizó la evaluación de manera visual para observar si existe contaminación de patógenos ya sean hongos o bacterias, así como la oxidación del medio de cultivo y el explante.

## **5.5 Etapa 2. Multiplicación**

Para evaluar el efecto de citocininas en la fase de multiplicación se utilizaron brotes de 1.5 cm de longitud ya establecidos *in vitro*. Los cuáles fueron transferidos a frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio sólido de multiplicación, constituido por medio basal MS suplementado con sacarosa  $30 \text{ g L}^{-1}$ , myo-inositol  $10 \text{ mL L}^{-1}$ , vitaminas  $1.0 \text{ mL L}^{-1}$  y diferentes concentraciones de BAP (0, 25, 50 y  $100 \mu\text{mol}$ ).

Los frascos de cultivo se colocaron en la cámara de incubación a  $26 \pm 2$  °C. Después de 30 días de iniciación de los experimentos se evaluó las siguientes variables:

### **5.5.1 Número de brotes**

Se contabilizó el número de brotes de manera visual.

### **5.5.2 Longitud de brotes.**

Con una hoja milimétrica se midió la longitud de cada brote (cm).

### **5.5.3 Número de nudo del brote inicial**

Se contabilizó el número de nudos a partir del primer nudo hasta la parte apical.

#### **5.5.4 Longitud del brote inicial**

Se midió con hoja milimétrica la longitud del brote principal o inicial (cm).

#### **5.5.5 Coeficiente de multiplicación**

El coeficiente de multiplicación se determinó de acuerdo con el número de brotes inicial/número de brote final.

#### **5.5.6 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, donde se evaluó: la concentración de citocinina. La unidad experimental consistió en un frasco con cinco brotes.

### **5.6 Etapa 3. Enraizamiento**

Para el enraizamiento se utilizaron brotes provenientes de la etapa de multiplicación de aproximadamente 1.5 cm de longitud.

Los cuáles fueron transferidos a frascos de cultivo que contendrán 25 mL de medio sólido de enraizamiento, constituido por medio basal MS suplementado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, mio-inositol 10 mL L<sup>-1</sup>, vitaminas 1.0 mL L<sup>-1</sup>. Los frascos de cultivo se colocaron en la cámara de incubación a 26 ± 2 °C. Después de 30 días de iniciados los experimentos se realizó la inoculación de raíces con *Trichoderma*.

### **5.7 Inoculación de especies de *Trichoderma* en raíces de vitroplantas de higo**

El hongo *Trichoderma* previamente almacenado se descongeló de -80 °C y se puso a crecer en medio PDA (Agar Dextrosa y Papa) a 30 °C por cinco días y se determinó la concentración (1 x 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) de cada tratamiento en una cámara de Neubauer de acuerdo con el procedimiento de Goettel y Douglas (1996).

En total cuatro tratamientos (*T. reesei*, *T. H.harzianum*, *T. longibrachatum*) y un testigo, de 20 mL de solución fueron colocados en vasos de precipitado de 100 mL de capacidad, posteriormente 7 plantas entre 8-10 cm de altura y con un peso a partir de 1 g, se distribuyeron de manera homogénea y fueron introducidos en cada tratamiento. Todas las plantas tratadas fueron sembradas en arena silica y se pasaron a la etapa de aclimatación.

## **5.8 Etapa 4. Aclimatación**

La aclimatación de las vitroplantas se realizó en bolsas de 10 x 20 cm, utilizando como sustrato arena sílica. Las cuales se colocaron en un sistema de riego por microaspersión y se dejaron en este ambiente por dos meses, posteriormente todas las plantas se sacaron de las macetas y su raíz fue lavada con Tween 80 al 0.05%, posteriormente la raíz de las plantas se cortó en 6 trozos de 0.5 cm con un bisturí, los cuales fueron lavados con hipoclorito de sodio al 1 % por un minuto y secados en papel sanitario estéril, posteriormente fueron colocados en una caja Petri repitiendo con medio ADS. En total 12 trozos de tejido vegetal de raíz por cada planta fueron repartidos en dos cajas Petri e incubados a  $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 72 horas y después de este tiempo se observó su crecimiento. Para la evaluación se contaron los trozos con presencia del hongo. Aquellos tejidos, en los que se observó crecimiento de *Trichoderma*, del tejido de la planta almacenada a temperatura de  $7^{\circ}\text{C}$  previamente se cortó la raíz para observar tejido interno y corroborar crecimiento de acuerdo con la metodología de Agrios (2002).

## **5.9 Análisis de raíz para la detección de crecimiento de *Trichoderma***

Las raíces fueron cortados en trozos de tres cm aproximadamente y lavados con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, enjuagados y secados, posteriormente se prosiguió a cortar transversalmente la raíz formando trozos de 0.5 cm. Algunos trozos fueron teñidos con azul de lactofenol, las cuales se observaron en el microscopio compuesto y electrónico para buscar hongos endófitos.

Para el establecimiento del experimento se utilizaron cuatro tratamientos (tres especies de *Trichoderma* y un testigo) para la variedad de higo (Brown Tuerkey), donde la unidad experimental fue una planta y 7 repeticiones. Los datos obtenidos fueron obtenidos de manera nominal (presencia de colonización =1, Ausencia de colonización = 0).

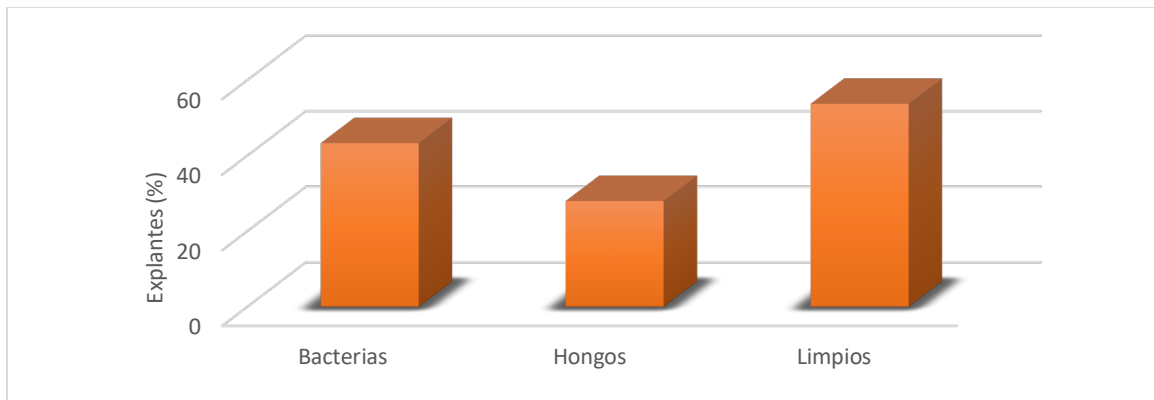
## **5.10 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de una ANOVA y la prueba de comparación de Tukey ( $P \leq .05$ ), con el paquete estadístico SAS versión 9.0.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Etapa de establecimiento *in vitro*

De acuerdo con Flores-Mora *et al.* (2009) durante la etapa de establecimiento uno de los mayores problemas *in vitro* de higo es la contaminación fúngica y bacteriana. En la Figura 1 se representa los porcentajes promedios obtenidos durante los ocho meses de evaluación en higo (*Ficus carica* L), mostrando 43.3% de contaminación por bacterias, el 27.99% de hongos y el 53.69% de explantes sanos.

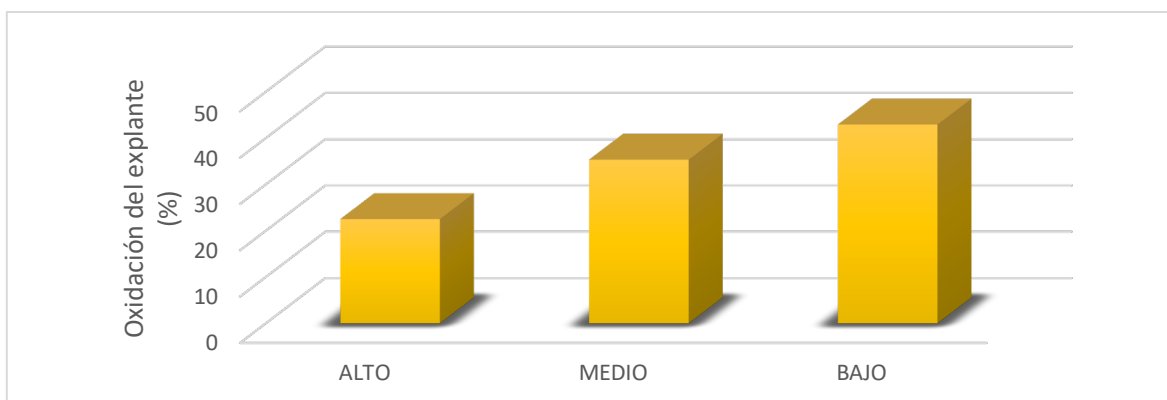


**Figura 1. Porcentajes de contaminación fúngica, bacteriana y de explantes sanos de higo de la variedad 'Brown Turkey' a partir de ocho siembras.**

Durante el establecimiento del cultivar de plantas *in vitro* se deben tener protocolos de asepsia y desinfección para el control de ciertos factores ambientales que afectan el crecimiento de explante (Castillo, 2004) este control de contaminación bacteriana y de hongos depende del tipo de explante, de las condiciones del ambiente y del método de desinfección. Durante la etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes de higo se utilizó bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.5% y alcohol al 70% los cuales mostraron ser eficaces y viables para la obtención de explantes limpios descritos anteriormente en la Figura 1, por lo que Bedoya-Pérez *et al.* (2016) nos mencionan que para obtener resultados óptimos en términos de viabilidad, contaminación y mortalidad, se debe suministrar el cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) como agente desinfectante el cual es un precursor rápido y eficaz para la obtención de explantes viables y libres de agentes contaminantes, teniendo como resultados niveles de contaminación inferiores al 80%. Por esta razón el  $\text{Hg Cl}_2$  es utilizado con éxito en forma de solución desinfectante para diversas especies forestales y leñosas, con problemas de contaminación severa, de acuerdo con Zibbu y Batra (2010). Por otro lado, el uso de

hipoclorito de sodio al 1,5% durante 30 min para desinfección de explantes tiene una alta respuesta en porcentajes del 95.7% en establecimiento y supervivencia de vitroplantas en condiciones *in vitro*. Otro desinfectante es el uso de alcohol al 70% que durante tiempos cortos suele ser un buen precursor eliminador de grasas en la pared celular de la planta permitiendo una mejor penetración del agente desinfectante en los explantes (García *et al.*, 2015; Aguirre *et al.*, 2016). Por lo que el éxito de una buena desinfección dependerá del manejo de las plantas madre, del material a utilizar, del agente desinfectante y del protocolo más eficiente para la reducción de contaminación en el explante.

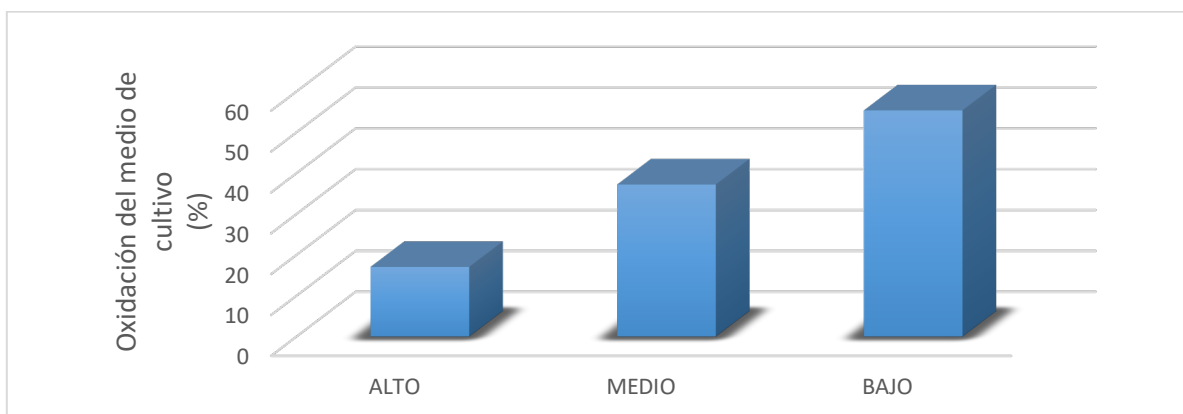
Otro de los problemas más recurrentes en el establecimiento *in vitro* es la aparición de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo; este problema está relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que padecen las células del explante cultivado (Azofeifa, 2009; Novoa *et al.*, 2021). En la figura 2 se muestran los porcentajes de oxidación de los explantes en higo, durante las ocho siembras de establecimiento, mostrando una oxidación alta en el 22.52 % de los explantes, oxidación media un 35.35 % de los mismos y el 43 % de estos tuvieron una oxidación baja, el cual fue suplementado con carbón activado (CA) 0.5 g L<sup>-2</sup> y PVPP (Polivinil) 0.5 g L<sup>-2</sup> al medio de cultivo, mostrando una respuesta favorable en la oxidación en los explantes y el medio de cultivo (Figura 2 y 3).



**Figura 2. Porcentajes de oxidación del explante de higo variedad ‘Brown Turkey’ en la etapa de establecimiento a partir de ocho siembras realizadas.**

En la figura 3 se muestran los porcentajes de oxidación en el medio de cultivo en la etapa de establecimiento durante los ocho meses de evaluación en higo, mostrando oxidación alta

del medio del 17.04 %, oxidación media del medio 37.22 % y oxidación baja del medio 55.36 %.



**Figura 3. Porcentajes de oxidación del explante de higo variedad ‘Brown Turkey’ en la etapa de establecimiento a partir de ocho siembras realizadas.**

Para reducir la lixiviación de fenoles, existen métodos mencionados por Abdelwahd *et al.* (2008) que, al suministrar adsorbentes y antioxidantes al medio de cultivo se induce la reducción de compuestos fenólicos lixivados que impiden la regeneración del explante, como lo es la adición de carbón activado (CA) el cual evita el deterioro del explante y actúa removiendo sustancias inhibidoras o tóxicas producidas por el medio y el explante (Azofeifa, 2009). Asimismo, el complemento del poliamida (PVP) en apropiadas concentraciones logra tejidos libres de oxidación, sin embargo, al implementar una alta concentración, produce bajas regeneraciones en los explantes de acuerdo con Sánchez-Cuevas y Salaverría (2004). Laboratorios comerciales recomiendan el cambio del medio de cultivo en la segunda y tercera semana debido a la presencia de oxidaciones elevadas en los explantes, causando necrosis en el cultivo y subsiguientemente una regeneración baja del tejido (Gómez, 2007).

## 6.2 Etapa de multiplicación *in vitro*

El análisis de varianza para las variables respuesta de los tratamientos en la etapa de multiplicación *in vitro* de brotes de higo de la variedad Brown Turkey representado en el Cuadro 1, donde se puede observar que para las variables longitud de brote y coeficiente de multiplicación se encontraron diferencias altamente significativas, por otro las variables longitud del brote inicial, número de brotes tuvieron diferencias significativas entre los

tratamientos evaluados, finalmente en la variable número de nudos no se encontraron diferencias estadísticas.

**Cuadro 1. Análisis de varianza de los tratamientos en la etapa de multiplicación *in vitro* de brotes (*Ficus carica* L.) de la variedad Brown Turkey.**

F V	G L	LBIE	NN	NB	LB	CM
Trata	3	6.60 *	3.15 NS	5.06 *	9.73 **	27.30 **
Error	8	0.33	2.86	1.54	0.42	10.60
Total	11					
CV		9.93	17.23	25.22	15.21	13.62

FV: Fuentes de variación, CV: coeficiente de variación, GL: grados de libertad \*\* altamente significativo con  $P \leq 0.01$ , \*significativo con  $P \leq 0.05$  y NS: no significativo. Trata: tratamientos, LBIE: longitud de brote inicial del explante, NN: número de nudos, NB: número de brotes, LB: Longitud de brotes, CM: coeficiente de multiplicación.

En el cuadro 2 se presentan las comparaciones de medias de las variables evaluadas, longitud del brote inicial (LBEI), número de nudos (NN), número de brotes (NB), coeficiente de multiplicación (CM) en la etapa de multiplicación *in vitro* 30 días después del establecimiento de los tratamientos con 4 concentraciones diferentes de Bencilaminopurina (BAP), encontrándose como el mejor tratamiento 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP con una longitud de 2.62 cm en comparación con el testigo que tuvo un valor de 1.88 cm, para la variable longitud de brote inicial del explante, lo que significa un aumento del 28 %. De igual manera para la variable número de nudos el tratamiento de 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP presentó el valor más alto con 6.5 nudos en comparación con el testigo con 4.17 nudos alcanzando un aumento del 36 %. En la variable número de brotes se obtuvieron 2.95 brotes para el tratamiento 3 (1.00 mg L<sup>-1</sup> de BAP) siendo el mejor, sin embargo, los tratamientos 1 y 2 (0.25 y 0.50 mg L<sup>-1</sup> de BAP) alcanzaron valores de 2.33 y 2.28 brotes en comparación con el testigo (1.22 brotes) lo que significa un aumento de 58.6%. Para la variable longitud de brote, los tratamientos 1 y 3 (0.25 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) tuvieron valores similares (1.60 cm) que fueron más altos con respecto al testigo que tuvo un valor de 0.81 cm. En cuanto a la variable coeficiente de multiplicación el tratamiento 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP obtuvo un valor de 6.48 siendo el mejor en comparación con el testigo, el cual tuvo un valor 2.03, lo que significa un aumento del 68.6%.

**Cuadro 2. Efecto de la concentración de BAP en la etapa de multiplicación *in vitro* de brotes de higo (*Ficus carica* L.) de la variedad Brown Turkey, evaluados 30 días después del establecimiento de los tratamientos.**

Tratamiento mg L <sup>-1</sup> BAP	LBIE (cm)	NN	NB	LB (cm)	CM
(1) 0.25	2.48 a	5.79 a	2.33 ab	1.60 a	5.29 ab
(2) 0.50	2.14 ab	5.64 a	2.28 ab	1.46 a	4.48 b
(3) 1.0	2.62 a	6.50 a	2.95 a	1.60 a	6.48 a
(Testigo) 0	1.88 b	4.17 a	1.22 b	0.81 b	2.03 c
MEDIA	2.28	5.53	1.730	1.37	4.57
DMS	0.05	0.90	0.30	0.043	0.38

LBIE: longitud de brote inicial del explante, NN: número de nudos, NB: número de brotes, LB: Longitud de brotes, CM: coeficiente de multiplicación, DMSH: diferencia media significativa honesta. Medias con la misma letra en el sentido de la columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

Las citocinas promueven la formación de órganos en los tejidos cultivados *in vitro* ocasionando la inducción de yemas axilares o adventicias, la división y alargamiento celular. Los resultados obtenidos en la fase de multiplicación, se relacionan con los resultados obtenidos por Flores-Mora *et al.* (2009) obteniendo un mayor número de brotes por explante cuando se adicionó al medio de cultivo 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP en mini estacas de higo, obteniendo como resultado seis brotes por explante, asimismo Villanueva *et al.* (2013), al adicionar esta misma concentración promovió el alargamiento (longitud) de brotes del explante hasta 8 mm y la formación de ramificaciones laterales, por lo que, al suplementar BAP a una alta concentración se induce la formación y proliferación de brotes en especies de *Ficus carica*, descrito por Rajendra *et al.* (2021) quien adicionó 4.5 mg L<sup>-1</sup> obteniendo 4.45 brotes en higo variedad Black Jack..

Por otro lado, el tipo y concentración de regulador de crecimiento influye en el coeficiente de multiplicación de los explantes, así que al emplear al medio de cultivo una mayor concentración de citocininas se pueden lograr mejores resultados a los 30 días del cultivo en la fase de multiplicación (Galvez *et al.*, 2013). Gomes *et al.* (2010) mencionan que los

resultados obtenidos en la tasa de multiplicación dependen del genotipo de la planta donante, así como también la influencia que tienen estas hormonas en el comportamiento de los brotes durante la fase de enraizamiento. Sin embargo, esta repuesta a altas concentraciones de BAP tiene efecto a la estimulación de formación de brotes adventicios, las cuales inhiben la construcción de raíces, dando inicio la multiplicación de tallos y formación de yemas laterales, a través de una disminución en la dominancia apical (Sharry *et al.*, 2015).

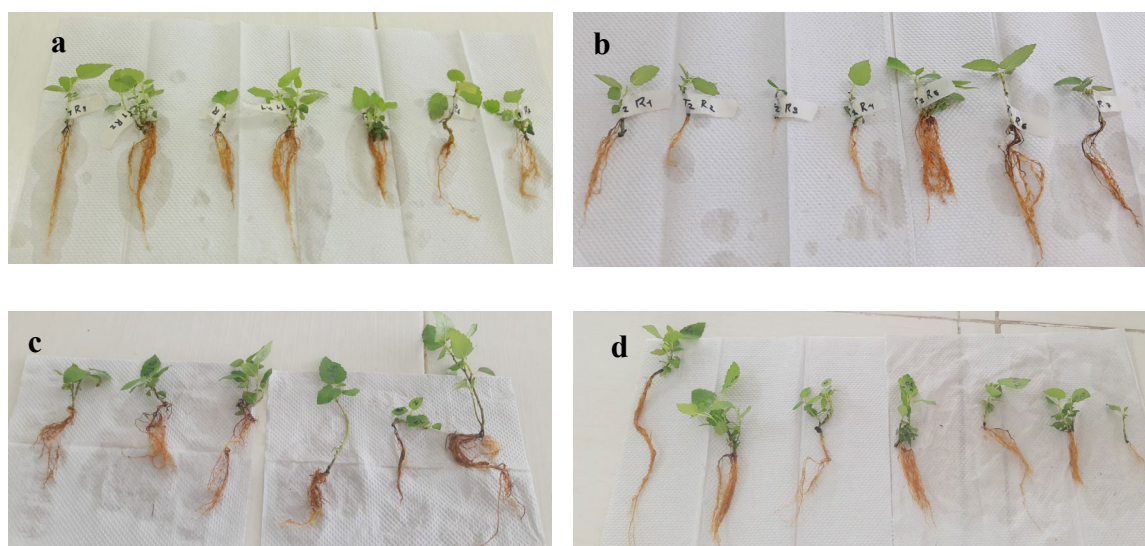
### **6.3 Inducción de peso y longitud en vitroplantas de higo inoculadas con tres especies de *Trichoderma*.**

El análisis de varianza para las variables longitud de raíz y peso en vitroplantas de higo inoculadas con *Trichoderma* no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, teniendo como respuesta un efecto asociado a la homogeneidad de las plantas (Figura 4). En el Cuadro 3 se presentan la comparación de medias de las variables evaluadas, longitud de raíz (LR) y peso total de la planta (PTP) de higo de la variedad Brown Turkey evaluadas 60 días después de la aclimatación al inocular 3 especies de *Trichoderma*. Encontrando que la media más alta la tuvo el tratamiento con *T. harzianum* con una longitud de 10.19 mm en comparación con el testigo con un valor en la longitud de 8.16 mm en la variable longitud de raíz, lo que significa un aumento del 20 %. Para la variable peso total de la planta el tratamiento *T. longibrachatum* alcanzó el valor más alto de la media con un peso del 1.30 g en comparación con el testigo con valores de 1.12 g, lo que representa un aumento del 20.9 %.

**Cuadro 3. Efecto de longitud de raíz y peso en vitroplantas de higo (*Ficus carica* L.) variedad Brown Turkey inoculados con *Trichoderma* sp, evaluadas 60 días después de la aclimatación.**

Tratamiento	LR	PTP
<i>Trichoderma</i>	(mm)	(g)
(1) P III5	9.12 a	1.20 a
(2) OI 5MO <sub>2</sub>	10.19 a	1.26 a
(3) OI 3.2	9.61 a	1.30 a
(4) Testigo	8.16 a	1.12 a
MEDIA	5.98	0.030
CV	19.63	10.64
DMS	0.202	0.192

LR= Longitud de raíz, PTP= Peso total de la planta, P III5= *Trichoderma reesei*, OI 5MO<sub>2</sub>= *Trichoderma harzianum*, OI 3.2= *Trichoderma longibrachatum*. CV= Coeficiente de variación, DMS= Diferencia media significativa. Medias con la misma letra en el sentido de la columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .



**Figura 4. Aspecto de la plantas in vitro de *Ficus carica* L. producidas bajo los tratamientos a) *T reesei*, b) Testigo c) *T harzianum*, c) *T longibrachatum*.**

Una de las bondades que tiene *Trichoderma*, en el sistema radicular facilitar la tolerancia al estrés por parte de la planta y la estimulación del crecimiento vegetal, provocando una

defensa fisiológica y bioquímica de acuerdo con Harman (2000). A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio Gándara y Gutiérrez (2023), obtuvieron resultados altos y significativos a la aplicación de yeso agrícola con *T. harzianum* en plantas de higo incrementando la altura de la planta hasta un 6.5%, por lo que la respuesta sobre el crecimiento y producción de raíces con aplicaciones de *T. harzianum* mejora el rendimiento hasta en 41.98 % y un peso mayor en fruto, así como también un aumento en el desarrollo y obtención de raíces hasta los 0.20 m de acuerdo con Rojas (2014). Así mismo Camargo-Cepeda y Ávila (2013) de acuerdo con estudios realizados, desarrollados con *Trichoderma* sp tuvieron mejor respuesta con aplicaciones a base de productos comerciales a altas concentraciones (UFC) originando respuesta en la generación de raíces hasta un 21 % que, en las inoculadas con la misma especie.

De manera similar a los resultados obtenidos en este estudio, Hoyos-Carvajal *et al.* (2015) encontraron resultados negativos en el efecto de *Trichoderma* spp. durante el crecimiento y desarrollo de frijol en Ultisol por lo que la respuesta de la planta a la inoculación con *Trichoderma* viene diferenciada por cada especie, estado fisiológico, tipo de suelo y por efecto de la combinación planta/ambiente, obteniendo una respuesta a la variabilidad en la altura de la planta (Eraso *et al.*, 2014).

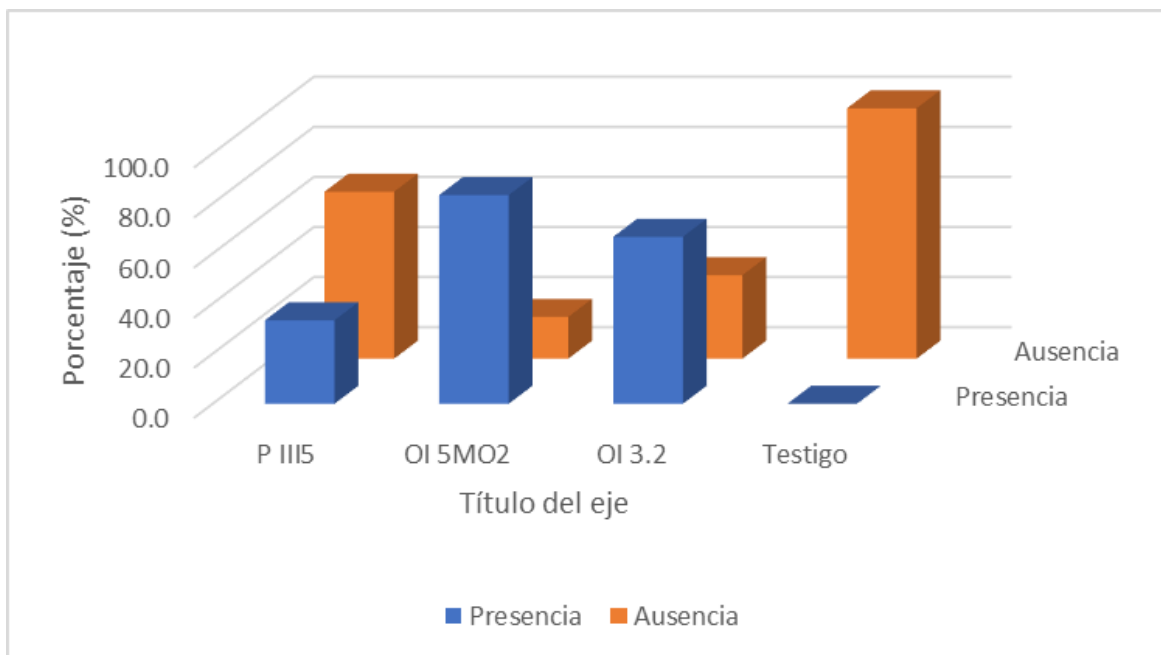
#### **6.4 Endofitismo de tres especies de *Trichoderma* en vitroplantas de higo de la variedad Brown Turkey.**

No se encontró endofitismo de ninguna de las especies de *Trichoderma* inoculadas, observando crecimiento de micelio de todas las especies en la parte externa de la raíz de las plantas de higo Figura 5 (B).



**Figura 5. Representación de crecimiento de *Trichoderma*, en el exterior de la raíz en *Ficus carica* L, variedad Brown Turkey durante 60 días de aclimatación. A) PIII5= Ausencia de *Trichoderma* B) Presencia de *Trichoderma* en raíz, C) Presencia de *Fusarium* sp.**

En la figura 6 se representa los porcentajes de presencia y ausencia de *Trichoderma*, en vitroplantas de higo de la variedad Brown Turkey obtenidas durante las inoculaciones durante 60 días, mostrando mejor respuesta de crecimiento externo *T. harzianum* con un valor promedio del 83.3 % de presencia, *T. longibrachatum* con valores del 66.7 % y *T. reesei* tuvo una baja presencia de 33.3 %, en comparación con el testigo.



**Figura 6. Porcentajes de presencia o ausencia de *Trichoderma* en vitroplantas de higo (*Ficus carica* L) de la variedad Brown Turkey obtenidas durante las inoculaciones durante 60 días. PIII5= *Trichoderma reesei*, OI5MO2= *Trichoderma harzianum*, OI3.2= *Trichoderma longibrachatum*.**

La respuesta obtenida a la inoculación con *Trichoderma* se puede deber a que no hubo inducción obtenida en el peso y longitud de raíz discutidas en el inciso 6.3, debido a que creció en el exterior y no en el interior, esta interacción que existe entre hongo-huésped es el resultado de implicaciones del equilibrio antagónico y del órgano de la planta infectado, negando la infección, esto es en algunos casos que el huésped limita el desarrollo de hongos invasores y de enfermedades (Schulz y Boyle, 2005). Así mismo la falta de endofitismo en este estudio puede deberse al tipo de planta ya que de acuerdo con Sánchez-Fernández *et al.*, (2013) mencionan que existen escasas interacciones con hongos endófitos en plantas leñosas (árboles o arbustos).

Por otro lado, la presencia y ausencia de las interacciones es determinada por las condiciones del ambiente y del suelo, siendo *Trichoderma* un género cosmopolita y compartiendo una amplia variedad de interacciones con diferentes organismos. Se puede encontrar aislado del suelo, debido a su rápido crecimiento, grande conidiación, formación de clamidiosporas y colonización de sustratos orgánicos, lo que facilita un rápido desarrollo

en varios sustratos (Gupta *et al.* 2014). Al analizar las raíces de plantas de higo para determinar endofitismo de *Trichoderma* se encontró la presencia de *Fusarium sp.* de manera endófito el cual creció al exterior de la raíz por efecto de nutrientes presentes en el medio de cultivo Figura 5 (C).

## VII. CONCLUSIONES

Al suministrar  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP se promueve la regeneración de brotes adventicios, alargamiento en la longitud de brotes y un alto porcentaje en el crecimiento de yemas laterales a un 68.6 %, por lo que la concentración y tipo de hormona determina la morfogénesis en vitroplantas de higo, produciendo la regeneración de nuevos brotes de una manera más eficaz e intensiva y libres de agentes patógenos.

La inoculación con *Trichoderma* en plantas de higo en respuesta al desarrollo en raíces y peso de la planta, no se encontraron diferencias entre los tratamientos debido a que el higo es una planta semileñosa pudo impedir la entrada o el endofitismo con las tres especies de *Trichoderma*, sin embargo, *T. harzianum* tuvo mejor respuesta en crecimiento y presencia de la misma en las raíces, pero este efecto pudo deberse a la presencia del hongo en el sustrato.

Para mejorar el endofitismo se debe tener en cuenta la homogeneidad de las plantas, así como también un control en el ambiente/suelo, la metodología adecuada y la aplicación con otra especie de *Trichoderma* para obtener resultados más favorables entre huésped /patógeno.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abdelwahd R., N. Hakam., M. Labhilili & M. U. Sripada. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of *faba bean*. *African Journal of Biotechnology* 7 (8): 997-1002.
- Agrios, G. N. 2002. *Fitopatología*. Uthea. Mexico, D.F. 808 p.
- Aguirre V. G., J. Pierre B. y L. Leigue A. 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 240 p.
- Alcántara-Cortes J. S., J. Acero. G., J. D. Alcantara. C y R. M. Sánchez. M. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova* 17(32); 109-129.
- Azcon-Bieto J y M. Talón. 2013. *Fundamentos de fisiología vegetal: Auxinas*. 2da edición. McGRAW-HILL- Interamericana. España. 396p.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Bailey B. A., H. Bae., M. D. Strem., J. Crozier., S. E. Thomas., B. T. Vinyard y K. A. Holmes. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46(1): 24-35.
- Baldini E. 1992. *Arboricultura general*. Edit. Mundi Prensa. España. 381 p.
- Barboza-García A., A. Pérez-Cordero y L. Anaya-Chamorro. 2022. Especies nativas de *Trichoderma* aisladas de plantaciones de aguacate con actividad inhibitoria contra *Phytophthora cinnamomi*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria* 20(2): 102-116.
- Bedoya-Pérez J. C., C. Y. Sánchez-Jaramillo., S. M. Bermudez-Gómez y S. Ramirez-Restrepo. 2016. Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *in vitro* de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14 (2): 38-46

- Camargo-Cepeda D. F y E. R. Ávila. 2013. Efectos del *Trichoderma* sobre desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura* 11(1): 91-100.
- Carsolio C., Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutierrez Ana, Chet I, Herrera-Estrella A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol* 65:929-935.
- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.
- Companioni G. B., G. Domínguez A y R. García V. 2019. *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biología Vegetal* 19 (4): 237 - 248).
- Domínguez G. Tejero, F. 1976. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 5ª Ed. Dossat, S.A. Madrid. 955 pp
- Druzhinina I., A. Kopchinskiy., C. Kubicek. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Eraso I. C., J. Acosta R., C. Salazar G y C. Betancourth G. 2014. Evaluación de cepas de *Trichoderma spp.* para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica Cienc. Tecnol Agropecu* 15(2) 237-249.
- FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2021. Producción de higo en México. En línea: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>. Consultado: 07/02/23.
- Flores-Mora D. M., V. Jiménez-Bonilla y R. Chacón-Cerdas. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas. *Agronomía mesoamericana* 20(2):319-325.
- Galvez G. D., M. Cabrera J., Y. Beovides., A. R Jiménez., S. Rodríguez y D. Rodríguez. 2013. Influencia de reguladores del crecimiento y el estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon 'INIVIT MC2001'. *Biología Vegetal* 13(4): 225 – 229.

- Gándara L. A y Gutiérrez C. M. A. 2023. Efecto de microorganismos promotores de crecimiento vegetal y yeso agrícola en el cultivo de higo. CIBA: Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias 12 (23): 1-21.
- García L. D. L., N. M. López y M. L. Ocampo G. 2015. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. Colomb Biotechnol 17 (2): 76-84.
- Gisbert, D. C. 2011. Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Etsiarn-Universidad Politécnica de Valencia. En línea: <https://riunet.upv.es/handle/10251/11526>. Consultado: 08/02/2023
- Goettel M. S y G. Douglas, I. 1996. Fungi: Hyphomycetes. *In*. Manual of Techniques in Patology (Eds Lacey, L. A) Montpellier, Frances. pp. 221-223.
- Gomes F., M. Simões., M. L. Lopes and J. M. Canhoto. 2010. Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). New Biotechnology 26 (6): 882-892.
- Gómez J. M. 2007. Efecto de tratamientos antioxidantes en el establecimiento in vitro de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia, Honduras. Tesis de Licenciatura. Zamorano. Carrera de ciencia y producción agropecuaria. Honduras. 13 p.
- González-Soto, T., L. Moreno-Ramírez, R. Troncoso-Rojas, D. González-Mendoza, A. Sánchez-Estrada, O. Grimaldo-Juárez, O. Tzinzun-Camacho y C. Ceceña-Durán. 2017. Inoculación de *Trichoderma longibrachiatum* en algodón transgénico: Cambios en compuestos fenólicos y enzimas de estrés oxidativo. IDESIA (Arica) 35(1): 19-24.
- Guedez C., L. Canizalez., C. Castillo y R. Olivar. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 32(1): 44-49

- Gupta V. G., M. Schmoll., A. Herrera-Estrella., R.S. Upadhyay., I. Druzhinina., M. G. Tuohy. 2014. Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Newnes. Amsterdam. pp: 543-549.
- Harman G. 2000. Myths and dogmas of control: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4):377-393.
- Hartmann H. y D. Kester. 1997. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Marino A. A (trad). 5<sup>ta</sup> Impresión. Continental. México. 733 p.
- Hepaksoy S & U. Aksoy. 2006. Propagation of *Ficus carica* L. clones by *in vitro* culture. *Biologia Plantarum* 50 (3): 433-436.
- 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.
- Hernández-Morales J., T. Romero-Rosales., A. C. Michel-Aceves., M. Vargas-Hernández., A. Monteon-Ojeda y J. L. Valenzuela-Lagarda. (2021). Antagonismo Enzimático de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasitica* en *Hibiscus sabdariffa* L. *Bioagro* 33(3): 203-214
- Hoyos-Carvajal L., A. Cardona., W. Osorio y S. Orduz. 2015. Efecto de diversos aislamientos de *Trichoderma spp.* en la absorción de nutrientes en frijol (*Phaseolus vulgaris*) en dos tipos de suelo. *Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas* 9(2): 268-278.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal* 24(1): 14-21.
- INFOAGRO (Información Agrícola). 2020. Virus del Mosaico de la higuera. En línea: <https://mexico.infoagro.com/virus-del-mosaico-de-la-higuera/>. Consultado: 07/02/23.
- INTAGRI (Instituto para la innovación tecnológica en la agricultura). 2020. Producción Higo en México. Serie Frutales, Núm. 60. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 4 p.

- Juárez M. L. 2019. Aplicación de tecnologías emergentes e innovadoras en la propagación vegetativa de cuatro variedades de higo (*Ficus carica* L.). Tesis de maestría. Colegio de postgraduados, Fruticultura. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 84 p.
- López-Valenzuela B. E., O. Tzintzun-Camacho., A. D. Armenta-Bojórquez., F. A. Valenzuela-Escobaza., G.J. Lizárraga-Sánchez., J. R. Ruelas- Islas., D. González-Mendoza. 2022. Microorganismos del género *Trichoderma* productores de Fitohormonas y antagonistas de Fitopatógenos. *Bioagro* 34(2): 163-172.
- Lucero G. 2018. Diseño de un sistema de riego mediante difusores subterráneos y su efecto en la ecofisiología y productividad del agua en la higuera (*Ficus carica* L.) Tesis de doctor en ciencias. Centro de Investigaciones del Noroeste, S.C, la Paz, Baja California Sur. 78 p.
- Martinez B. N. H., C. Gonçalves M & F. A Sganzerla G. 2022. Efficiency and delivery methods of *Trichoderma harzianum* on biological control against southern blight in sweet pepper. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 17(2): e1884
- McKenzie, E. 2014. *Cerotelium fici* (E.J. Butler) Arthur. En línea: <https://www.padil.gov.au/maf-border/pest/143006>. Consultado: 07/02/23.
- Melgarejo P. 1999. El cultivo de la higuera (*Ficus carica* L). Universidad Miguel Hernández de Elche. Ed. IRAGRA, S. A. Madrid. 112 p.
- Mendoza, J, L. 2019. Efecto de tres dosis de ROOT-HOR en el enraizamiento de estacas de higo (*Ficus carica*) en condiciones de vivero. Universidad Nacional del Santa, Facultad de Ingeniería. Nuevo Chimbote, Perú. 92 p.
- Mroginski L. A y Roca W. M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Facultad de Ciencias agrarias. Instituto de botánica de Noroeste. Cali, Colombia. p. 19-40.
- Mukherjee, M., P. K. Mukherjee., B. A. Horwitz., C. Zachow., G. Berg., & S. Zeilinger. 2012. *Trichoderma* Plant Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian Journal of Microbiology* 52(4): 522-529.

- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Nievas W., Villarreal, P., Rodríguez, A y Gómez, G. 2021. El cultivo de la higuera (*Ficus carica*): Aspectos ambientales y económicos para el Alto Valle del río Negro. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Ed. INTA, Argentina. 46 p.
- Novoa, A., M. Motidome., J. Mancini-Filho., A. Linares., M. Tanae., L. Torres., A. Lapa. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37: 373-382.
- Ortiz-Sánchez, I. A., Chávez-Simental, J. A., Pulido-Díaz, C., Gamero-Posada, E. C., Valdez-Ortega, S., & González-Cervantes, G. 2021. Propagación *in vitro* de *Caladium bicolor* con diferentes dosis de reguladores de crecimiento. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 29(83): e3749.
- Paponov I. A., W. D. Teale., M. Trebar., I. Blilou & K. Palme. 2005. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* 10(4); 170-177.
- Perea M. 2010. Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro. 1 Impresión. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. pp:7-8.
- Pierik R. 1990. Rejuvenation and Micropropagation. *In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology: Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas & J. Van Aartrijk (ed.). Amsterdam, The Netherlands. pp: 91-101.
- Poveda J y D. Eugui. 2022. Combined use of Trichoderma and beneficial bacteria (mainly Bacillus and Pseudomonas): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. *Biological Control* 176. En línea: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105100>. Consultado: 08/05/2023.

- Rajendra P. A., B. Lynn C., L. Chow Y. & S. Subramaniam. 2021. Organogenesis on apical buds in common fig (*Ficus carica*) var. Black Jack. *Electronic Journal of Biotechnology* 54: 69-76.
- Rees H. J., J. Drakulic., M. G. Cromey., A. M. Bailey., G. D. Foster. 2022. Edophytic *Trichoderma* spp. Can protect strawberry and privet plants from infection by the fungus *Armillaria mellea*. *PLoSone*, 17(8): ed 0271622.
- Rojas A. N. A. 2014. Efecto de *Trichoderma harzianum* sobre el fruto de tomate bajo macrotúnel; el Tejar, Chimaltenango. Tesis de Licenciatura. Universidad Rafael Landívar. Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas. Guatemala. 33 p.
- Rojas G. S., J. García L y M. Alarcón R. 2004. Propagación asexual de plantas: Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Ed. Produmedios. Colombia. 55 p.
- SADER (Secretaria de agricultura y desarrollo rural). 2015. Inician productores de Puebla y Morelos exportación de higo a Estados Unidos. En línea: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/inician-productores-de-puebla-y-morelos-exportacion-de-higo-a-estados-unidos>. Consultado: 07/02/2023.
- SADER (Secretaria de agricultura y desarrollo rural). 2019. Morelos principal productor de higo a nivel nacional. En línea : <https://www.gob.mx/agricultura%7Cmorelos/articulos/morelos-principal-productor-de-higo-a-nivel-nacional#:~:text=Morelos%20es%20el%20principal%20productor,boom%20en%20los%20%C3%BAltimos%20a%C3%B1os>. Consultado: 07/02/2023.
- Sánchez- Cuevas M y J. L. Salaverría. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *UDO Agrícola* 4 (1): 21-26.
- Sánchez-Fernández R. E., Sánchez-Ortiz B. L., Sandoval-Espinosa Y. K. M., Ulloa-Benítez A., Armendáriz-Guillén B., García-Méndez M. C., Macías-Rubalcava M. L. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2): 132- 146.

- Schulz B., & C. Boyle. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6): 661-686.
- Shahmirzaie M., M. Reza S., F. Rakhshandehroo., H. Safarpour., F. H. Shirazi., H. Reza Z & T. Elbeaino. 2020. Generation and molecular docking analysis of specific single-chain variable fragments selected by phage display against the recombinant nucleocapsid protein of fig mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 276. En línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093419303623>. Consultado: 08/05/2023.
- Sharry S., M. Adema y W. Abedini. 2015. Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. 1ª. Ed. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina. 233 p.
- SIC (Sistema Integral de Comunicación). 2021. Enfermedad del mosaico del higo y posibles agentes causales asociados. En línea: <https://prod.senasica.gob.mx/ALERTAS/inicio/pages/single.php?noticia=8052>. Consultado: 07/02/23.
- Tamayo M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Politécnica*. 4: 51-70.
- Tlapal B. B., H. González H., E. Zavaleta M., P. Sánchez G., G. Mora A., C. Nava D., J. I. Del Real L y R. Rubio C. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en Plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el Efecto Sobre la Fisiología de la Planta y Densidad de *Fusarium*. *Revista mexicana de Fitopatología* 32(1). En línea: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092014000100006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000100006). Consultado: 08/05/2023.
- Valdés G., Escartín, N., Lorente, M., Malagón, J., y Bartual, J. 2009. Evaluación agronómica y caracterización morfológica de material seleccionado de higuera para producción de brevas en Alicante. *Actas de Horticultura*, (54), 135-138.
- Verga A y S. Nelson. 2014. Fig Rust in Hawai'i. *Plant Disease*, 100: 1-5. En línea: <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-100>. Consultado: 07/02/23.

- Vicente I., R. Baroncelli., R. Hermosa., E. Monte., G. Vannacci & S. Sarrocco. 2022. Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in *Trichoderma* ecophysiology. *Fungal Biology Reviews* 39: 83-99.
- Villalobos A. M., Rodríguez, M. P., Rodríguez, H. M., González, M. R., y Arriaga, G. E. 2015. Dinámica del crecimiento fenológico de higuera (*Ficus carica* L.) con altas densidades de plantación en macro-tuneles. *Agrofaz: publicación semestral de investigación científica*, 15(2), 133-141.
- Villanueva F., M. Ávila., A. Mansilla., S. Abades y J. Cáceres. 2013. Efecto de auxinas y citoquininas en el cultivo de tejido de *Ahnfeltia plicata* (Hudson) fries, 1836 (Ahnfeltiales, Rhodophyta) de la región de Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia* 41(1).
- Zibbu G., & A Batra. 2010. Effect of adeninesulphate on organogenesis via leaf culture in an ornamental plant: *thevetia peruviana* (pers) schum. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 1(2): 1-9.