



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO COMO FACTOR PARA
GENERAR APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE
Trichoderma CON POTENCIAL EN LA AGRICULTURA**

NORA EVA FERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR
Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Nora Eva Fernández Velázquez**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Mercedes Sobal Cruz** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **El ácido acetilsalicílico como factor para generar aplicaciones biotecnológicas de *Trichoderma* con potencial en la agricultura**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 11 de diciembre de 2015

Nora Eva Fernández Velázquez

**Vo. Bo. Profesora Consejera
Dra. Mercedes Sobal Cruz**

La presente tesis, titulada: **El ácido acetilsalicílico como factor para generar aplicaciones biotecnológicas de *Trichoderma* con potencial en la agricultura**, realizada por la alumna: **Nora Eva Fernández Velázquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:


DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:


DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:


DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:


DRA. REBECA RAMÍREZ CARRILLO

Puebla, Puebla, 11 de diciembre de 2015

EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO COMO FACTOR PARA GENERAR APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE *Trichoderma* CON POTENCIAL EN LA AGRICULTURA

Nora Eva Fernández Velázquez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Dentro del género *Trichoderma* existen diversas especies que son de importancia biotecnológica, usadas como agentes de biocontrol, para la producción de enzimas, antibióticos y en la biorremediación de suelos contaminados. Por otro lado, el ácido acetilsalicílico (AAS) se ha usado en la promoción de la respuesta del sistema inmune en plantas cultivadas y su uso en hongos resulta promisorio para estimular su desarrollo. En el presente estudio se evaluó el efecto del ácido acetil salicílico (AAS) en el crecimiento de diferentes especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *aggressivum*, *T. pleuroti* y *T. atroviride*) aisladas de sustratos de cultivos de hongos comestibles. Se utilizaron dos concentraciones de AAS 1 y 100 μM y ABTS como sustratos enzimáticos. Se analizó la velocidad de crecimiento, área de la colonia, la actividad enzimática de lacasas y producción de esporas. Las cepas de *Trichoderma* fueron capaces de crecer en todos los tratamientos y el testigo. En todos los casos la adición del sustrato ABTS promovió la producción de lacasas y esporas. En el crecimiento se observó que únicamente la cepa de *T. atroviride* tuvo un estímulo con el sustrato de ABTS combinado con AAS 1 μM (Tx4), al presentar una colonización completa de la caja de Petri a los 7 de incubación. Las demás cepas no presentaron cambios en la velocidad de crecimiento y área de la colonia. La cepa *T. atroviride* demostró ser la única en presentar actividad de lacasas cualitativamente, al reaccionar con el sustrato ABTS y AAS en los tratamientos Tx3, Tx4 y Tx5 y coloreando el medio de cultivo, con una área de oxidación de 47.6 cm^2 , 57.1 cm^2 y 48.9 cm^2 , respectivamente. El análisis de la actividad volumétrica de lacasas demostró que *T. atroviride*, presentó actividad obteniendo en el primer día el valor más alto con 0.58 U mL^{-1} . Las demás cepas demostraron un efecto estimulante en la producción de lacasas, con los tratamientos de AAS y ABTS, siendo el tratamiento Tx3 (ABTS) el que provocó en *T. pleuroti* el valor más alto en la producción de lacasas con 1.48 U mL^{-1} . Se observó que en los primeros días existió una estimulación con el tratamiento de Tx2 (AAS 100 μM) en *T. pleuroti* con una actividad de 1.18 U mL^{-1} , mientras que *T. harzianum* y *T. aggressivum* f. *aggressivum* lo hicieron con Tx1 obteniendo 1.2 U mL^{-1} y 1.3 U mL^{-1} , respectivamente. La producción más alta de esporas fue en el tratamiento Tx4 en la cepa de *T. pleuroti*, con una producción de 5.95×10^6 esporas mL^{-1} . La dosis más alta de AAS (100 μM), promovió la producción de esporas en dos cepas, *T. harzianum* y *T. aggressivum* f. *aggressivum*, con 3.5×10^6 y 6.3×10^5 esporas mL^{-1} en comparación con los testigos que fueron de 3.0×10^6 y 3.3×10^5 esporas mL^{-1} , respectivamente; sin embargo, esta condición afectó la producción de esporas en la cepa CPM-121 de *T. atroviride* al obtener únicamente 7.75×10^5 esporas mL^{-1} comparada con su testigo que obtuvo 1.05×10^6 esporas mL^{-1} . A partir de los resultados obtenidos es factible planear una estrategia que involucre aplicaciones biotecnológicas de estas cepas de *Trichoderma*, encaminadas al área agrícola.

Palabras clave: ácido acetil salicílico, ABTS, biotecnología, esporas, lacasas, *Trichoderma*.

ACETYLSALICYLIC ACID AS A FACTOR TO GENERATE BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS OF *Trichoderma* WITH POTENTIAL IN AGRICULTURE

Nora Eva Fernández Velázquez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Within the genus *Trichoderma* there are different species of biotechnological importance, such as those used as biocontrol agents, for enzyme production, antibiotics and for bioremediation. On the other hand, acetylsalicylic acid (ASA) has been used in promoting the immune response in cultivated plants and their use in mushrooms to stimulate the development is promising. In the present study the effect of acetylsalicylic acid (ASA) in the growth of different species of *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *aggressivum*, *T. pleuroti* and *T. atroviride*) isolated from edible mushrooms substrates were evaluated. Two concentrations of ASA 1 and 100 μM plus ABTS as enzymatic substrate were used. Growth rate, colony area, the enzymatic activity of laccases and spore production were analysed. *Trichoderma* strains were able to grow in all treatments and in the control. In all cases the addition of ABTS promoted the production of laccases and spores. In the growth rate it was observed that only the strain of *T. atroviride* was stimulated by the ABTS combined with ASA 1 μM (Tx4) showing a complete colonization of the petri dish in 7 days. In the case of other strains there were no changes in growth rate or colony area. *T. atroviride* strain proved to be the only to show qualitative laccase activity by colouring the culture medium in treatments Tx3, Tx4 and Tx5 in day 7 with an oxidation area of 47.6 cm^2 , 57.1 cm^2 and 48.9 cm^2 , respectively. The volumetric analysis of laccase activity exhibited that *T. atroviride* was capable to produce laccase in the first day the highest value with 0.58 U mL^{-1} . All other strains showed a stimulatory effect on the production of laccases with AAS and ABTS, being treatment Tx3 (ABTS) in *T. pleuroti* obtaining the highest value in the production of laccases with 1.48 U mL^{-1} . It was observed that in the first day there was a stimulation in treatment Tx2 (ASA 100 μM) in *T. pleuroti* with a production of 1.18 U mL^{-1} , while *T. harzianum* and *T. aggressivum* f. *aggressivum* did it with treatment Tx1 with 1.2 U mL^{-1} and 1.3 U mL^{-1} , respectively. The highest spore production was obtained in the treatment Tx5 in *T. pleuroti*, with 5.95 $\times 10^6$ spores mL^{-1} . The highest doses of ASA (100 μM) promoted spore production in two strains, *T. harzianum* and *T. aggressivum* f. *aggressivum* with 3.5 $\times 10^6$ and 6.3 $\times 10^5$ spores mL^{-1} compared to the control with 3.0 $\times 10^6$ and 3.3 $\times 10^5$ spores mL^{-1} , respectively; however, this condition affected the production of spores in *T. atroviride* obtaining 5.62 $\times 10^5$ spores mL^{-1} compared to the control with 9.87 $\times 10^5$ spores mL^{-1} . From the results it is feasible to plan a strategy involving biotechnological applications of these strains of *Trichoderma* in the agricultural area.

Keywords: ABTS, acetylsalicylic acid, biotechnology, laccases, spores, *Trichoderma*.

Dedicatoria

A mi esposo Ruperto, mi compañero en las buenas y en las malas, quien ha sido mi fortaleza, me ha brindado ánimo para seguir adelante y confianza en la toma de mis decisiones.

A mi hijo Juan Carlos, quien es mi mayor razón para continuar en los momentos más difíciles.

A mis mamis:

Nati, Eva y Sofi[†], quienes han sido mi fuente de inspiración, que con sus enseñanzas me han sabido guiar por el camino de la vida con su amor incondicional.

A mi familia que es lo más grande que Dios a me ha dado, por su apoyo moral y espiritual, que de una u otra forma estuvieron a mi lado apoyando para lograr y alcanzar mi meta. Gracias por su comprensión, apoyo y amor.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haber financiado mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, por brindarme parte de los insumos que utilicé durante la realización de este trabajo de investigación.

A mi consejo particular integrado por las Dras. Mercedes Sobal Cruz y Rebeca Ramírez Carrillo, y los Drs. Daniel Claudio Martínez Carrera y Porfirio Morales Almora, por confiar en mí y por la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales. Siempre les agradeceré el apoyo brindado para poder concluir con mi trabajo de Tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, profesores, académicos y alumnos, por su apoyo durante mi estancia de investigación.

CONTENIDO		Páginas
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	Sustratos de cultivo de los hongos comestibles.....	3
2.2	Contaminación de los sustratos por <i>Trichoderma</i>	3
2.3	El género <i>Trichoderma</i>	4
2.4	Potencialidades del género de <i>Trichoderma</i>	5
2.4.1	Actividad de la enzima lacasa.....	6
2.4.1.1	Biorremediación en suelos contaminados.....	7
2.4.2	Control biológico.....	8
2.4.2.1	Producción de esporas.....	9
2.5	El Ácido acetilsalicílico (AAS).....	9
III.	MARCO DE REFERENCIA	12
3.1	Producción de enzimas lacasas por <i>Trichoderma</i>	12
3.2	Biorremediación de suelos contaminados por <i>Trichoderma</i>	13
3.3	Producción de esporas por <i>Trichoderma</i>	13
3.4	Uso de <i>Trichoderma</i> en el control biológico.....	14
3.5	Innovaciones biotecnológicas con hongos filamentosos.....	15
3.6	El género <i>Trichoderma</i> en la agricultura.....	15
IV.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
V.	HIPÓTESIS	19
VI.	OBJETIVOS	19
6.1	Objetivo general.....	19
6.2	Objetivos particulares.....	19
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1	Material biológico.....	21
7.2	Condiciones de estudio.....	21
7.2.1	Preparación del inóculo.....	21
7.2.2	Preparación del medio de cultivo.....	21
7.2.3	Inoculación de los tratamientos.....	22
7.3	Caracterización de las cepas estudiadas.....	23
7.3.1	Cinética de crecimiento.....	23
7.3.1.1	Velocidad de crecimiento y área de la colonia.....	23
7.4	Determinación de la actividad de la enzima lacasa.....	24
7.4.1	Evaluación cualitativa.....	24
7.4.1.1	Medición del halo de oxidación.....	24
7.4.2	Evaluación cuantitativa.....	24
7.4.3	Determinación de la actividad de lacasas.....	25

7.4.4	Producción de esporas.....	27
7.5	Análisis estadístico.....	28
VIII.	RESULTADOS	29
8.1	Caracterización de las cepas estudiadas.....	29
8.1.1	Morfología.....	29
8.1.1.1	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	29
8.1.1.2	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	31
8.1.1.3	CPM-115 de <i>T. pleuroti</i>	32
8.1.1.4	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	35
8.1.2	Velocidad de crecimiento lineal del micelio (cm/día).....	38
8.1.2.1	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	39
8.1.2.2	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	40
8.1.2.3	CPM-115 de <i>T. pleuroti</i>	41
8.1.2.4	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	42
8.1.3	Área de la colonia (cm ²).....	43
8.1.3.1	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	44
8.1.3.2	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	45
8.1.3.3	CPM-115 de <i>T. pleuroti</i>	46
8.1.3.4	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	47
8.2	Producción de la enzima lacasa.....	48
8.2.1	Análisis cualitativo.....	48
8.2.1.1	CPM-121 <i>T. atroviride</i>	48
8.2.1.1.1	Determinación volumétrica de lacasas al tiempo final.....	51
8.2.1.1.2	Producción de esporas al tiempo final.....	53
8.2.2	Análisis cuantitativo.....	54
8.2.2.1	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	56
8.2.2.2	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	57
8.2.2.3	CPM-115 de <i>T. pleuroti</i>	58
8.2.2.4	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	59
8.2.2.3	Producción de esporas.....	60
8.2.2.3.1	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	61
8.2.2.3.2	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	62
8.2.2.3.3	CPM-115 de <i>T. pleuroti</i>	63
8.2.2.3.4	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	64
8.3	Análisis de varianza y correlación de las variables estudiadas.....	65
IX	DISCUSIÓN	67
X.	CONCLUSIONES	70

XI.	ESTRATEGIA PARA APROVECHAR EL HONGO <i>Trichoderma</i> COMO BIOCONTROL DE FITOPATOGENOS Y BIORREMEDIADOR DE SUELOS AGRICOLAS.....	71
11.1	Introducción.....	71
11.2	Actores sociales.....	72
11.3	Objetivos estratégicos y específicos.....	74
XII.	LITERATURA CITADA.....	76
XIII.	ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS		Páginas
Figura 1.	Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> spp. (400x).....	5
Figura 2.	Metodología general de la investigación realizada en el presente estudio. * Cinética de cinco tiempos únicamente para la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	20
Figura 3.	Desarrollo de la colonia de las cepas en estudio. A) Caja Petri colonizada completamente para la obtención del inóculo. B) Colocación del inóculo en la caja Petri.....	22
Figura 4.	Diagrama para la obtención del sobrenadante del cultivo de las especies de <i>Trichoderma</i> en PDA.....	25
Figura 5.	Diagrama general para la realización del análisis de la actividad de lacasas.....	26
Figura 6.	Diagrama general para el conteo de esporas en cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas mL ⁻¹	27
Figura 7.	Morfología de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , cinética diaria de la prueba cualitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	30
Figura 8.	Morfología de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.....	31
Figura 9.	Morfología de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.....	32
Figura 10.	Morfología de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , cinética diaria de la prueba cualitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	34
Figura 11.	Morfología de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.....	35
Figura 12.	Morfología de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , cinética diaria de la prueba cualitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	37

Figura 13.	Morfología de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.....	38
Figura 14.	Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> y CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	39
Figura 15.	Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	40
Figura 16.	Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.....	41
Figura 17.	Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	42
Figura 18.	Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	43
Figura 19.	Cinética para medir el área de la colonia (cm ²) de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> y CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	44

Figura 20.	Cinética para medir el área de la colonia (cm ²) de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	45
Figura 21.	Cinética para medir el área de la colonia (cm ²) de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.....	46
Figura 22.	Cinética para medir el área de la colonia (cm ²) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	47
Figura 23.	Cinética para medir el área de la colonia (cm ²) de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	48
Figura 24.	Coloración producida por la oxidación del sustrato ABTS de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , durante la cinética de crecimiento. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)=PDA+ ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	49
Figura 25.	Cinética de crecimiento de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> para medir el halo de oxidación (cm ²) producido por el sustrato ABTS. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	50
Figura 26.	Comparación del área micelial (A.M.) y el área de oxidación (A.O.) en los tratamientos ABTS +AAS de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.....	51
Figura 27.	Actividad volumétrica de lacasas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> y CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , al tiempo final. 5 días de incubación para la cepa CPM-108, 6 días para la cepa CPM-115 y 8 días para la cepa CPM-121. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µ.....	52

Figura 28.	Producción de esporas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> y CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , al final de la cinética de crecimiento. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.....	54
Figura 29.	Producción de lacasas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	56
Figura 30.	Producción de lacasas de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	57
Figura 31.	Producción de lacasas de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	58
Figura 32.	. Producción de lacasas de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	59
Figura 33.	Producción de lacasas de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	60
Figura 34.	Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL ⁻¹ , de las cepas CPM- 108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM- 113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	61
Figura 35.	Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL ⁻¹ de la cepa CPM- 108 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	62
Figura 36.	Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL ⁻¹ de la cepa CPM- 113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.....	63

Figura 37.	Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} de la cepa CPM- 115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM	64
Figura 38.	Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} de las cepa CPM- 115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> . Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM	65
Figura 39.	Actores implicados en el proceso de la implementación de la estrategia.....	74

ÍNDICE DE CUADROS		Páginas
Cuadro 1.	Cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas en el trabajo de investigación...	21
Cuadro 2.	Características morfológicas del crecimiento micelial de la colonia al final de la cinética.....	23
Cuadro 3.	Muestreo de las variables estudiadas en la prueba cualitativa.....	24
Cuadro 4.	Muestreo para determinar la actividad de lacasas y producción de esporas de cada cepa.....	24
Cuadro 5.	Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , cultivada en PDA en diferentes condiciones al final de la cinética.....	30
Cuadro 6.	Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , cultivada en diferentes condiciones al final de la cinética.....	32
Cuadro 7.	Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> cultivada en diferentes condiciones al final de la cinética.....	33
Cuadro 8.	Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , cultivada a diferentes condiciones al final de la cinética.....	36
Cuadro 9.	Actividad volumétrica de lacasas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i>	52
Cuadro 10.	Producción de esporas/mL de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> al tiempo final de incubación de cada cepa.....	53
Cuadro 11.	Producción de lacasas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> en los cinco tiempos de toma de muestra..	55
Cuadro 12.	Producción de lacasas de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	57
Cuadro 13.	Producción de lacasas de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	58
Cuadro 14.	Producción de lacasas de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	59
Cuadro 15.	Producción de lacasas de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	60
Cuadro 16.	Producción de esporas de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	62

Cuadro 17.	Producción de esporas de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	63
Cuadro 18.	Producción de esporas de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	64
Cuadro 19.	Producción de esporas de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> en los cinco tiempos de toma de muestra.....	65
Cuadro 20.	Comparación de medias en la producción de esporas, producción de lacasas, velocidad de crecimiento y área de la colonia de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , CPM-115 de <i>Trichoderma pleuroti</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , al tiempo final de incubación de cada cepa.....	66
Cuadro 21.	Comparación de los tratamientos Tx1, Tx2 y testigo en la producción de esporas, producción de lacasas, velocidad de crecimiento y área de la colonia, al tiempo 4 de la cinética de crecimiento.....	66
Cuadro 22.	Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas de la estrategia.....	72
Cuadro 23.	Objetivos de la estrategia para el manejo del hongo <i>Trichoderma</i> y su aplicación de formulados para el biocontrol y la biorremediación de suelos agrícolas contaminados en México.....	75

I. INTRODUCCIÓN

A partir de los últimos dos siglos, el crecimiento demográfico y el aumento en los niveles de la actividad social han provocado grandes cambios en el sector agrícola e industrial. La demanda de alimentos se ha hecho cada vez mayor, provocando un uso excesivo de insumos agrícolas que repercuten de negativamente en el medio ambiente y la salud. De la misma manera, la industria petroquímica se ha desarrollado a pasos agigantados generando diversos satisfactores económicos. Sin embargo, su expansión y desarrollo también ha dado origen a graves problemas ambientales, con repercusiones a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas (Jiménez-Cisneros, 2001). En México pueden mencionarse de manera cualitativa los problemas de contaminación generados por el derrame y fugas de combustibles (petróleo y derivados), el uso de agroquímicos y fertilizantes (en especial los nitrogenados), como de pesticidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas). Actualmente, no es posible hablar de un control de plagas sin la utilización de agroquímicos y pesticidas.

Con tal panorama se buscan nuevas tecnologías que ayuden a mitigar estos problemas de una manera sustentable. Ante esto la biotecnología provee de técnicas tales como el uso de organismos vivos tales como bacterias, hongos, plantas, capaces de degradar compuestos contaminantes y controlar agentes causantes de plagas y enfermedades, destacando dos aplicaciones importantes, la biorremediación y el control biológico, a través de la producción de enzimas y la competencia directa por nutrientes y espacio.

Los hongos antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades en los agroecosistemas. A nivel mundial se conoce un grupo importante de hongos que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos. Su mecanismo de acción frente a diversas condiciones contribuye a la producción de enzimas y metabolitos. Este efecto es aprovechado por el hombre para la regulación, tanto de patógenos como en actividades de biorremediación.

En este sentido, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo. La mayoría de las investigaciones se orientan a la aplicación del hongo como antagónico de hongos fitopatógenos. Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros (Infante

et al., 2009). En la agricultura se usan diferentes compuestos que estimulan el crecimiento de las raíces y la floración, tal es el caso del ácido acetilsalicílico (AAS). Se sabe que además del uso del AAS en la agricultura también se usa en la salud humana, por sus propiedades antiinflamatorias y se recomienda en personas con problemas cardiacos. El AAS es un compuesto de fácil adquisición que puede potencializar alguna rutas metabólicas.

Por tal motivo, en la presente investigación se buscó conocer el efecto del AAS sobre cepas de *Trichoderma* para promover el metabolismo del hongo y generar nuevas aplicaciones biotecnológicas de dicho hongo, potencializando la actividad de la enzima lacasa y la producción de esporas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Sustratos de cultivo de los hongos comestibles

La biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (Convention on Biological Diversity, Article 2. Use of Terms, United Nations, 1992). En la biotecnología de los hongos comestibles se utilizan una gran variedad de subproductos agrícolas, forestales y agroindustriales con potencial para ser utilizados como sustrato de cultivo de los hongos comestibles, por ejemplo: el olote de maíz, la pulpa de café, el aserrín y los rastrojos de maíz, frijol y sorgo, entre otros. Estos sustratos requieren una preparación debido a su composición como picado, molido o triturado. Además de diferentes procesos de hidratación que se realiza mediante la pasteurización, inmersión del sustrato en agua caliente o fría. A los materiales utilizados se les aplican distintas formas de eliminación de cargas microbianas, que van desde la pasteurización y desinfección con tratamientos sencillos como soluciones alcalinas para estabilizar el pH. También se utilizan procesos de esterilización de los sustratos para el cultivo de hongos en condiciones axénicas. Para la siembra o inoculación generalmente se utilizan bolsas de polipropileno de 40 x 60 cm, con siembra en capas alternas de sustrato a una tasa de inoculación del 10-15% (Sobal *et al.*, 2010).

2.2 Contaminación de los sustratos por *Trichoderma*

Algunos problemas con los que los cultivadores de hongos se pueden encontrar son las enfermedades causadas por el moho verde *Trichoderma* spp., así como la presencia de mosquitos, la mosca doméstica, ácaros y un gasterópodo conocido como babosa. El hongo *Trichoderma* posee una gran habilidad para colonizar sustratos rápidamente, y por poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos. En donde destacan como efecto inhibitorio la capacidad para producir antibióticos y la degradación de componentes de la pared celular de patógenos de plantas y de hongos. Cabe destacar que *Trichoderma* spp, es un habitante del suelo, caracterizado por un comportamiento saprobio o parásito, dichas propiedades son las que benefician su actividad antagónica. Es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de materia orgánica en descomposición, también es posible aislarlo a partir de la superficie de raíces de varias plantas de madera y

parasitando estructuras de diferentes hongos patógenos y comestibles debido a la competencia por nutrientes (Tovar, 2008).

2.3 El género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es un habitante natural de suelo y cosmopolita. Se le puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas, templadas y frías. Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos, características esenciales de su antagonismo. *Trichoderma* spp., se pueden encontrar en el aire, plantas, en humus forestales y en madera en descomposición, en donde se reportan densidades menores a 1×10^2 conidios/g de suelo; sin embargo, se pueden llegar a encontrar hasta 8×10^5 en suelos orgánicos (Michel-Aceves, 2001).

Taxonómicamente el género *Trichoderma* fue propuesto por Persoon (1794), con cuatro especies, posteriormente Rifai (1969) agregó 9 especies más, Bisset (1991) elevó algunas de las especies agregadas por Rifai a rango de sección, agrupándolas en cuatro secciones: *Longibrachitaum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Hypocreanum*. Actualmente, existen más de 100 especies de *Trichoderma* definidas filogenéticamente (Druzhinina *et al.*, 2006).

De acuerdo a las descripciones realizadas por Alexopoulos y Mims (1979) y Subramanian (1983), el género *Trichoderma* se ubica de la siguiente manera:

Reino: Mycetae

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hyphales (Moniliales)

Familia: Moniliaceae

El género presenta características como conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoidea nacidos en pequeños racimos terminales (Barnett y Hunter, 1972). Presenta conidios que van de globoso a sub globoso, elipsoidal u oblongo menores de 5 μm de largo y ancho, de color verde oscuro profundo cercano a gris pasando por verde y verde amarillo. La característica de los conidios

es que no están bien definidos y tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas, los agregados formados de hifas entrelazadas produciendo fiálides. Las clamidiosporas tienden a ser globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores de 15 μm de diámetro (Samuels, 1996). El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal (Fig. 1). Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas, son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. El micelio de *Trichoderma* produce una amplia variedad de enzimas, incluyendo celulasas y quitinasas que degradan celulosa y quitina, respectivamente. Es por ello que pueden crecer sobre madera (degrada) y parasitar a otros hongos como los fitopatógenos, ya que la pared celular del hongo está compuesta por quitina.

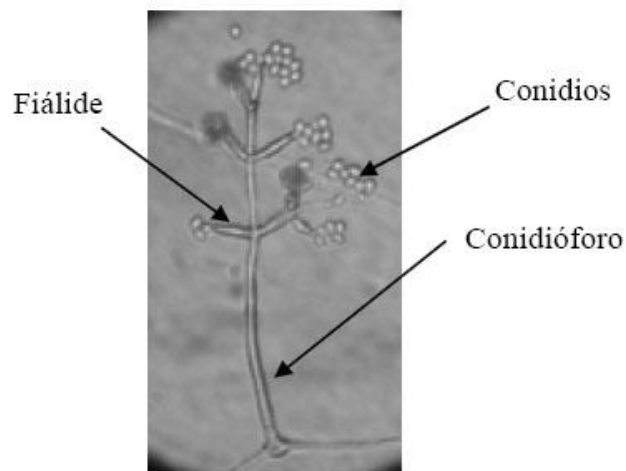


Figura 1. Conidios y conidióforos de *Trichoderma* spp. (400x).

2.4 Potencialidades del género *Trichoderma*

Cázeres-García *et al.* (2013), realizó un análisis evolutivo de las lacasas en *Trichoderma*, demostrando de manera general, que las lacasas extracelulares están sujetas a selección de purificación y que las lacasas intracelulares muestran una evolución neutral. Con estos estudios se puede entender mejor la fisiología de las lacasas de *Trichoderma* e incrementar

el potencial biotecnológico. Este potencial enzimático ha sido explotado para varios procesos, incluyendo el biopulping, la biorremediación, la degradación de colorantes, la conversión enzimática de intermediarios químicos, la síntesis de productos farmacéuticos, en alimentos, textiles, la química sintética, cosméticos, y la remoción de compuestos endócrinos (Gochev y Krastanov, 2007). Se sabe que el uso excesivo de fuentes de carbono tiene un efecto inhibitorio en la producción de lacasas, un aumento de glucosa en el medio disminuye la producción de la enzima. *Trichoderma* también participa activamente en la delignificación y biodegradación de celulosa en la naturaleza a azúcares más simples, el cultivo de este hongo usando como soporte bagazo de caña de azúcar es ampliamente utilizado.

En el laboratorio se cultiva fácilmente *Trichoderma* en diferentes sustratos, generalmente en granos enteros de arroz, utilizando pocos nutrientes en diferentes condiciones ambientales. Las esporas que producen se utilizan en el control biológico, usualmente la concentración de esporas que se necesitan es de 1×10^8 esporas mL^{-1} , los rangos de producción de esporas varían entre tratamientos y entre las cepas (Michel-Aceves *et al.*, 2001).

2.4.1 Actividad de la enzima lacasa

La lacasa es una enzima oxidoreductasa (p-difenol-oxígeno-óxidorreductasa, EC1.10.3.2). Son enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza; se ha reportado su presencia en animales, plantas y microorganismos (Lucas *et al.*, 2001). La lacasa es secretada por hongos basidiomicetos y resulta de gran importancia para el desarrollo de las fructificaciones y para la pigmentación conidial (Harman *et al.*, 1983). Esta enzima además de ser considerada importante en los procesos de degradación de la lignina, es capaz de oxidar fenoles y aminas aromáticas mediante un proceso de reducción de oxígeno molecular a agua en presencia de cobre, elemento presente en sus moléculas (Hublik y Schinner, 2000).

Se ha estudiado mucho el sistema enzimático de las lacasas por su potencial biotecnológico, descubriendo cada vez más aplicaciones y usos para ellas (Desai y Nityanand, 2011). A la fecha se han purificado y caracterizado más de 100 lacasas, con longitudes en la secuencia de sus genes, que varían entre 516 y 567 aminoácidos. Las lacasas muestran tramos largos de secuencias conservadas con interrupciones de tramos cortos con más variaciones (Kilaru *et al.*, 2006b). Para evidenciar la actividad de las lacasas, se hace indispensable el uso de mediadores para llevar a cabo su oxidación. Entre estos mediadores, el más comúnmente

usado ABTS (Fig. 2), se han utilizado con éxito en la oxidación de benzo-pireno y antraceno por la lacasa de *Trametes versicolor* (Esperanza-Ramírez *et al.*, 2003; Novotny *et al.*, 2004). Se pueden usar también mediadores naturales como fenol, anilina, ácido 4-hidroxibenzoico o alcohol 4-hidroxibenzílico, usados con igual eficiencia que el ABTS en la degradación de diferentes HAP por la lacasas de *T. versicolor* (Bourbonnais *et al.*, 1997).

Las lacasas son posiblemente las enzimas más prometedoras para remplazar muchos de los procesos químicos ya que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Kunamneni, 2007). Actualmente, se encuentran ya algunas lacasas en el mercado para la producción de textiles, alimentos y otras industrias, y existen muchas aplicaciones potenciales para las lacasas, que incluyen: blanqueo de pulpa de papel, de colorantes textiles, en síntesis orgánicos, usos ambientales y farmacéuticos y hasta en nanobiotecnología. Aportan ventajas adicionales, ya que consumen poca energía y son biodegradables, por lo que los procesos de biocatálisis con lacasas, pueden considerarse apropiados para desarrollar procesos industriales más eficientes, sustentables y protegiendo el ambiente.

2.4.1.1 Biorremediación en suelos contaminados

La industria petroquímica en México se ha desarrollado aceleradamente, generando diversos satisfactores económicos. Sin embargo, su expansión y desarrollo también ha dado origen a graves problemas ambientales, derivados de emergencias ambientales, con graves repercusiones a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas (Jiménez-Cisneros, 2001; SEMARNAT, 2007). Entre las causas que han generado este deterioro ambiental por la contaminación de cuerpos de agua y suelos a lo largo de todo el país, se encuentran las siguientes: (i) manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos; (ii) mantenimiento inadecuado o falta de éste en instalaciones petroleras; (iii) explosiones en instalaciones de alto riesgo; (iv) fugas en líneas de conducción y (v) derrames de hidrocarburos (CENAPRED, 2001; SEMARNAT, 2007). En el inventario de residuos peligrosos de PEMEX en el 2001 reportan la generación de más de 270 mil toneladas de residuos peligrosos.

Aproximadamente el 86% del volumen total de estos residuos, corresponden a lodos y recortes de perforación (72%), lodos aceitosos (8%) y aceites gastados (6%). Con respecto a los derrames y fugas de hidrocarburos, PEMEX reportó que durante el año 2001 hubo un total de 8,031 toneladas de hidrocarburos (crudo, diesel y gasolina) derramados en su mayoría en tierra, en los cuatro sectores de ductos del país (PEMEX, 2001). Esta última cifra es importante, ya que de esta manera puede estimarse la magnitud de la contaminación en los sitios cercanos a los derrames. Uno de los estados con mayor incidencia de sitios contaminados por actividades petroleras es Veracruz. De acuerdo con información de PEMEX, dos de los lugares más contaminados por hidrocarburos a nivel nacional son la refinería Lázaro Cárdenas y el pantano de Santa Alejandrina, ambos ubicados en el sureste de México.

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Van Deuren *et al.*, 1997). Los mohos que han demostrado buen desarrollo en medios de cultivo con petróleo o que han removido hidrocarburos de suelos contaminados son principalmente: *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces*, *Penicillium glabrum* y *Trichoderma* (Pérez Armendáriz *et al.*, 2004).

2.4.2 Control biológico

El control biológico (CB) utiliza organismos vivos; involucra también microorganismos cuya actividad biológica disminuye el daño causado por los patógenos de las plantas (Herrera–Estrella y Chet, 1998). Debido a este antagonismo se logra reducir o eliminar la incidencia del fitopatógeno. Independientemente de su actividad, un agente de biocontrol eficaz debe tener la capacidad de sobrevivir en el hábitat donde es aplicado. Este hongo hiperparásito actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, y micoparasitismo, además produce sustancias promotoras de crecimiento de las plantas (Stefanova *et al.*, 1999). Gran parte del potencial de este hongo radica en el hecho de que presenta un amplio espectro de antagonismo con la capacidad de controlar muchos fitopatógenos como *Rhizoctonia*,

Pythium, *Sclerotium* y *Phytophthora* entre otros, que afectan muchos cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijol, trigo, etc. (Chet *et al.*, 1998).

Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo. Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor sea la probabilidad de que un aislamiento de *Trichoderma*, manifieste varios modos de acción; más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, aspectos que no poseen los plaguicidas químicos (Infante *et al.*, 2009).

2.4.2.1 Producción de esporas

Las esporas de los hongos filamentosos útiles en agronomía se pueden obtener de diferentes maneras. Después del cultivo en medios nutritivos, los hongos pueden cultivarse en sustratos sólidos orgánicos o inertes, utilizando una suspensión de esporas. El más comúnmente usado es arroz precodido, de los inorgánicos utilizados son las partículas de poliestireno embebidas en una solución nutritiva para que crezca *Trichoderma*. La biomasa producida se deshidrata hasta una humedad de 4-6% para poder separar las esporas. Las esporas se preservan en soportes inertes estériles, como la arena, o simplemente se almacenan en contenedores de vidrio en condiciones de baja humedad y oscuridad. Las esporas producidas pueden utilizarse para preservar la cepa y para control biológico.

2.5 El ácido acetil salicílico (AAS)

El AAS, el éster salicílico del ácido acético es utilizado como analgésico, anti-inflamatorio no esterooidal, antipirético y antitrombótico. Una vez en el organismo, el ácido acetilsalicílico es hidrolizado a salicilato que también es activo. Salgado-Siclan (2012), menciona que el ácido acetilsalicílico es un metabolito secundario de síntesis orgánica, descendiente del fenol, dichos compuestos están ligados a las actividades de defensa de las plantas, así como, en el endurecimiento de la pared celular (ligninas), actividad antimicrobiana (Furanocumarinas, isoflavonoides y estilbenos), repelentes (taninos) y en procesos de señalización (AS). El AAS

(ácido acetilsalicílico) participa en procesos tales como: la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Rangel, 2010). Enríquez del Valle *et al.* (2001), utilizaron un medio de cultivo adicionado con AAS, para desarrollar las primeras raíces adventicias en tomate, después de cultivar el tomate en invernadero demostraron que las plantas previamente cultivadas en AAS tuvieron más biomasa acumulada.

Se ha propuesto un modo de acción para el AAS basándose en el hallazgo de que éste se une e inhibe a la enzima catalasa. La inhibición de la catalasa podría conducir a un incremento en la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o de otras especies reactivas de oxígeno derivadas de esta molécula. El H_2O_2 podría tener una actividad antibiótica en contra de patógenos. Otro mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico podría ser en la habilidad que tiene para formar por sí mismo radicales libres de AAS por medio de la inhibición de enzimas que contienen grupos hemo, tales como peroxidasa y catalasa, tales radicales fenólicos libres podrían activar reacciones de defensa (Rangel, 2010).

Otros estudios han reportado que el ácido salicílico induce la síntesis de unas proteínas llamadas Heat Shock Proteins (HSP) por sus siglas en inglés, en células Eucariotas (Amici *et al.*, 1995). Estas proteínas son producidas por las células cuando se encuentran en un medio ambiente que les produce estrés, son codificadas por elementos responsables del estrés, los cuales son desencadenados por condiciones como baja disponibilidad de nitrógeno, osmóticas, oxidativas, medios ácidos, altas temperaturas (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Otros estudios han manifestado que en el caso de los hongos estas proteínas están presentes de manera latente durante su crecimiento y al ser activadas causan un incremento en los niveles de tolerancia de estrés en las células (Higgins y Lilly, 1993, Resing *et al.*, 1998). En condiciones normales de estrés el AAS es capaz de estimular respuestas tan variadas en los hongos de tipo fisiológicas, reproductivas, adaptativas, etc.

Bioresearch (2010), menciona que el ácido acetilsalicílico (AAS) tiene como función la de romper las paredes celulares de las células del hongo, generando fitoalexinas para bloquear a los ataques a heridas en la planta; y también tiene como función disolver el exoesqueleto en ácaros. Rendón (2015), demostró que el ácido acetilsalicílico tiene un efecto en la fisiología de los hongos comestibles *Fistulina guzmanii*, *Volvariella bombycina* y *Hericiium*

erinaceus, eficiencia biológica y proteínas a una concentración de AAS 100 μ M. Agentes no esteroides antiinflamatorios con diferentes estructuras inhiben el crecimiento de *Trichoderma viride* (Krystofová *et al.*, 1994).

III. MARCO DE REFERENCIA

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de microorganismos, se han descrito aproximadamente 500,000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1.5 millones de especies. Presentan dos tipos de morfología, una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos o mohos, representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. Los hongos obtienen los nutrientes por absorción, este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado de carbono, como patógenos, o antagonicos de animales, plantas y otros hongos (Aristegui, 2002). Precisamente estos mecanismos de acción son los que los han caracterizado para su aplicación en procesos biotecnológicos.

3.1 Producción de enzimas lacasas por *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es un habitante natural de suelo, es cosmopolita. Se le puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y frías (Zhang *et al.*, 2005).

El potencial de las lacasas en el medio ambiente las ha convertido en un foco de atención, por tener una gama amplia de aplicaciones, tales como el bio-blanqueamiento en la pulpa de papel (Buchert *et al.*, 1994), degradación de colorantes textiles (Abadulla *et al.*, 2000), tratamiento de aguas residuales (Duran y Esposito, 2000). Las lacasas de *Trichoderma* se han estudiado en menor medida, comparada con aquellas producidas por los basidiomicetos. Pese a ello se ha reportado un potencial en la producción de estas enzimas en hongos Ascomycetos, las cuales pueden estar involucradas en la síntesis de melanina en las conidiosporas, en la inducción de cuerpos fructíferos y finamente en la interacción con fitopatógenos (Askwith *et al.*, 1994, Andberg *et al.*, 2009). La actividad de lacasas se ha asociado a la pared celular de esporas de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* (Holker *et al.*, 2002; Velázquez-Cedeño, 2002).

Las lacasas son capaces de oxidar un gran número de compuestos aromáticos (Bourbonnais y Paice, 1990). Aunado a ello los diferentes mecanismos del genero *Trichoderma* han sido explorados por su potencial para producir esta enzima (Sadhasiva *et al.*, 2007) y degradar

este tipo de compuestos como son PHS, BaP. Bajo este concepto se han destacado a las especies *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. viride*, (Revelet *et al.*, 2000; Saraswathy y Halberg, 2002).

Asimismo, recientemente se ha reportado la producción de lacasas en *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. reesei* y *T. atroviride* (Mathur *et al.*, 2013; Ga *et al.*, 2013; Sekeme *et al.*, 2013; Adnal *et al.*, 2015). Dado que *Trichoderma* produce grandes cantidades de celulasas es interesante saber si este hongo también produce lacasas en las mismas cantidades.

3.2 Biorremediación de suelos contaminados por *Trichoderma*

Las sustancias orgánicas están formadas de carbono, hidrogeno y oxígeno, algunos ejemplos son los terpenos, los ácidos grasos, las proteínas, carbohidratos, así como algunos compuestos contaminantes como los hidrocarburos del petróleo, los plaguicidas, colorantes, etc. (Argumedo-Delira, 2009) Algunas especies del género *Trichoderma* pueden degradar diferentes fuentes de residuos celulósicos y lignocelulósicos, lo cual presenta un alto potencial para contribuir en la degradación de compuestos contaminantes depositados en el suelo (Argumedo-Delira, 2011).

Estudios reciente han realizado pruebas con especies diferentes del género *Trichoderma*, en donde se somete al hongo a interactuar con contaminantes como son los PHAs y han encontrado que el hongo responde activando un complejo enzimático de lacasas para degradar estos compuestos (Zafra *et al.*, 2015). Lo cual demuestra el alto potencial del género para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados.

3.3 Producción de esporas por *Trichoderma*

Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos. Característica esencial de su antagonismo. *Trichoderma* spp., se encuentra en diferentes hábitats y suelos, la presencia de varias especies difiere entre hábitat y están influidas por las condiciones ambientales. Se pueden encontrar en el aire, plantas, pero esencialmente en suelos, incluyendo humus forestales y de madera en descomposición, se reportan densidades menores a 1×10^2 esporas g^{-1} de suelo; sin embargo, se pueden llegar a encontrar hasta 8×10^5 en suelos orgánicos (Michel, 2001).

La producción de esporas es la herramienta necesaria para la aplicación del hongo en los procesos de control biológico (Michel-Aceves *et al.* 2005). Numerosas son las técnicas que nos facilitan su producción a nivel artesanal, usando como sustrato tradicional el de la producción de hongos entomopatógenos (grano de arroz entero) obteniendo hasta 4.0×10^8 esporas mL^{-1} . Al evaluar otros sustratos podemos encontrar estudios como los de Ramos *et al.* (2008), quienes obtuvieron concentraciones de hasta 2.3×10^8 conidios/g en sustrato de cascarilla de arroz.

3.4 Uso de *Trichoderma* en el control biológico

La gran parte de los estudios con el hongo *Trichoderma* se han enfocado a la investigación de éste en el control biológico, caracterizándose por tener aplicación en el ámbito agrícola (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). La aplicación del hongo ha sido como antagonico de hongos fitopatógenos. Estas especies presentan diferentes mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos, tales como competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor sea la probabilidad de que un aislamiento de *Trichoderma*, manifieste varios modos de acción; más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, aspectos que no poseen los plaguicidas químicos (Infante *et al.*, 2009).

Este agente antagonista envuelve el hongo patógeno y penetra sus células causándole un daño extensivo a nivel celular (pared, membrana y desorden citoplasmático), principalmente en los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Harman *et al.*, 1981). Trabajos realizados por Benhamou y Chet (1993), mencionan que estos daños no son ocasionados por las sustancias producidas en el avance del antagonista, sino que los daños comienzan a observarse cuando ambos hongos tanto *Trichoderma* sp. como *Rhizoctonia solani* entran en contacto, reiterando que el mecanismo de acción es el micoparasitismo.

Dentro de las especies del género *Trichoderma* las que destacan por su aplicación para el control biológico son: *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, esta última es la más utilizada y reportada por Rojo *et al.* (2007).

3.5 Innovaciones biotecnológicas con hongos filamentosos

Los hongos filamentosos han sido utilizados por la biotecnología como biofábricas, para la obtención de metabolitos primarios, secundarios, antibióticos, enzimas, entre otros. Dentro de los géneros más estudiados por su aplicación biotecnológica destacan: *Penicillium*, *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, y otros más que se siguen sumando (Aguilar, 2012).

El primer y mayor uso industrial de *Penicillium* spp., ha sido la producción de penicilina. El descubrimiento de este metabolito de *P. notatum* (actualmente *P. chrysogenum*) por Alexander Fleming fue en 1928. El estudio éste género aumentó en años posteriores en busca de cepas que presentaran una gran producción de penicilina y en busca de nuevos antibióticos (Pitt, 1979). El uso de la penicilina como agente terapéutico comenzó a llevarse a cabo en los años 40. A partir de entonces y hasta nuestros días se ha utilizado cepas de esta especie en procesos industriales para producir el antibiótico (Martínez, 2003).

Los estudios más sobresalientes en el género *Metarizium* y *Beauveria* se han destacado en su aplicación como agentes de control de insectos plaga en el área agrícola. Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (Fan *et al.*, 2007). El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Tellez-Jurado *et al.*, 2009).

Dentro de las innovaciones del género *Trichoderma* destacan su potencial de liberar y sintetizar enzimas como polisacacarazas, celulasas, xilanasas y quitinasas (Verma *et al.*, 2007), las cuales se han aprovechado en procesos industriales como la fabricación de jugos, bebidas alcohólicas, producción de algunos combustibles, etc. (Galante *et al.*, 1993).

3.6 El género *Trichoderma* en la agricultura

Se ha estudiado la aplicación del género *Trichoderma* en la agricultura, únicamente para el control biológico de hongos fitopatógenos, sin embargo, recientes investigaciones proponen el uso del este recurso genético en una gama amplia de aplicaciones agrícolas como son biopesticidas, biofungicidas, bioprotectantes, bio-inoculantes, bioestimulantes,

biodescomponedores, biofertilizantes, promotores del crecimiento vegetal, como mejorador de la germinación de semillas, entre otros (Woo *et al.*, 2014). Además, se conoce que la activación de las enzimas lacasas en el hongo *Trichoderma* se utilizan para la biorremediación de herbicidas, pesticidas y explosivos en el suelo, como un agente de limpieza para sistemas de purificación de agua (Adrio y Demain, 2014).

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Con la llegada de la revolución verde a mediados del siglo XX, como modelo implementado en la agricultura para incrementar el rendimiento y satisfacer la demanda de alimentos (Pichardo, 2006), se implementaron un gran número técnicas que involucraron la aplicación de sustancias tóxicas como pesticidas, herbicidas, fertilizantes sintéticos derivados del petróleo, etc., que permitían lograr estos objetivos. Desde ese momento hasta la actualidad han provocado daños en el medio ambiente y la salud humana. Entre las alternativas que existen para mitigar estos efectos y disminuir la aplicación de estas sustancias, están los microorganismos, tales como los hongos del género *Trichoderma*. Estos hongos se caracterizan por predominar en ambientes terrestres y acuáticos, por su facilidad para ser aislados y cultivados, y a su rápido crecimiento en un gran número de sustratos (Papavizas *et al.*, 1982; Bell *et al.*, 1982).

Estudios recientes han destacado la importancia de algunas especies de *Trichoderma* por la expresión de enzimas de interés colectivo para la biorremediación de suelos contaminados (Marco-Urrea *et al.*, 2015). La aplicación del hongo *Trichoderma* ha enfocado sus estudios al ámbito agrícola, principalmente como antagonista de hongos fitopatógenos (Argumedo-Delira, 2009), además de ello se ha encontrado un potencial en biorremediación de herbicidas, pesticidas en el suelo y como un agente de limpieza de agua (Adrio y Demain, 2014). El ácido acetil salicílico (AAS) es una sustancia derivada del ácido salicílico, la cual tiene un grupo de sustancias conocidas como fenólicas. Por tal motivo, el AAS también puede ser considerado como sustrato que promueve la activación de enzimas debido a su naturaleza fenólica (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004). Esta sustancia se ha aplicado en investigaciones con plantas, al ser considerado como promotor de la resistencia biótica y abiótica en plantas (Khan *et al.*, 2010). Otros estudios han reportado que el ácido salicílico induce la síntesis de unas proteínas llamadas Heat Shock Proteins (HSP) por sus siglas en inglés, en células Eucariotas (Amici *et al.*, 1995). Estas proteínas son producidas por las células cuando se encuentran en un medio ambiente que les produce estrés (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). En condiciones normales de estrés el AAS es capaz de estimular en los hongos, respuestas tan variadas de tipo fisiológicas, reproductivas, adaptativas. etc. Por lo que su uso en hongos resulta promisorio para estimular su desarrollo. En la presente investigación se evaluó el efecto *in vitro* del AAS en el crecimiento de cuatro especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*,

T. aggressivum f. *aggressivum*, *T. pleuroti* y *T. atroviride*). Se determinó el efecto del AAS en diferentes concentraciones sobre las cepas de *Trichoderma* aisladas del sustrato de hongos comestibles, lo que puede ampliar una gama de nuevas aplicaciones biotecnológicas.

V. HIPÓTESIS

El ácido acetilsalicílico tendrá un efecto en alguna de cepas de *Trichoderma* para aprovechar el crecimiento, producción de esporas y enzimas, evidenciando su potencial biotecnológico.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido acetilsalicílico en la fisiología y actividad enzimática de las lacasas en diferentes cepas de *Trichoderma* aisladas de los sustratos de cultivo de hongos comestibles con el objetivo de identificar aplicaciones biotecnológicas potenciales.

6.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del AAS sobre la fisiología de diferentes especies de *Trichoderma* aisladas de sustratos de cultivo de hongos comestibles cultivados.
2. Determinar el efecto del AAS en la actividad enzimática de las lacasas y producción de esporas en diferentes especies de *Trichoderma* aisladas de sustratos de cultivo de hongos comestibles cultivados.
3. Proponer una estrategia para aprovechar las potencialidades de las cepas de *Trichoderma* en el sector agrícola.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El diagrama general de las actividades realizadas durante en trabajo de investigación se muestra en la figura 2.

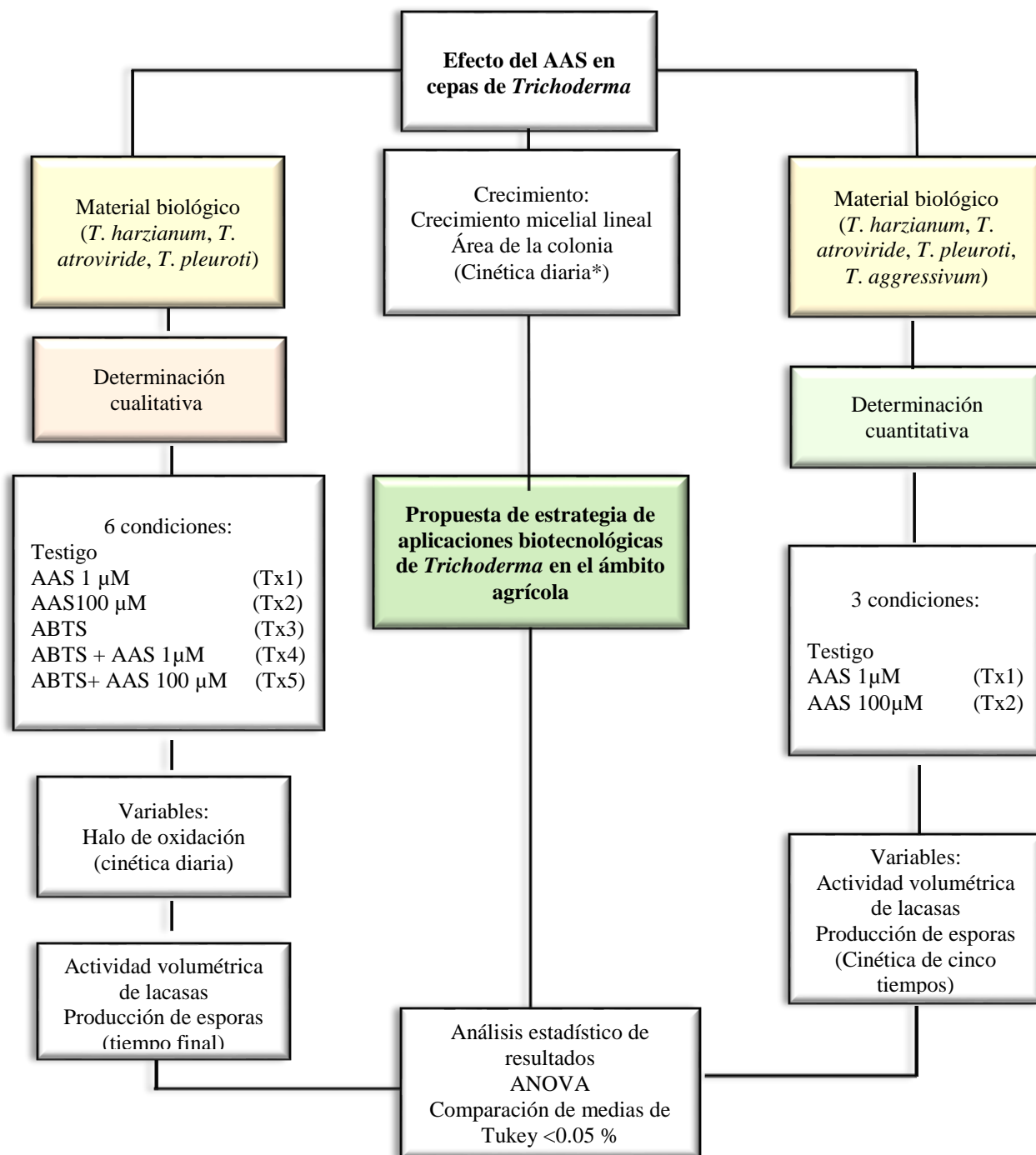


Figura 2. Metodología general de la investigación realizada en el presente estudio. * Cinética de cinco tiempos únicamente para la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

7.1 Material biológico

Las cuatro cepas de *Trichoderma* (Cuadro 1), evaluadas en esta investigación fueron seleccionadas del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles Funcionales y Medicinales, del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla (Sobal *et al.*, 2007) (Anexo 1).

Cuadro 1. Cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas en el trabajo de investigación.			
Registro	Especie	Procedencia	Cultivo asociado
CPM-108	<i>T. harzianum</i> (Rifai, 1969).	Módulo del <i>Campus</i> Puebla	<i>Ganoderma</i> spp.
CPM-113	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (Samuels and W. Gams, 2002).	Hongos El Riojal, Xalapa, Veracruz	Compost de <i>Agaricus bisporus</i>
CPM-115	<i>T. pleuroti</i> (S.H. Yu and M.S. Park, 2006)	Guanajuato, Gto.	<i>Pleurotus</i> spp.
CPM-121	<i>T. atroviride</i> (P. Karsten, 1892).	Módulo del <i>Campus</i> Puebla	<i>Ganoderma</i> spp.

7.2 Condiciones de estudio

7.2.1 Preparación del inóculo

Para evitar contaminación por bacterias en el inóculo, a las cepas almacenadas se les realizó una prueba de pureza. Éstas se sembraron en medio de cultivo PDA adicionado con gentamicina al 2%, por duplicado. Después de tres días de incubación se resembraron únicamente en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA, Bioxon). Con ayuda de una aguja estéril, se tomó un segmento de micelio de cada una de las cajas a resembrar, de acuerdo a la metodología descrita por Cañedo y Ames (2006), éste se colocó en el centro de la caja Petri. Las cajas recién sembradas se dejaron incubar durante tres días. Dicho procedimiento se realizó por triplicado en cada una de las cepas a resembrar.

7.2.2 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en la presente investigación fue Agar Dextrosa y Papa (PDA, Bioxon). Se elaboraron dos soluciones de AAS (Sigma), a una concentración de 1 y 100 μ M, las cuales se utilizaron para preparar el medio de cultivo (39 g/l). Se colocaron 25 mL de medio de cultivo en tubos de ensaye de 30 mL, con tapa de vaquelita, los tubos con su respectivo tratamiento y testigo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. En cámara de flujo laminar (VECO, México) se colocaron las cajas Petri de 100x15 mm

(SYM Laboratorios, México), a las cuales se les vertió, el contenido estéril de cada tubo hasta gelificar.

Las condiciones experimentales finales que se obtuvieron fueron 6:

Testigo: PDA

Tx1: AAS 1 μ M

Tx2: AAS 100 μ M

Tx3: ABTS 0.5 mM

Tx4: ABTS 0.5mM + AAS 1 μ M

Tx5: ABTS 0.5 mM + AAS 100 μ M

7.2.3 Inoculación de los tratamientos

Del inóculo preparado anteriormente, se cortaron círculos de 5 mm de diámetro con ayuda de un popote estéril. Dichos círculos se colocaron en un extremo de la placa Petri (Samuels *et al.*, 2002) (Fig. 2). Todas las placas una vez inoculadas selladas y rotuladas, se incubaron a temperatura ambiente.

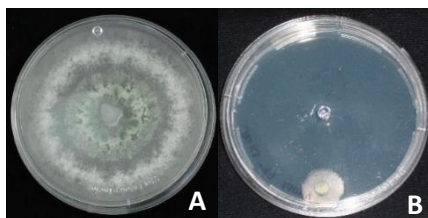


Figura 3. Desarrollo de la colonia de las cepas en estudio. A) Caja Petri colonizada completamente para la obtención del inóculo. B) Colocación del inóculo en la caja Petri.

7.3 Caracterización de las cepas estudiadas

Se realizó una descripción de las características morfológicas de cada cepa. Las variables que se evaluaron para la caracterización morfológica se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas del crecimiento micelial de la colonia al final de la cinética.	
Variable	Característica
Color	Apariencia visual
Color, código pantone	Tabla de colores (Pantone, 2001, Fiery, E.U.A.)
Textura	Lanosa, algodonosa, pulverulenta, aterciopelada, postrada
Densidad	Escaso, regular, abundante
Micelio aéreo	Escaso, Abundante
Borde de la colonia	Regular, irregular

7.3.1 Cinética de crecimiento

Para calcular el crecimiento micelial se realizó una toma fotográfica de cada una de las cepas y sus tratamientos con sus respectivas réplicas cada 24 horas. Únicamente para la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se realizó cada tres días hasta completar la colonización de cada una de ellas. Las cajas Petri se colocaron sobre una superficie inclinada teniendo un fondo negro y una regla metálica como escala. La captura fotográfica se llevó a cabo con una cámara Ciber- Shot (DSC-H7 SONY) montada sobre un tripie. Cada una de las imágenes se ordenaron por día de incubación, número de cepa y tratamiento.

7.3.1.1 Velocidad de crecimiento y área de la colonia

Con ayuda del programa Image J, 1.47 v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) se procesaron las fotos capturadas para realizar la correspondiente medición, según Camacho (2013). La velocidad de crecimiento (cm/día), se midió de manera lineal desde el extremo final del punto del inóculo, hasta el borde de la colonia. El área de la colonia se midió rodeando el micelio formado hasta el borde de la colonia. Los datos fueron guardados en una hoja de cálculo Excel versión 2010 y se determinó el promedio y la desviación estándar de las réplicas de cada cepa (n= 6).

7.4 Determinación de la actividad de la enzima lacasa

7.4.1 Evaluación cualitativa

En la determinación cualitativa se evaluaron únicamente tres cepas de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. pleuroti* y *T. atroviride*. Las condiciones fueron igualmente 6: Testigo (PDA), Tx1 (AAS 1 μ M), Tx2:(AAS 100 μ M), Tx3: (ABTS 0.5 mM), Tx4: (ABTS 0.5mM + AAS 1 μ M), Tx5: (ABTS 0.5 mM+ AAS 100 μ M). Las variables a considerar fueron halo de oxidación, únicamente para CPM-121, actividad de lacasas y producción de esporas. En el cuadro 3 se muestran las variables y el tiempo de toma de muestra de cada una de ellas.

Cuadro 3. Muestreo de las variables estudiadas en la prueba cualitativa.	
Variables	Toma de muestra
Halo de oxidación	Diariamente
Actividad de lacasas	Tiempo final de incubación de cada cepa
Producción de esporas	Tiempo final de incubación de cada cepa

7.4.1.1 Medición del halo de oxidación

Se midió el área del halo (cm^2) producido diariamente por la oxidación del sustrato expresado en el cambio de coloración en el medio de cultivo, según lo propuesto por Camacho (2013).

7.4.2 Evaluación cuantitativa

Las cepas evaluadas en esta prueba fueron cuatro: CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* y CMP-121 de *Trichoderma atroviride*, las condiciones fueron 3: Testigo (PDA), Tx1 (AAS 1 μ M), Tx2:(AAS 100 μ M). Las variables estudiadas fueron actividad de lacasas y producción de esporas para todas las cepas, bajo una cinética de cinco tiempos a diferentes días de incubación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Muestreo para determinar la actividad de lacasas y producción de esporas de cada cepa.		
Cepa	Especie	Toma de muestra
CPM-108	<i>Trichoderma harzianum</i>	Diaria a partir del día 2
CPM-113	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Cada 3 días
CPM-115	<i>Trichoderma pleuroti</i>	Diaria a partir del día 2
CPM-121	<i>Trichoderma atroviride</i>	Cada 2 días

7.4.3 Determinación de la actividad de lacasas

En la figura 4, se puede observar el diagrama general para la obtención del sobrenadante.

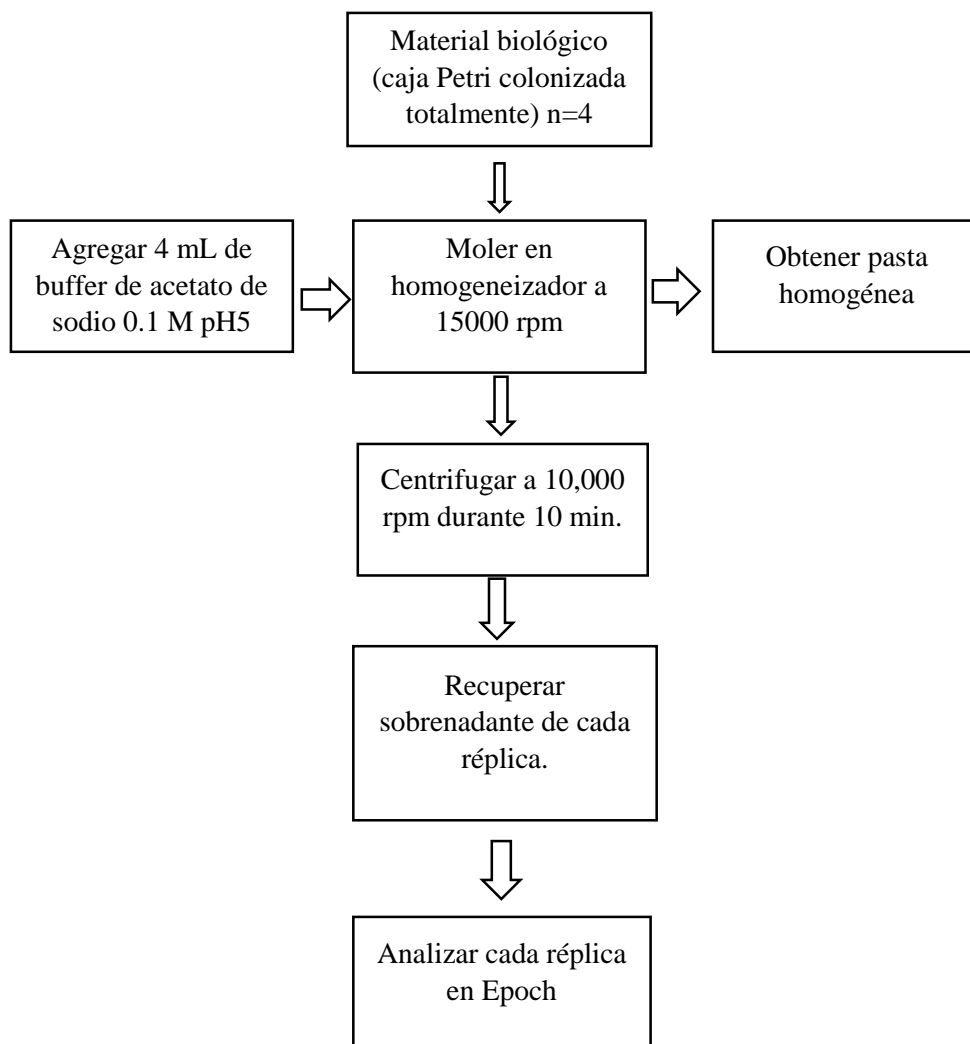


Figura 4. Diagrama para la obtención del sobrenadante del cultivo de las especies de *Trichoderma* en PDA.

Para obtener el sobrenadante, el medio de cultivo de cada caja Petri se molió en un homogeneizador (Pro 250, pro Scientific) con un generador de 20x150 mm estéril, a 15,000 rpm, durante 2 minutos, usando 4 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 5. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos (Sigma 4K 15, Alemania). El sobrenadante se colocó en viales y se conservó a 4 °C hasta su uso. La figura 5 muestra el proceso para la realización de la actividad volumétrica de lacasas.

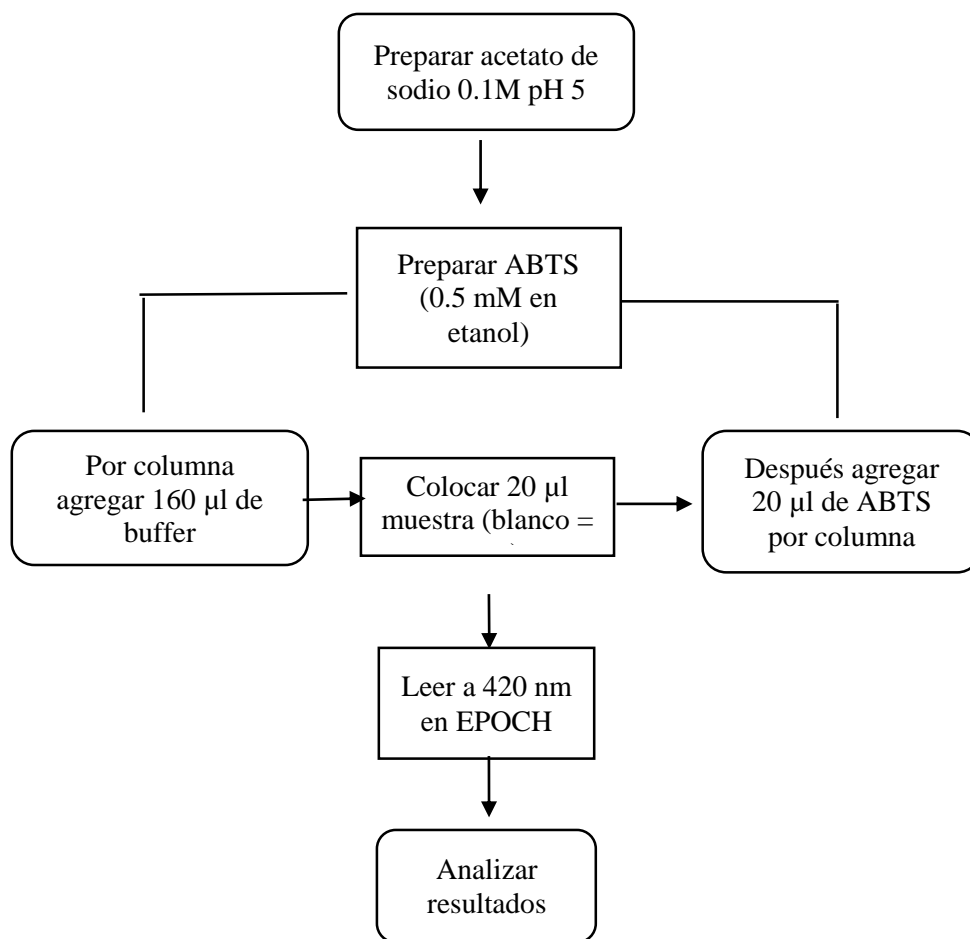


Figura 5. Diagrama general para la realización del análisis de la actividad de lacasas.

La actividad volumétrica de lacasas se realizó mediante la oxidación del sustrato, el ácido 2, 2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS, Sigma), usando como buffer acetato de sodio 0.1 M, pH 5. La reacción se llevó a cabo en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con base en forma de U estéril (Kima, Vacutest). La mezcla de la reacción se realizó con ayuda de una pipeta multicanal con 8 puntas (Gilson, Francia), cada pozo contenía lo siguiente: 160 µL de acetato de sodio 0.1 M, pH 5, 20 µL de la muestra o el blanco y 20 µL de ABTS 1 mM. El volumen total de la reacción fue de 200 µL por pozo. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de microplaca (Epoch, Biotek) a 420 nm, durante ocho minutos con intervalos de un minuto ($\epsilon=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Matsumura *et al.*, 1986). La actividad volumétrica de lacasas se expresó en UmL^{-1} . Una unidad de actividad enzimática, se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 mol de ABTS por minuto (Borbounnais *et al.*, 1997).

7.4.4 Producción de esporas

El diagrama general del conteo de esporas realizado en el estudio, se observa en la figura 6.

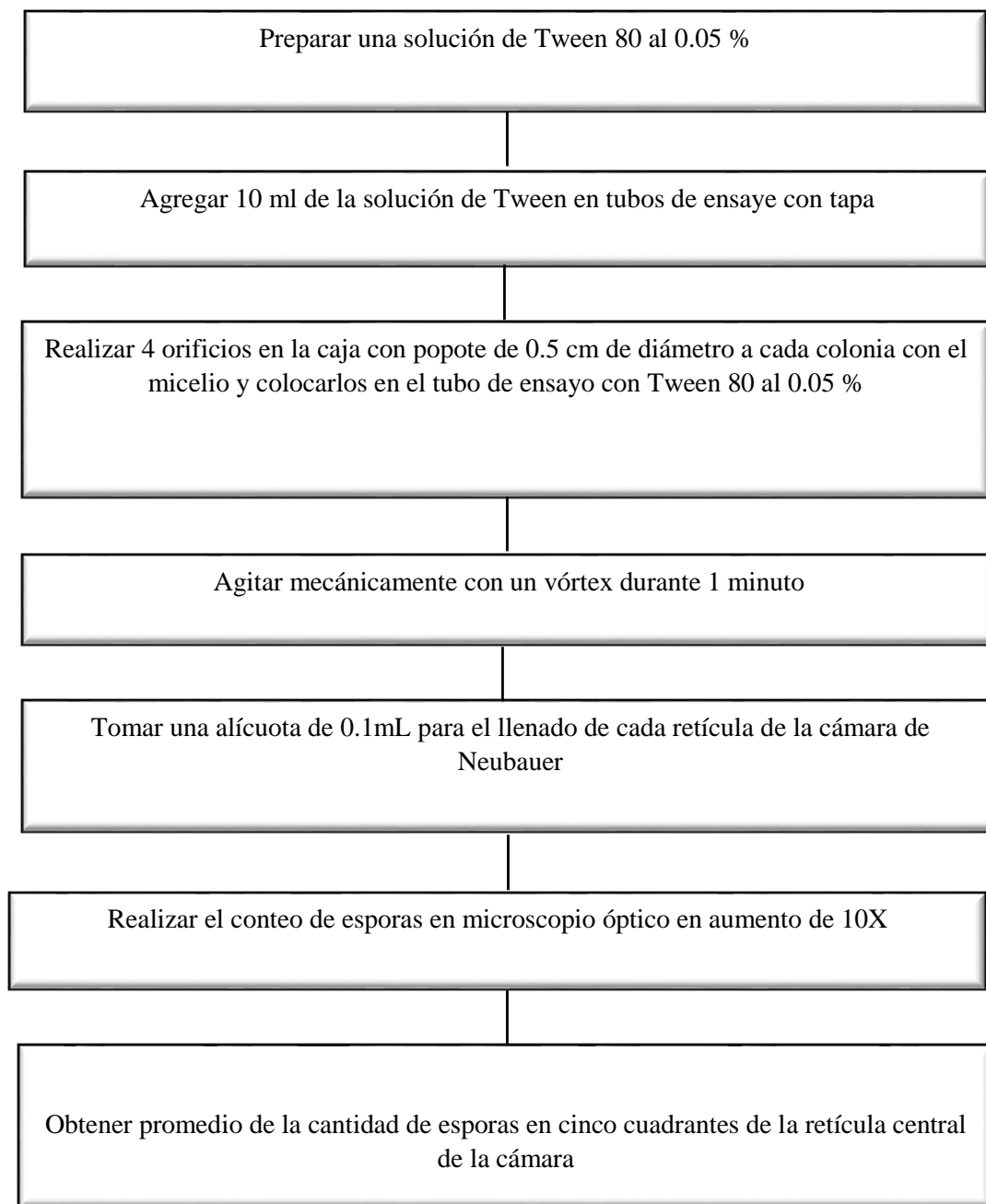


Figura 6. Diagrama general para el conteo de esporas en cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas mL^{-1} .

Se realizó un conteo de esporas en cámara de Neubauer doble a partir del día tres de acuerdo a la técnica descrita por Martínez–Carrera (1993). Los resultados se reportaron en producción de esporas mL⁻¹. Para el conteo se realizó una suspensión de esporas tomando 4 muestras de agar colonizado homogéneamente por el micelio de las cuatro cepas de *Trichoderma*, con ayuda de un popote estéril se cortaron círculos de 5 mm de diámetro, las muestras se tomaron de la caja de manera homogénea muestreando periferia y centro (Reyes, 2013), para todos los casos, los cuatro inóculos se colocaron en un tubo de ensaye con 10 ml de agua destilada estéril con Tween al 0.05 % (Sexana *et al.*, 2001). Se agitaron mecánicamente con un vórtex por 1 minuto y se tomó una alícuota de 0.1 mL para el llenado de cada retícula de la cámara de Neubauer. El conteo se realizó en ambas retículas con un microscopio óptico en aumento de 10 X. Se obtuvo el promedio de la cantidad de esporas encontradas en los cinco cuadrantes de la retícula central de la cámara de Neubauer, la cual esta estandarizada con la capacidad de 0.0001 mL. La determinación de la cantidad de esporas por mililitro se realizó de acuerdo al Manual–Bio-rad (2000).

7.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey con un $\alpha= 0.05\%$ con tres repeticiones. Todo ello realizado mediante el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

VIII. RESULTADOS

Los resultados del análisis cualitativo y cuantitativo para determinar la actividad de la enzima lacasa en cepas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de substratos de diversos hongos comestibles en presencia dos concentraciones de ácido acetilsalicílico (AAS) y de ABTS y sus mezclas respectivas, evidenciaron cambios en la morfología macroscópica, en el crecimiento, así como la cuantificación de esporas y lacasas. En el primer estudio se evaluaron tres cepas de *Trichoderma*, la cepa CPM-108 de *T. harzianum*, CPM-115 de *T. pleuroti* y CPM-121 de *T. atroviride*. Se llevó a cabo una cinética diaria para caracterizar la morfología macroscópica y el crecimiento, mientras que la producción de esporas y la actividad de lacasas se cuantificó al tiempo final de incubación de cada cepa. Para el caso del análisis cuantitativo se realizó una cinética de cinco tiempos para medir todas las variables en cuatro cepas, a saber: CPM-108 de *T. harzianum*, CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *T. pleuroti* y la CPM-121 de *T. atroviride*.

8.1 Caracterización de las cepas estudiadas

8.1.1 Morfología

En todas las cepas la presencia del AAS no interfirió en la morfología ni el crecimiento, ya que al compararlas con el testigo se observaron similares. Para el caso de los tratamientos que contenían ABTS y su combinación con AAS, se observó un estímulo en apariencia, color, densidad de esporas y micelio. A continuación se muestran los resultados morfológicos por cepa tanto en la prueba cualitativa como la cuantitativa.

8.1.1.1 CPM-108 de *T. harzianum*

Esta cepa presentó un crecimiento precoz, formando anillos concéntricos hacia el borde de la colonia, la coloración varió de tonalidades en los primeros días de incubación, fue desde amarillo hasta verde intenso (Cuadro 5). Al hacer la comparación entre las dos cinéticas de crecimiento los cambios observados entre los tratamientos de AAS (Tx1, Tx2, Tx3) no fueron muy distintos entre ellos, ya que la abundancia tanto de esporas como de micelio fue parecida, la coloración cambió entre cada tratamiento pero no varió mucho del testigo (Figs. 7 y 8). Al evaluar los tratamientos que contenían ABTS (Tx3, Tx4 y Tx5), se observó una mayor intensidad en el color, así como densidad de las esporas y micelio (Fig. 7).

Cuadro 5. Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, cultivada en PDA en diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color (código Pantone)	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde de la colonia
Testigo	Verde bandera (7483)	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx1	Verde Limón (396)	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx2	Verde olivo (576)	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx3	Verde olivo (7488)	Algodonosa	Muy abundante	Abundante	Regular
Tx4	Verde intenso (7483)	Algodonosa	Muy abundante	Abundante	Regular
Tx5	Verde intenso (7484)	Algodonosa	Muy abundante	Abundante	Regular

Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

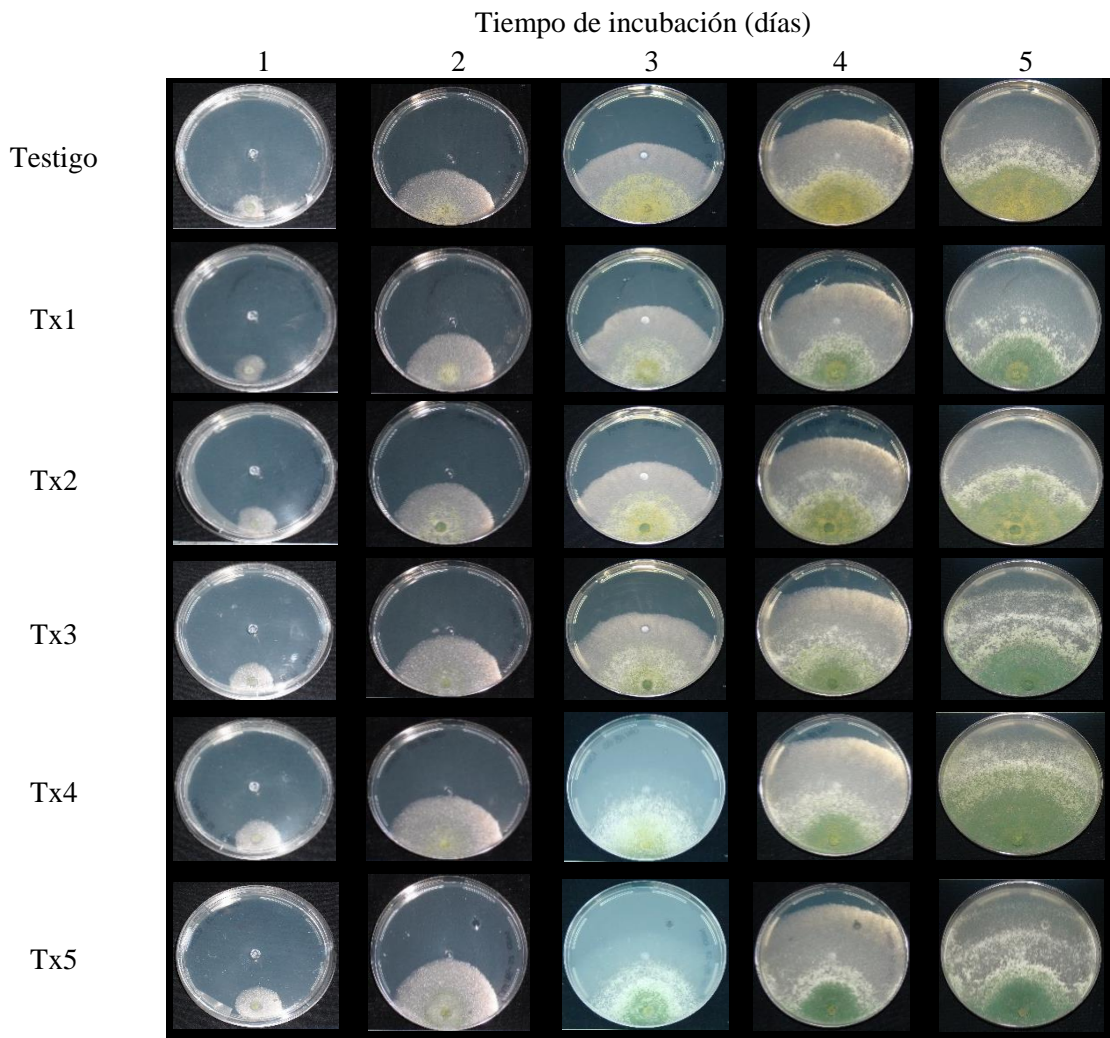


Figura 7. Morfología de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, cinética diaria de la prueba cualitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

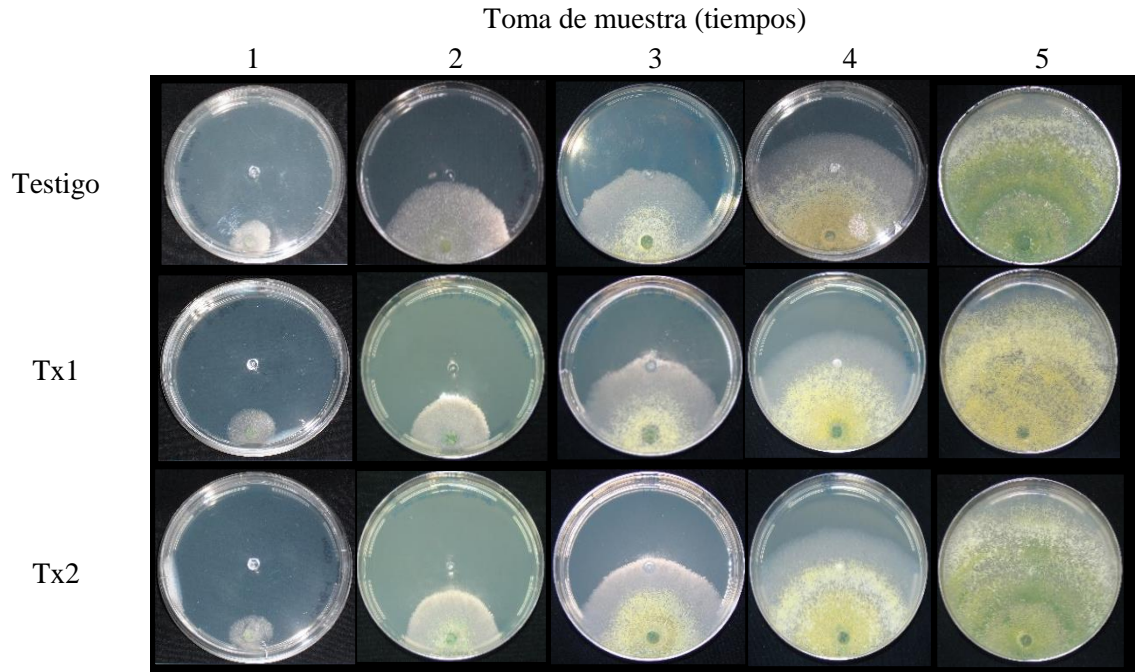


Figura 8. Morfología de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.

8.1.1.2 CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

Esta cepa únicamente fue evaluada con los tratamientos de AAS (Tx1, Tx2 y Tx3). Su crecimiento fue lento y la colonia irregular. La coloración fue de un amarillo ligero hasta un verde seco (Cuadro 6). En los primeros días solo se desarrolló micelio de tipo postrado, hasta el tercer día cuando aparecen los conidios en forma de pústulas de color blanco que posteriormente se tornan amarillas. Al comparar el testigo con los tratamientos Tx2 y Tx3, se observó un crecimiento similar, la colonia no cambió en su forma, pero se notó una estimulación ya que la densidad y coloración de esporas y micelio se tornó más intensa (Fig. 9).

Cuadro 6. Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, cultivada en diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color (código Pantone)	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde de la colonia
Testigo	Verde amarillento (383, 1345)	Algodonosa	Escasa	Escaso	Irregular
Tx1	Verde seco –amarillo (104,1205)	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx2	Verde olivo- amarillo (7496,1205)	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular

Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

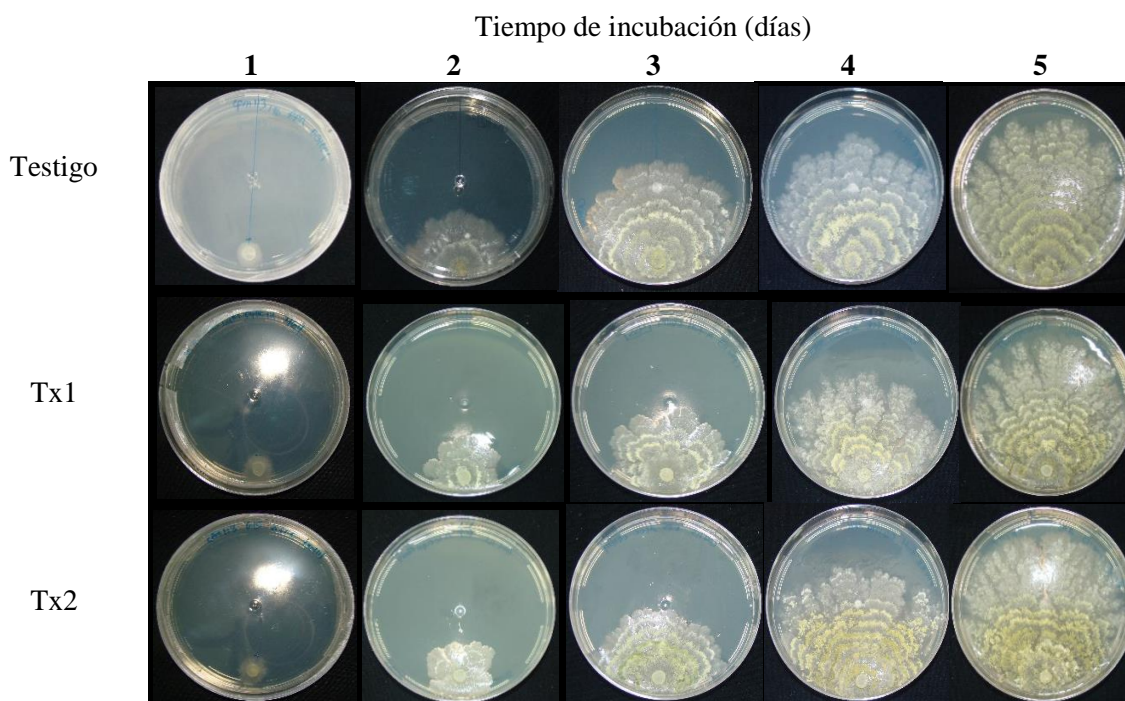


Figura 9. Morfología de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.

8.1.1.3 CPM-115 de *T. pleuroti*

La cepa CPM-115 presentó un crecimiento rápido. La forma de la colonia fue regular formando anillos concéntricos hasta el borde. La coloración fue al inicio de color amarilla tornándose a verde (Cuadro 7). Para esta cepa se realizaron los análisis morfológicos tanto cualitativo como cuantitativo. Se pudo apreciar que cuando se comparan ambas cinéticas, existe un efecto del AAS sobre la morfología de la cepa habiendo variaciones entre ambas. Cuando se observó la cinética cualitativa se aprecia un estímulo con el tratamiento Tx1 de

AAS 1 μM , ya que se nota una mayor coloración y densidad de esporas y micelio en comparación con el testigo. En la segunda cinética se aprecia que el testigo tanto en color como en densidad de esporas y micelio fue mayor que los tratamientos con AAS (Tx1 y Tx2), mientras que estos últimos se presentan similares en color. Para el caso del tratamiento Tx1 se observó una densidad de esporas y micelio ligeramente mayor que en Tx2 (Figs. 10 y 11). Al evaluar los tratamientos con ABTS (Tx3, Tx4 y Tx5) el color se presentó más intenso en los tratamientos que contenían AAS, hubo similitud en la densidad de esporas y micelio (Fig. 10).

Cuadro 7. Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* cultivada en diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color (código Pantone)	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde de la colonia
Testigo (PDA)	Verde limón (361)	Lanosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx1	Verde intenso (364)	Lanosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx2	Verde limón (396)	Lanosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx3	Verde olivo (391)	Algodonosa	Muy Abundante	Regular	Regular
Tx4	Verde intenso (364)	Algodonosa	Muy Abundante	Regular	Regular
Tx5	Verde intenso (356)	Algodonosa	Muy Abundante	Regular	Regular

Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM . Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μM . Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μM .

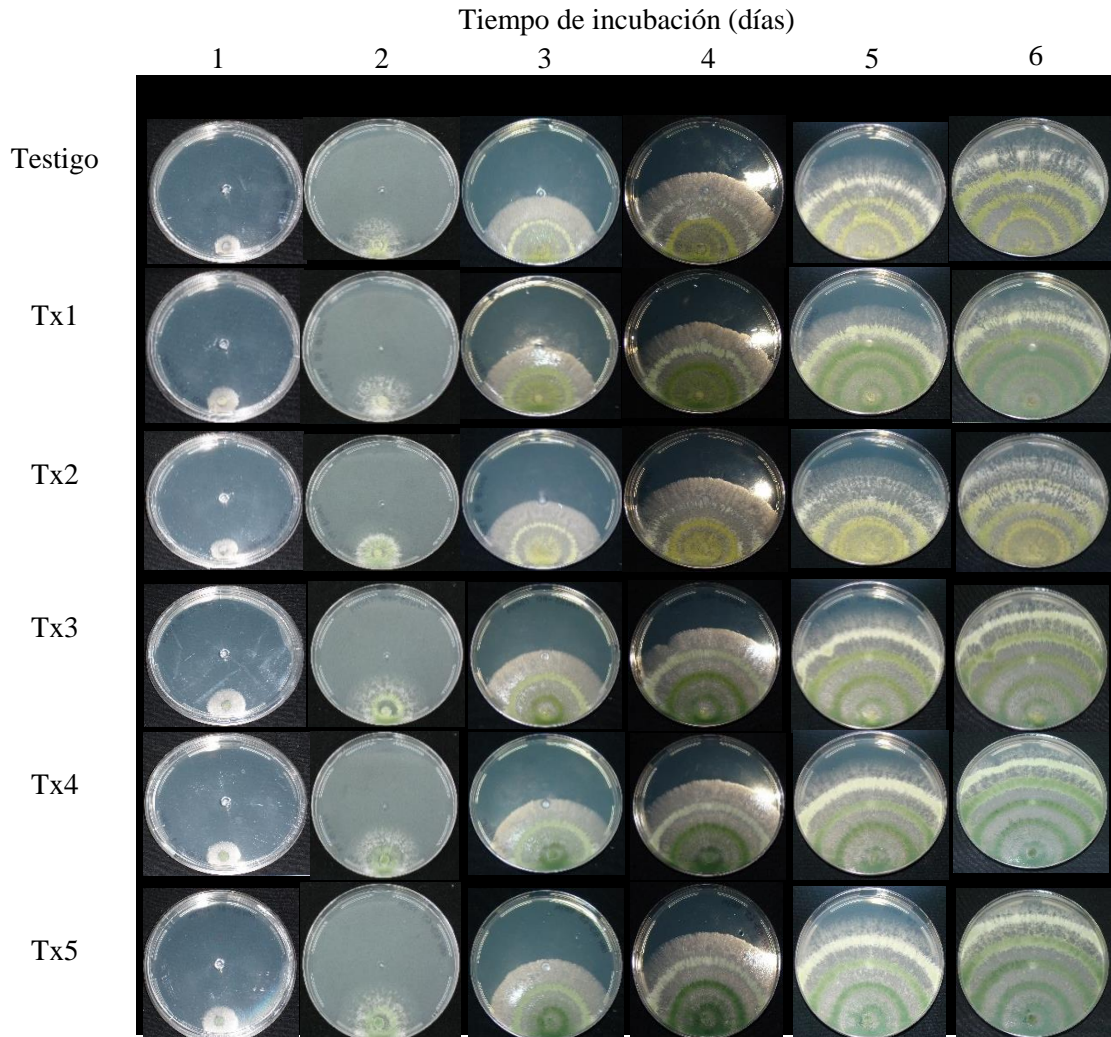


Figura 10. Morfología de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, cinética diaria de la prueba cualitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

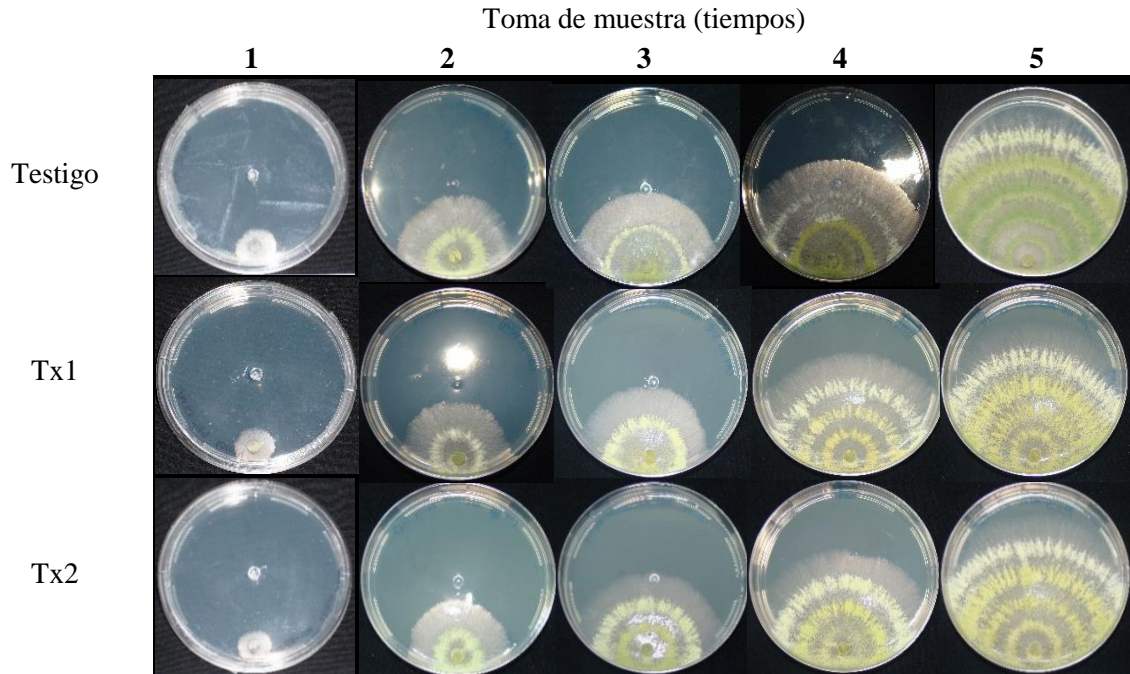


Figura 11. Morfología de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.

8.1.1.4 CPM-121 de *T. atroviride*

La cepa presentó un crecimiento regular, la colonia formó anillos concéntricos hacia el borde, al inicio de su crecimiento cada anillo fue de color blanco y se tornó a verde intenso cuando se formaba uno nuevo (Cuadro 8). Esta cepa fue evaluada para las dos pruebas enzimáticas. Al comparar los tratamientos con AAS se observó una variación entre ambas cinéticas, en el primer caso no hubo diferencia en la apariencia entre los tratamientos, mientras que en la segunda cinética se ve un efecto inhibitorio en los AAS comparados con el testigo, ya que la densidad y el color de esporas disminuyó (Figs. 12 y 13). Cuando se evaluaron los tratamientos que contenía ABTS se observa que hay efecto estimulante por el sustrato, ya que se aprecia una coloración, densidad de esporas y micelio más intensos que el testigo. En apariencia se pudo notar que el tratamiento Tx5 presentó mayor densidad, seguido por el testigo y finalmente el tratamiento Tx4 (Fig. 12).

Cuadro 8. Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, cultivada a diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color (código pantone)	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde de la colonia
Testigo	Verde intenso- Amarillento (7483)	Algodonosa	Regular	Escaso	Regular
Tx1	Verde- grisáceo (5845)	Algodonosa	Escaso	Escaso	Regular
Tx2	Verde grisáceo (5845)	Algodonosa	Escaso	Escaso	Regular
Tx3	Verde olivo (7491)	Algodonosa	Muy Abundante	Abundante	Regular
Tx4	Verde intenso (7481)	Algodonosa	Muy Abundante	Regular	Regular
Tx5	Verde intenso (7484)	Algodonosa	Muy Abundante	Abundante	Regular

Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

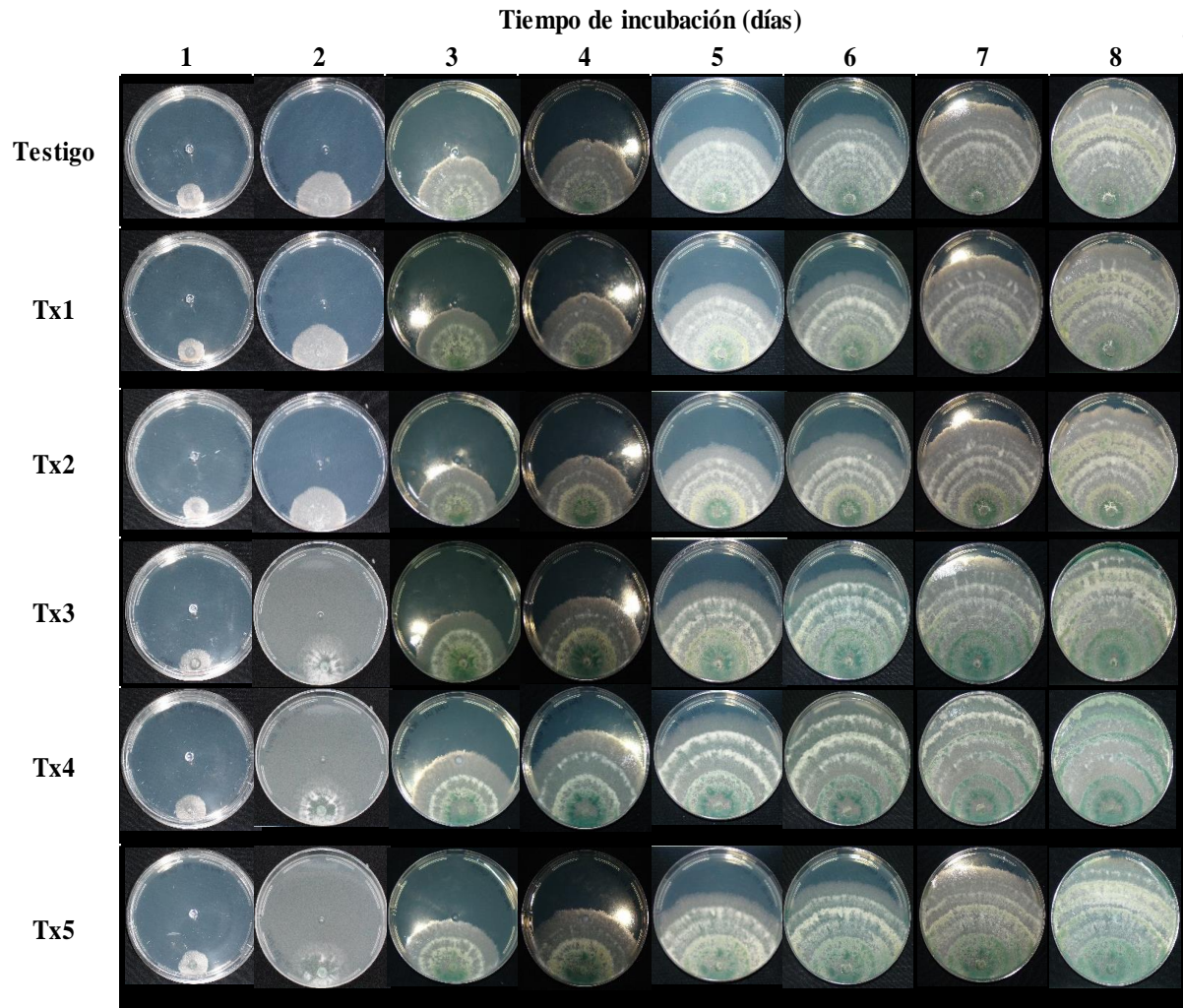


Figura 12. Morfología de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, cinética diaria de la prueba cualitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

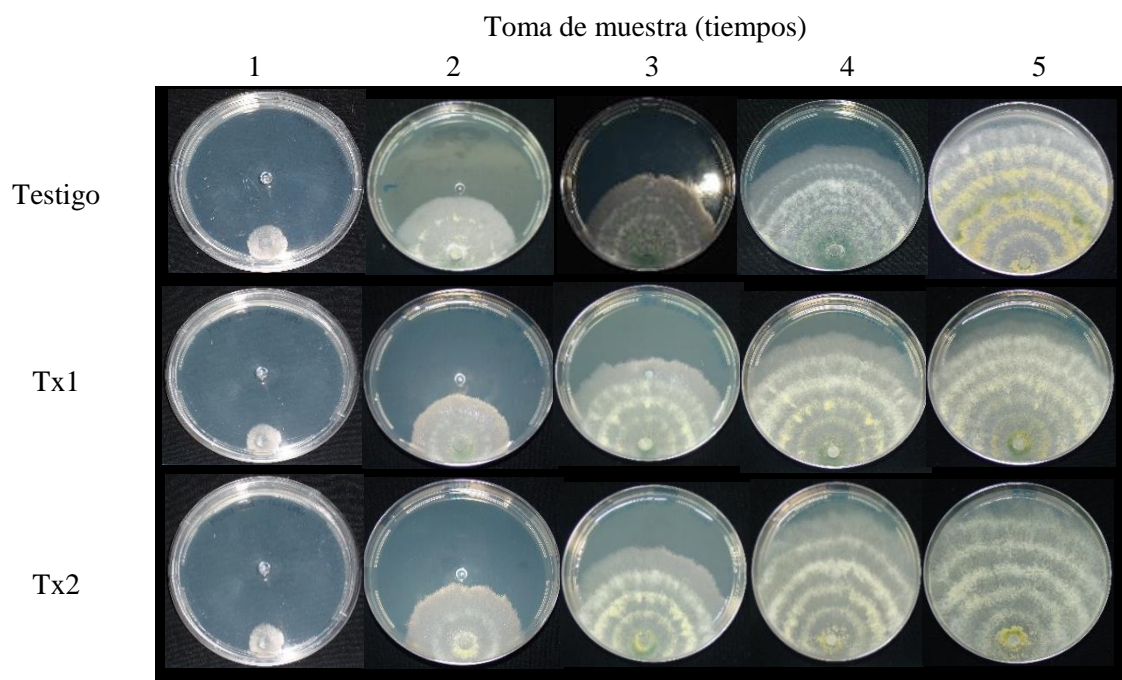


Figura 13. Morfología de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, cinética de cinco tiempos de la prueba cuantitativa. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.

8.1.2 Velocidad de crecimiento lineal del micelio (cm/día)

En general se pudo apreciar que las cepas de *Trichoderma* evaluadas presentaron un crecimiento diferente, ya que no todas colonizaron la caja Petri en el mismo día. En cuanto a los tratamientos con sólo AAS y en su combinación con ABTS se encontró que los segundos presentaron mayor crecimiento en todas las cepas evaluadas (Fig. 14).

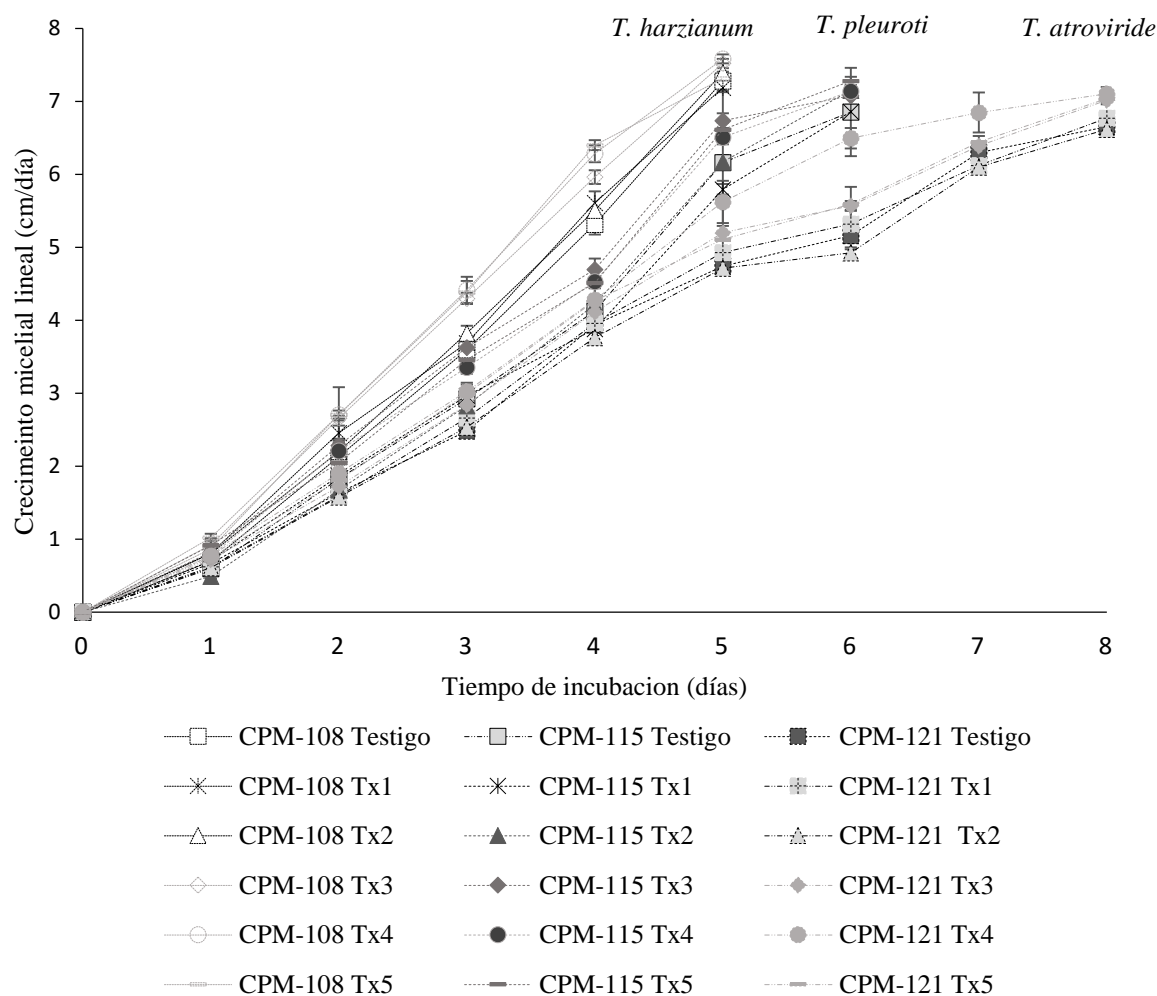


Figura 14. Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* y CPM-121 de *Trichoderma atroviride*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

8.1.2.1 CPM-108 de *T. harzianum*

Para la cepa CPM-108 (*T. harzianum*), la colonización completa de la caja fue en cinco días, desde un inicio se observó que los tratamientos que contenían ABTS sufrieron un estímulo en el crecimiento al compararlos con el testigo, en el día 4 se aprecia un ligero pico en el crecimiento con el tratamiento de ABTS + AAS 100 μ M (Tx5), obteniendo una longitud de 6.3 cm comparados con los 5.3 cm del testigo. Finalmente, los tratamientos que contenían solo AAS (Tx2 y Tx3) se presentaron muy parecidos al testigo (Fig. 15).

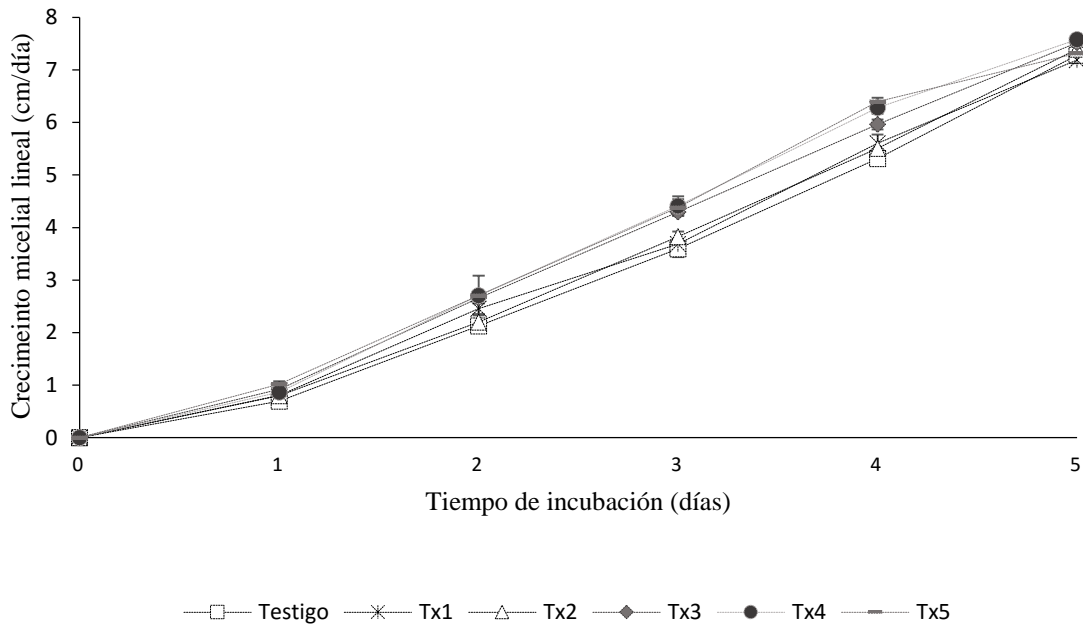


Figura 15. Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

8.1.2.2 CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

A esta cepa sólo se evaluó en dos tratamientos con AAS (Tx1 y Tx2) y su testigo. Dado que la cepa tardó 16 días en colonizar la caja completamente, se realizó una cinética de cinco tiempos. La cinética de crecimiento lineal muestra que en los primeros días de incubación el crecimiento fue homogéneo, a partir del tiempo 2 (3 días de incubación) se observa que el testigo creció más que los tratamientos con AAS, siguiendo esta misma tendencia durante toda la cinética, el pico máximo de longitud fue de 6.7 cm, seguido del tratamiento Tx2 con 6.4 cm, y finalmente Tx1 con 6.0 cm (Fig. 16).

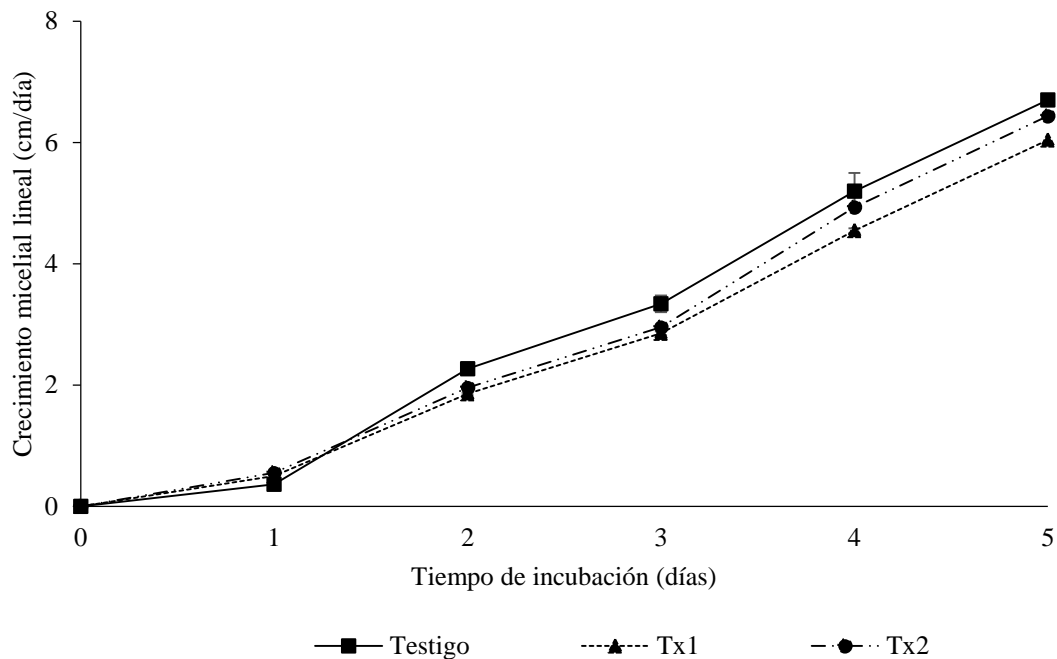


Figura 16. Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.

8.1.2.3 CPM-115 de *T. pleuroti*

La cepa de *T. pleuroti* tardó en colonizar completamente la caja Petri en 6 días. Al evaluar el crecimiento se observa que los tratamientos con ABTS presentaron un mayor crecimiento en comparación con el testigo. En los primeros días de incubación el crecimiento fue homogéneo entre los tratamientos, fue a partir del día 6 cuando Tx5 alcanzó un pico máximo de 7.29 cm en comparación con el testigo que fue de 6.85 cm (Fig. 17).

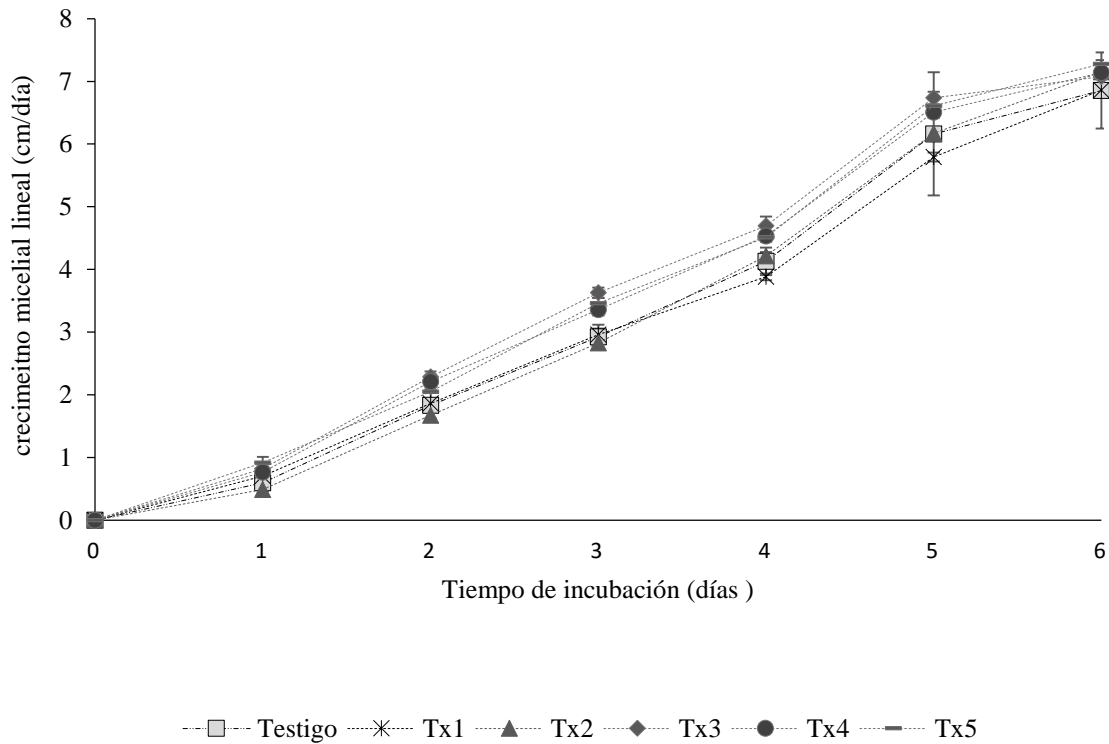


Figura 17. Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

8.1.2.4 CPM-121 de *T. atroviride*

Esta cepa tardó en colonizar completamente la caja en 8 días. Al igual que las cepas evaluadas con ABTS el crecimiento fue mayor con estos tratamientos. Se destaca que en el tiempo 6 hubo una estimulación con el tratamiento de ABTS+AAS 1 μ M, la cual provocó un crecimiento de 6.4 cm comparados con 5.3 cm del testigo. Posteriormente, debido a que la cepa llegó a su punto máximo de crecimiento se estabilizó con los demás tratamientos. Para el caso de los tratamientos con únicamente AAS la tendencia fue la misma pero con diferencias mínimas comparadas con el testigo (Fig. 18).

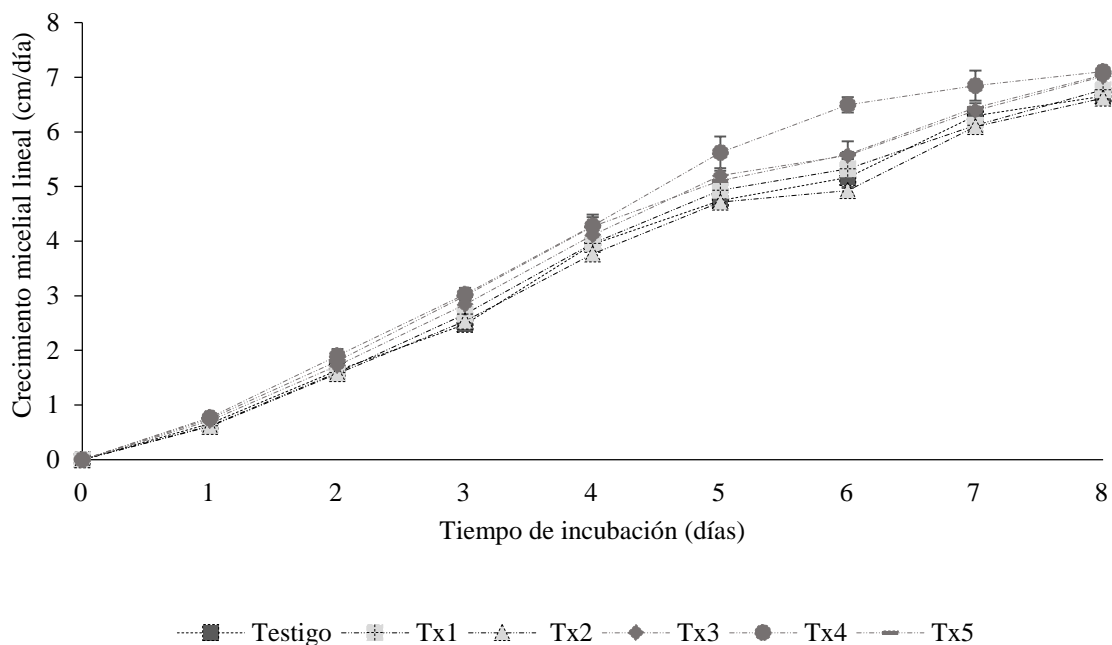


Figura 18. Cinética para medir el crecimiento lineal del micelio (cm/día) de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

8.1.3 Área de la colonia (cm²)

Para determinar el área de la colonia se realizó el mismo arreglo que en la velocidad de crecimiento, se observó que la tendencia fue la misma en todas las cepas y el efecto de los tratamientos con AAS y ABTS fueron similares (Fig. 19).

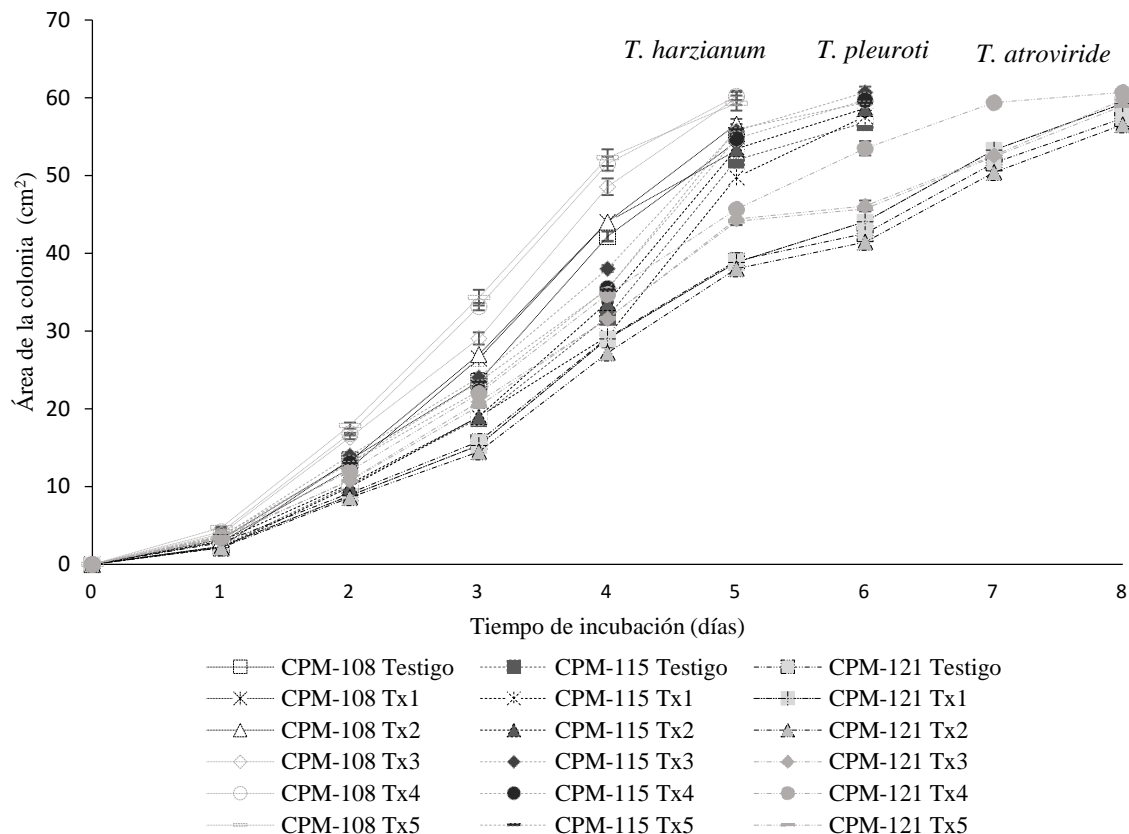


Figura 19. Cinética para medir el área de la colonia (cm²) de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* y CPM-121 de *Trichoderma atroviride*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.

8.1.3.1 CPM-108 de *T. harzianum*

Para el caso de esta cepa la tendencia en la velocidad de crecimiento comparada con el área, fue la misma. Los tratamientos con ABTS mostraron una estimulación en el área de la colonia. El Tx5 demostró una estimulación en el crecimiento en el día 4, al tener un área de 52.29 cm² comparadas con el testigo que obtuvo 42.17 cm². En cuanto a los tratamientos con AAS existió un ligero estímulo con el tratamiento de AAS 100 µM (Tx2), ya que durante toda la cinética se presentó mayor que el testigo, finalmente en el último día de incubación presentó un área de 56.63 cm² (Fig. 20).

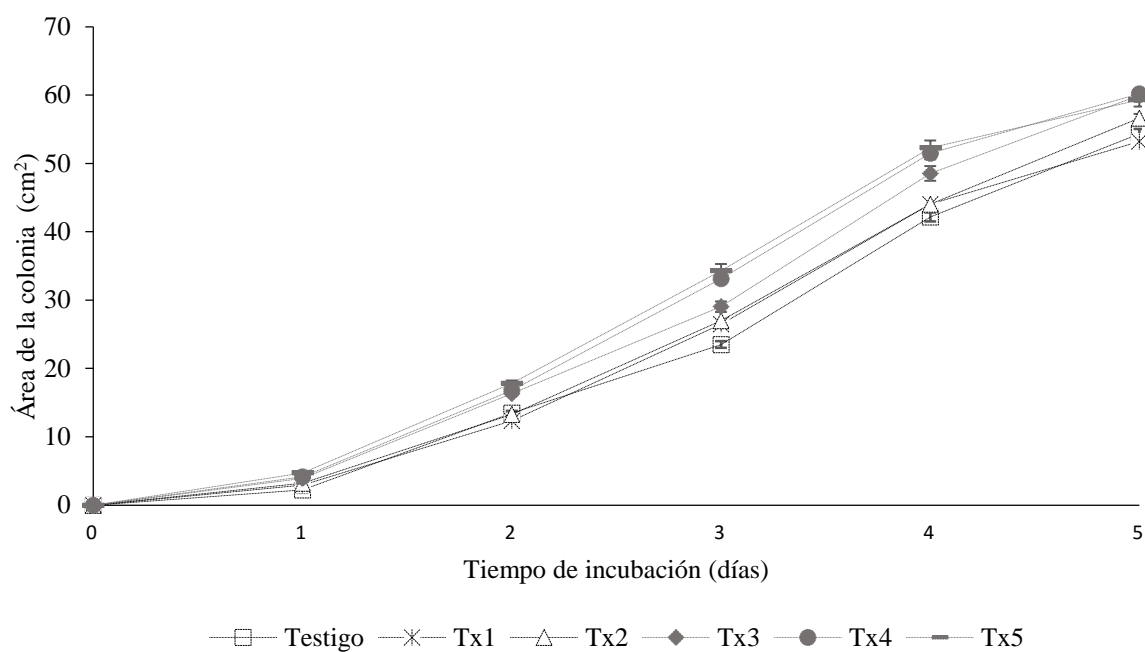


Figura 20. Cinética para medir el área de la colonia (cm^2) de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS $1 \mu\text{M}$. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS $100 \mu\text{M}$. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS $1 \mu\text{M}$. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS $100 \mu\text{M}$.

8.1.3.2 CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

Para la cepa CPM-113, los tratamientos con AAS inhibieron el crecimiento, ya que desde el tiempo 2 existió un notable crecimiento en el testigo alejándose de los tratamientos de AAS. Se observó que en el tiempo 4 el testigo tuvo un pico, teniendo un área micelial de 46 cm^2 , mientras que el tratamiento con AAS $100 \mu\text{M}$ presentó 39 cm^2 , y 36 cm^2 en el tratamiento de AAS $1 \mu\text{M}$ (Fig. 21).

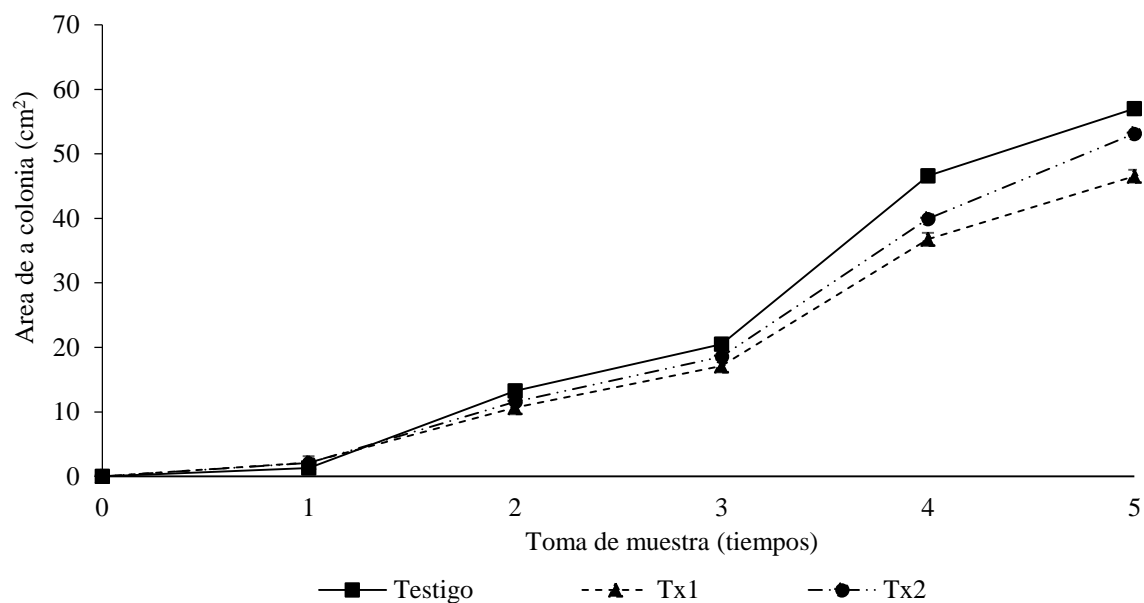


Figura 21. Cinética para medir el área de la colonia (cm²) de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.

8.1.3.3 CPM-115 de *T. pleuroti*

Igual que las otras cepas el crecimiento fue mayor en los tratamientos que contenían ABTS, se observó que durante la cinética los valores fueron muy similares entre cada uno de ellos. Cuando se observan los tratamientos Tx1 y Tx2, se pudo apreciar que a partir del día 3 existió un ligero estímulo en el segundo hasta el final de la cinética (Fig. 22).

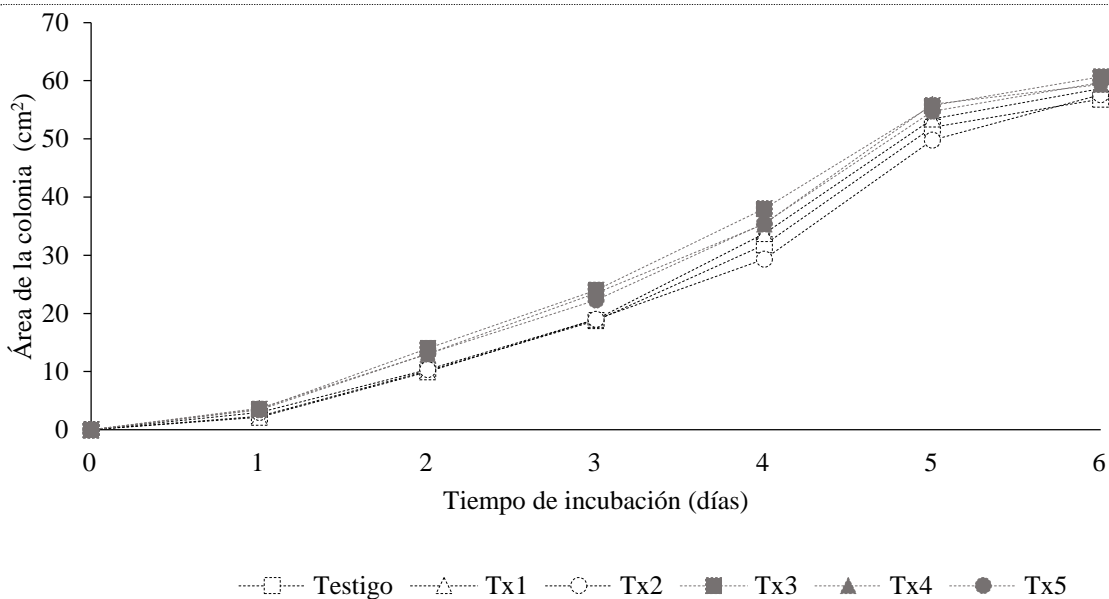


Figura 22. Cinética para medir el área de la colonia (cm²) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μM.

8.1.3.4 CPM-121 de *T. atroviride*

Para la cepa CPM-121 no existió diferencia entre los tratamientos los primeros días. Es a partir del día 3 cuando los tratamientos con ABTS mostraron un crecimiento mayor a los tratamientos que contenían AAS y el testigo. Finalmente, en el día 6 se observa un pico en el crecimiento con el tratamiento Tx4 con un área de 53.50 cm², la cual disminuye su crecimiento a medida que se acerca a la colonización completa de la caja (Fig. 23).

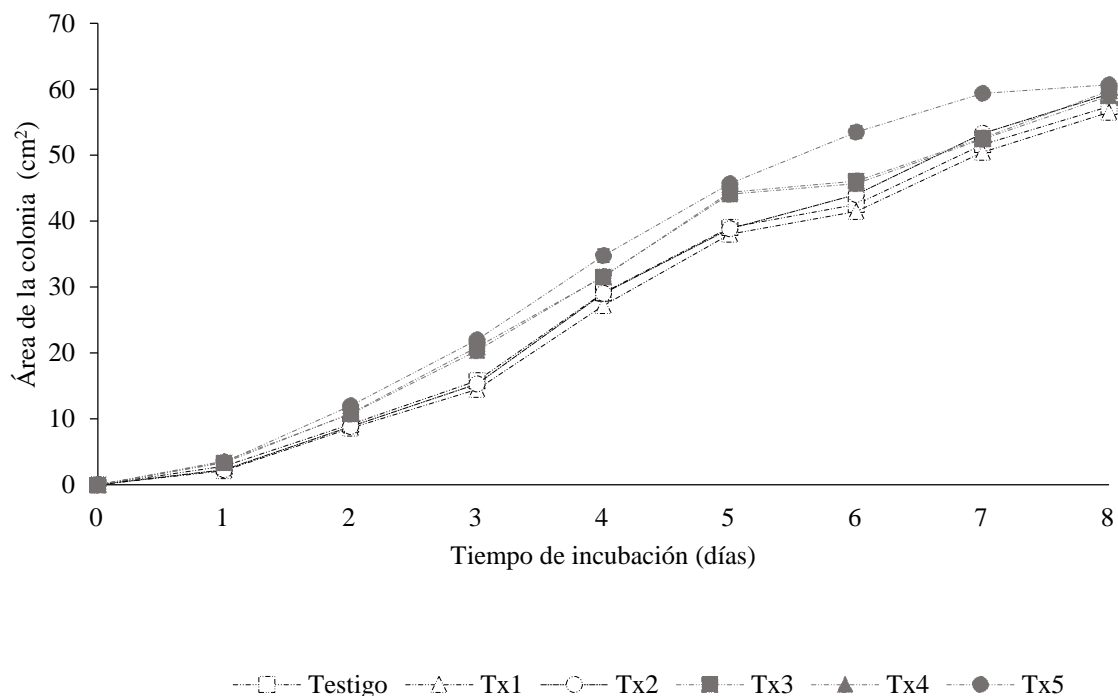


Figura 23. Cinética para medir el área de la colonia (cm²) de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μM.

8.2 Producción de la enzima lacasa

8.2.1 Análisis cualitativo

8.2.1.1 CPM-121 de *T. atroviride*

La medición del halo de oxidación producido por la adición del sustrato ABTS al medio de cultivo PDA sólo se realizó en la cepa CPM-121 (*T. atroviride*) dado que fue la única que presentó cambios en la coloración del medio de cultivo. Esta se midió diariamente durante el crecimiento de la cepa. El primer día no se observó algún cambio en la coloración del medio, hasta el segundo día, el cual va incrementando de acuerdo al crecimiento micelial tanto en el tratamiento de ABTS como en su combinación con AAS. La mayor intensidad del color se pudo apreciar con el tratamiento que contenía sólo ABTS, seguido del tratamiento Tx2 con ABTS+AAS 100 μM, y finalmente el tratamiento Tx1 de ABTS+AAS 1 μM (Fig. 24).

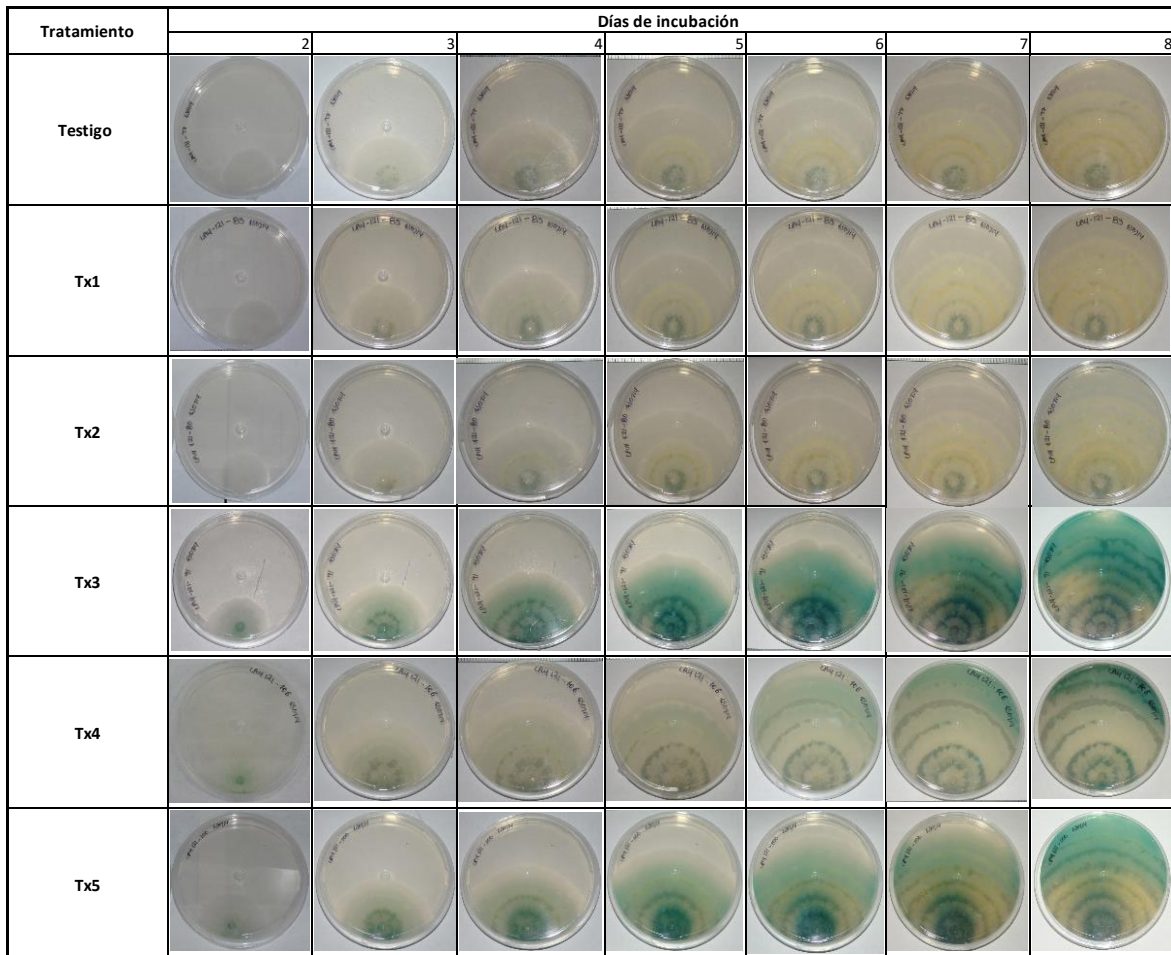


Figura 24. Coloración producida por la oxidación del sustrato ABTS de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, durante la cinética de crecimiento. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM . Tratamiento 3 (Tx3)=PDA+ ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μM . Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μM .

Al evaluar el área de oxidación, se pudo apreciar que en los primeros cuatro días no hubo diferencia en el crecimiento oxidativo entre los tratamientos, sino a partir del día 5 cuando el tratamiento Tx4 con ABTS+AAS 1 μM presentó un mayor crecimiento, el cual fue incrementando paulatinamente hasta colonizar completamente la caja, obteniendo un área de 60.6 cm^2 comparada con el tratamiento de ABTS que obtuvo 59.7 cm^2 (Fig. 25).

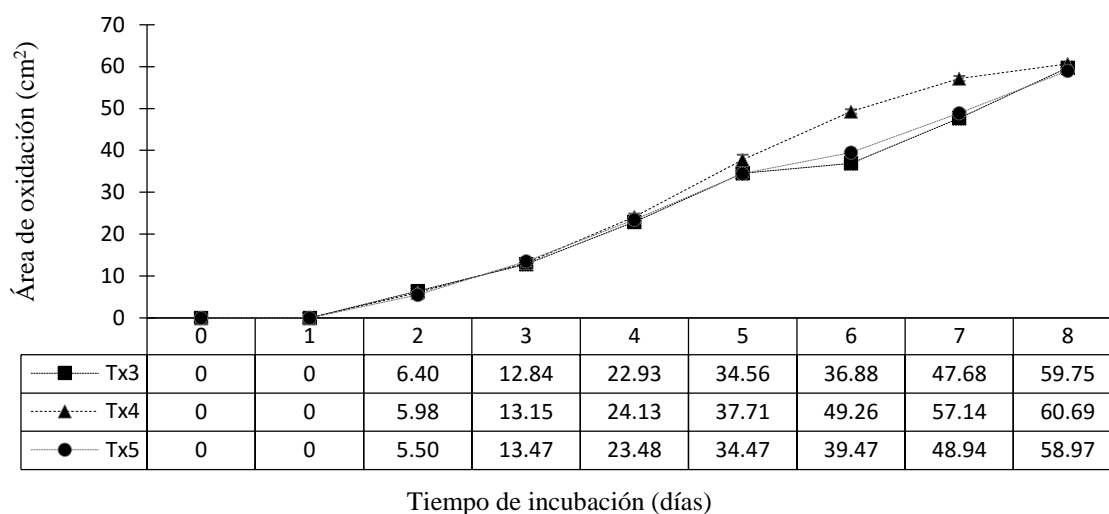


Figura 25. Cinética de crecimiento de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride* para medir el halo de oxidación (cm²) producido por el sustrato ABTS. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.

Cuando se compara el área de crecimiento micelial con el área del halo de oxidación, se aprecia que el primero fue mayor durante toda la cinética, para los tratamientos de ABTS (Tx3) y ABTS+AAS 100 µM (Tx5). Mientras que para el tratamiento Tx4 de ABTS +AAS 1µM, el crecimiento oxidativo se traslapó al crecimiento micelial en el día 6 (Fig.26).

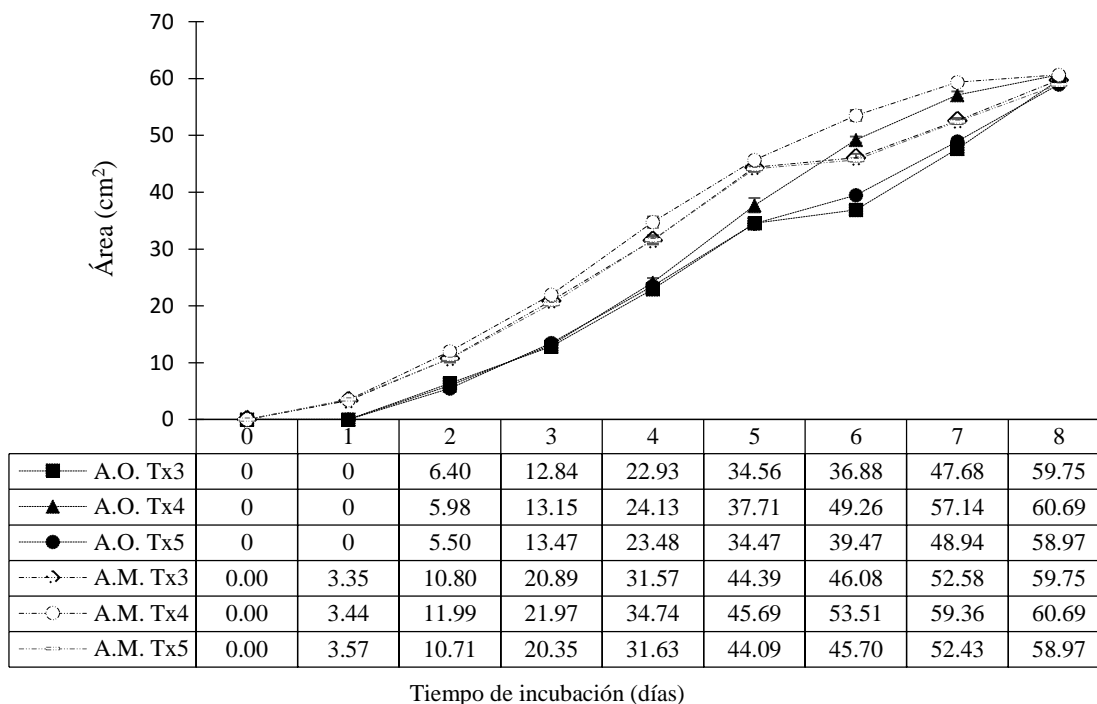


Figura 26. Comparación del área micelial (A.M.) y el área de oxidación (A.O.) en los tratamientos ABTS+AAS de la cepa CPM-121 de *Trichoderma harzianum*. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

8.2.1.1.1 Determinación volumétrica de lacasas al tiempo final

Se realizó un análisis de varianza para conocer si alguno de los tratamientos fue diferente, el cual nos dio una $F= 274.88$ y una significancia >0.0001 , por lo que se prosigió a realizar una comparación de medias de Tukey con un $p <0.05\%$ (Cuadro 9). En la figura 27, se muestra el análisis de la actividad de lacasas al tiempo final para las tres cepas de *Trichoderma* evaluadas, así como de sus tratamientos con ácido acetilsalicílico y en combinación con ABTS. Los datos obtenidos muestran que el testigo no presentó actividad de lacasas en ninguna de las cepas. Los tratamientos que contenían sólo ABTS mostraron un incremento en la producción de lacasas en las cepas CPM-115 y CPM-121 con 1.48 U mL^{-1} y 0.58 U mL^{-1} , respectivamente. Para el caso de CPM-108, la mayor producción fue con el tratamiento de ABTS+AAS $1\mu\text{M}$ obteniendo 0.8 U mL^{-1} . Los tratamientos que sólo contenían AAS también mostraron actividad aunque en menor proporción. Se observó que para todas las cepas el tratamiento con AAS $1\mu\text{M}$ obtuvieron la mayor actividad. Para *T. harzianum* fue de 0.23 U mL^{-1} , mientras que para *T. pleuroti* de 0.27 U mL^{-1} , y finalmente *T. atroviride* obtuvo 0.17 U mL^{-1} .

Cuadro 9. Actividad volumétrica de lacasas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride*.

Condiciones	CPM-108	CPM-115	CPM-121
Testigo	0±0 ^h	0±0 ^h	0±0 ^h
Tx1	0.24±0.02 ^{ed}	0.03±0.01 ^{hgf}	0.27±0.01 ^d
Tx2	0.26±0.03 ^d	0.02±0 ^{hg}	0.01±0 ^h
Tx3	0.6±0.02 ^c	1.48±0.03 ^a	0.59±0.04 ^c
Tx4	0.8±0.03 ^b	0.14±0.03 ^{egf}	0.5±0.05 ^c
Tx5	0.58±0.02 ^c	0.15±0.02 ^{edf}	0.2±0.03 ^{ed}

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey p<0.05). Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.

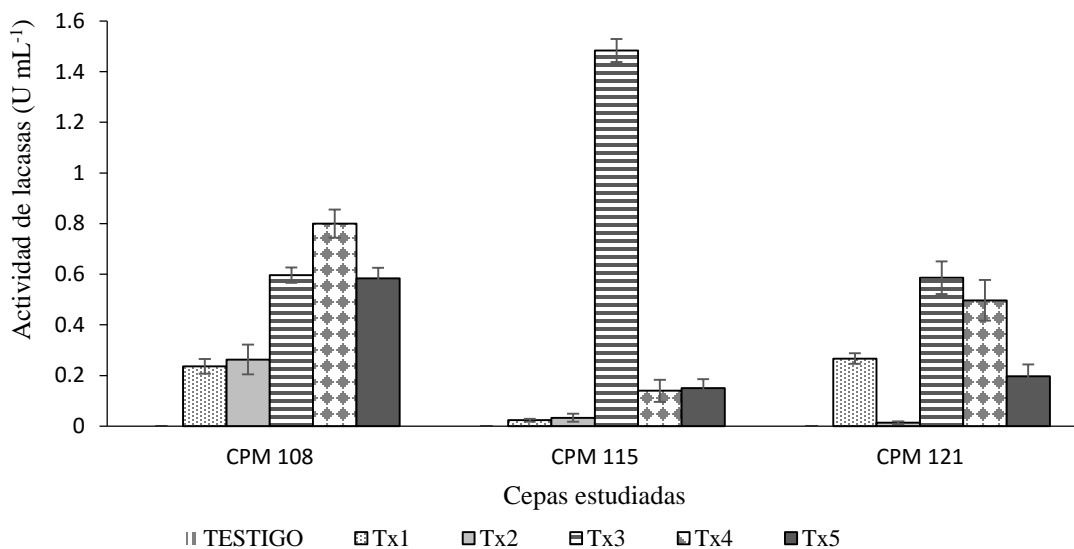


Figura 27. Actividad volumétrica de lacasas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* y CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, al tiempo final. 5 días de incubación para la cepa CPM-108, 6 días para la cepa CPM-115 y 8 días para la cepa CPM-121. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 µM. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 µM.

8.2.1.1.2 Producción de esporas al tiempo final

Se realizó un análisis de varianza para conocer si alguno de los tratamientos fue diferente, el cual nos dio una $F= 505.2$ y una significancia <0.0001 , por lo que se prosiguió a realizar una comparación de medias de Tukey con un $p < 0.05\%$ (Cuadro 10). La producción de esporas de las tres cepas sometidas a los tratamientos con AAS y ABTS, en su respectivo tiempo final, se observan en la figura 28. La adición de ABTS a los tratamientos con AAS estimuló la producción de esporas, *T. pleuroti* y *T. atroviride* presentaron mayor esporulación con el tratamiento de ABTS+AAS 100 μM , con una producción de 5.95×10^6 esporas mL^{-1} y 2.59×10^6 esporas mL^{-1} , respectivamente, comparadas con el testigo que fue de 2.45×10^6 esporas mL^{-1} y 1.0×10^6 esporas mL^{-1} . Con respecto a *T. harzianum* la mayor concentración se observó en el tratamiento de ABTS+AAS 1 μM con una producción de 4.97×10^6 esporas mL^{-1} . Para el caso de los tratamientos que contenían solo ácido acetilsalicílico, el que obtuvo la producción más alta de esporas fue AAS 1 μM en la cepa de *T. pleuroti* con una producción de 4.0×10^6 esporas mL^{-1} . Para el caso de *T. harzianum* el mejor tratamiento fue con AAS 100 μM con una producción de 3.6×10^6 esporas mL^{-1} . Caso contrario ocurrió en *T. atroviride* ya que los tratamientos con AAS inhibieron la producción de esporas obteniendo resultados menores al testigo que fue de 1.0×10^6 esporas mL^{-1} .

Cuadro 10. Producción de esporas/mL de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride* al tiempo final de incubación de cada cepa.

Tratamientos	CPM-108	CPM-115	CPM-121
Testigo	3,037,500±20,155.64 ^e	2,450,000±64,549.72 ^{fg}	1,041,667±15,365.91 ^j
Tx1	2,75,4167±60,696.19 ^{fe}	4,025,000±49,581.58 ^c	816,667±44,095.86 ^j
Tx2	3,545,833±26,153.92 ^d	1,825,000±38,188.13 ⁱ	775,000±17,078.25 ^j
Tx3	3,683,333±80,536.4 ^d	5,133,333±97,182.53 ^b	2,166,667±35,746.02 ^h
Tx4	4,970,833±27,701.28 ^b	4,058,333±45,491.15 ^c	2,266,667±40,138.65 ^{gh}
Tx5	3,854,167±30,561.87 ^{dc}	5,950,000±198,326.33 ^a	2,591,667±35,158.37 ^{fg}

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM . Tx3= PDA + ABTS. Tx4= PDA + ABTS + AAS 1. Tx5= PDA + ABTS + AAS 100 μM .

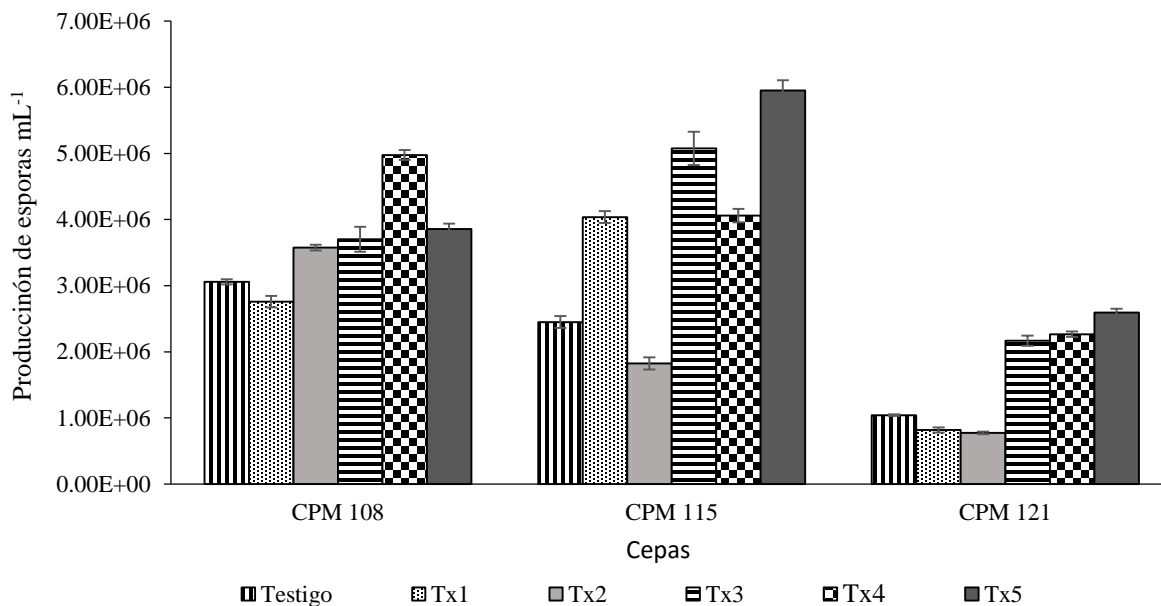


Figura 28. Producción de esporas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* y CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, al final de la cinética de crecimiento. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M. Tratamiento 3 (Tx3)= PDA + ABTS. Tratamiento 4 (Tx4)= PDA + ABTS + AAS 1 μ M. Tratamiento 5 (Tx5)= PDA + ABTS + AAS 100 μ M.

8.2.2 Análisis cuantitativo

Se realizó un análisis de varianza para conocer si alguno de los tratamientos fue diferente, el cual nos dio una $F= 505.2$ y una significancia <0.0001 , por lo que se prosiguió a realizar una comparación de medias de Tukey con un $p <0.05\%$ (Cuadro 11). En la cinética de cinco tiempos se visualizó la tendencia en la producción de lacasas en las cuatro cepas evaluadas CPM-108 de *T. harzianum*, CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *T. pleuroti* y CPM-121 de *T. atroviride*, únicamente con los tratamientos Tx1, Tx2 y el testigo. Los datos más altos en la producción de lacasas, se pueden observar en los primeros días de incubación y con las dos concentraciones de AAS (Fig. 29). Para determinar si existen diferencias significativas en los tratamientos de cada cepa evaluada, se realizó un análisis de varianza, el cual se puede observar en el cuadro 3. Se concluyó que existen diferencias entre cepas y tratamientos, destacando a la CPM-113 con el tratamiento Tx1 como la mejor en el

primer tiempo. Dado que cada cepa presenta condiciones diferentes se realizó un análisis para cada una.

Cuadro 11. Producción de lacasas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Tratamiento	Tiempo	CPM-108	CPM-113	CPM-115	CPM-121
Testigo	1	0±0 ^u	0±0 ^u	0±0 ^u	0.58±0.01 ^{edf}
	2	0±0 ^u	0±0 ^u	0±0 ^u	0.37±0.01 ^{hji}
	3	0±0 ^u	0.01±0 ^u	0±0 ^u	0.16±0.01 ^{nqrpmpo}
	4	0±0 ^u	0.02±0 ^{tu}	0.01±0 ^u	0.01±0 ^u
	5	0.01±0 ^u	0.01±0 ^u	0.02±0 ^{tsu}	0±0 ^u
Tx1	1	1.19±0.1 ^b	1.34±0.07 ^a	0.95±0.02 ^c	0.03±0 ^{qrtsu}
	2	0.47±0.02 ^{hgf}	0.16±0.02 ^{nqrpmpo}	0.63±0.03 ^{ed}	0.01±0 ^u
	3	0.29±0.01 ^{kljm}	0.02±0 ^{rtsu}	0.26±0.02 ^{nkljm}	0.04±0 ^{qrtpsuo}
	4	0.85±0.02 ^c	0.04±0 ^{qrtpsuo}	0.2±0.02 ^{nkljmo}	0.26±0.01 ^{nkljm}
	5	0.32±0.02 ^{kji}	0.28±0.03 ^{kljm}	0.13±0.03 ^{nqrtpsuo}	0.68±0 ^d
Tx2	1	0±0 ^u	0.16±0 ^{nqrpmpo}	1.18±0.07 ^b	0.15±0.03 ^{nqrpsmo}
	2	0.24±0.01 ^{nkljmo}	0.31±0.02 ^{klji}	0.43±0.01 ^{hgi}	0.2±0.04 ^{nkljmo}
	3	0.28±0.04 ^{kljm}	0.14±0.02 ^{nqrtpsuo}	0.15±0.01 ^{nqrtpsuo}	0.13±0.02 ^{nqrtpsuo}
	4	0.33±0.01 ^{kji}	0.11±0.01 ^{qrtpsuo}	0.13±0.02 ^{nqrtpsuo}	0.13±0.01 ^{nqrtpsuo}
	5	0.54±0.02 ^{egf}	0.17±0.01 ^{nlpmpo}	0.12±0.03 ^{qrtpsuo}	0±0 ^u

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey p<0.05). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 µM. Tx2= PDA + AAS 100 µM.

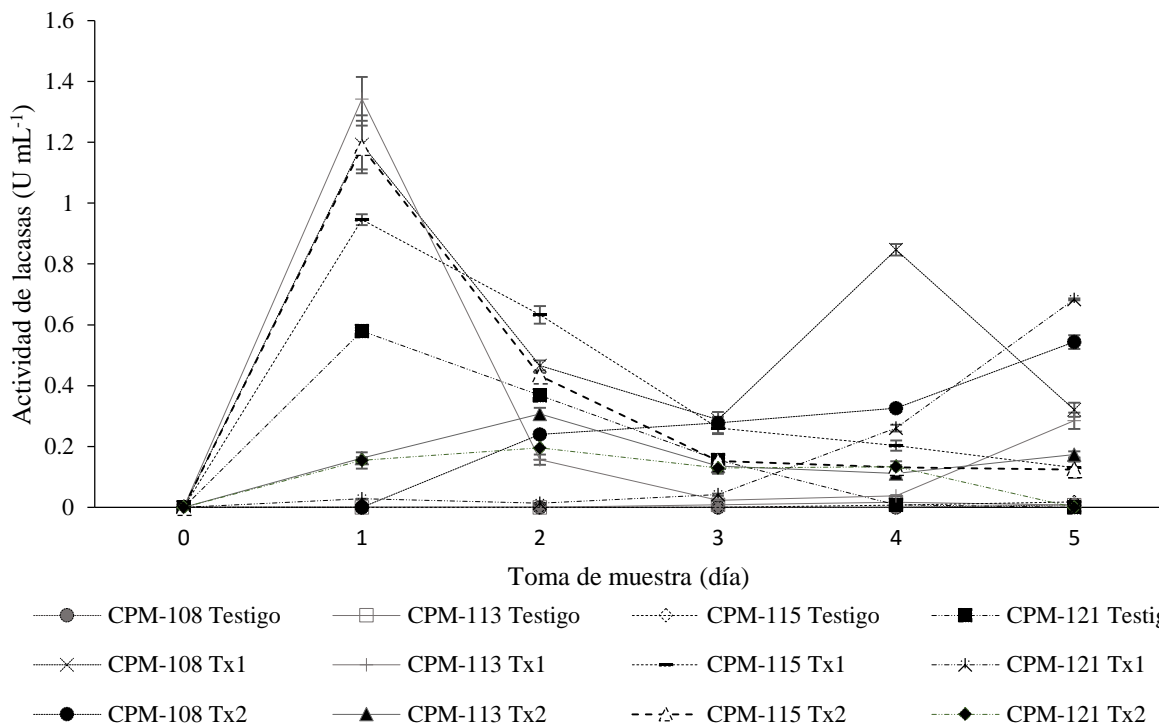


Figura 29. Producción de lacasas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μ M. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μ M.

8.2.2.1 CPM-108 de *T. harzianum*

Se realizó un análisis de varianza para conocer si alguno de los tratamientos fue diferente, el cual nos dio una $F= 505.2$ y una significancia <0.0001 , por lo que se prosiguió a realizar una comparación de medias de Tukey con un $p < 0.05\%$ (Cuadro 12). El mejor tratamiento fue el de Tx1 (AAS 1 μ M), en el primer día de incubación, la tendencia fue decaer y presentar valores también significativamente altos en los últimos días. En cuanto al tratamiento Tx2 se observó que durante los primeros días existió poco estímulo y fue incrementado a medida que pasó el tiempo. Finalmente, para el caso del testigo, no se presentó actividad de la enzima en ninguno de los tiempos (Fig. 30).

Cuadro 12. Producción de lacasas de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0±0 ^f	0.01±0 ^f
Tx1	1.19±0.1 ^a	0.47±0.02 ^{dc}	0.29±0.01 ^e	0.85±0.02 ^b	0.32±0.02 ^{de}
Tx2	0±0 ^f	0.24±0.01 ^e	0.28±0.04 ^e	0.33±0.01 ^{de}	0.54±0.02 ^c

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM .

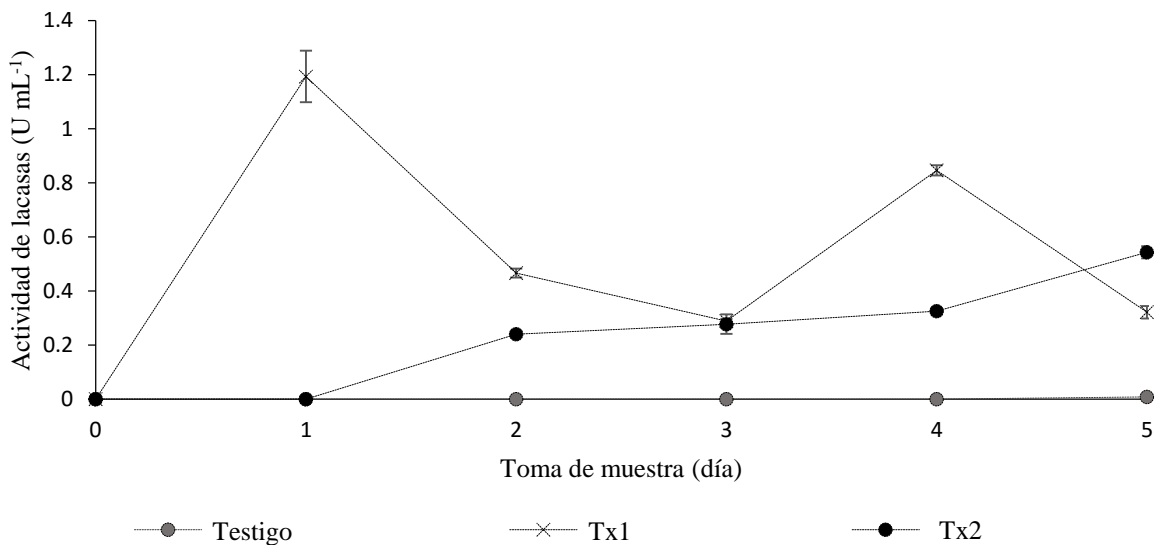


Figura 30. Producción de lacasas de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

8.2.2.2 CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

Se realizó un análisis de varianza para conocer si alguno de los tratamientos fue diferente, el cual nos dio una $F = 505.2$ y una significancia < 0.0001 , por lo que se prosiguió a realizar una comparación de medias de Tukey con un $p < 0.05\%$. En cepa existió un estímulo con el tratamiento Tx1, al presentar en el análisis estadístico el mejor resultado (Cuadro 13). De la misma manera que en la cepa CPM-108, la tendencia fue tener un valor máximo en el primer día de incubación y decaer bruscamente para incrementar paulatinamente en los últimos días. Para el caso del Tx2, fue el segundo mejor tratamiento ya que en el segundo tiempo supero en un 50% el valor de Tx1 para este día, la tendencia de este tratamiento fue mantenerse

estable durante toda la cinética. Para el caso del testigo no se presentó actividad durante toda la cinética (Fig. 31).

Cuadro 13. Producción de lacasas de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	0±0 ^f	0±0 ^f	0.01±0 ^f	0.02±0 ^f	0.01±0 ^f
Tx1	1.34±0.07 ^a	0.16±0.02 ^d	0.02±0 ^{ef}	0.04±0 ^{ef}	0.28±0.03 ^{cb}
Tx2	0.16±0 ^d	0.31±0.02 ^b	0.14±0.02 ^{ed}	0.11±0.01 ^{edf}	0.17±0.01 ^{cd}

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey p<0.05). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 µM. Tx2= PDA + AAS 100 µM.

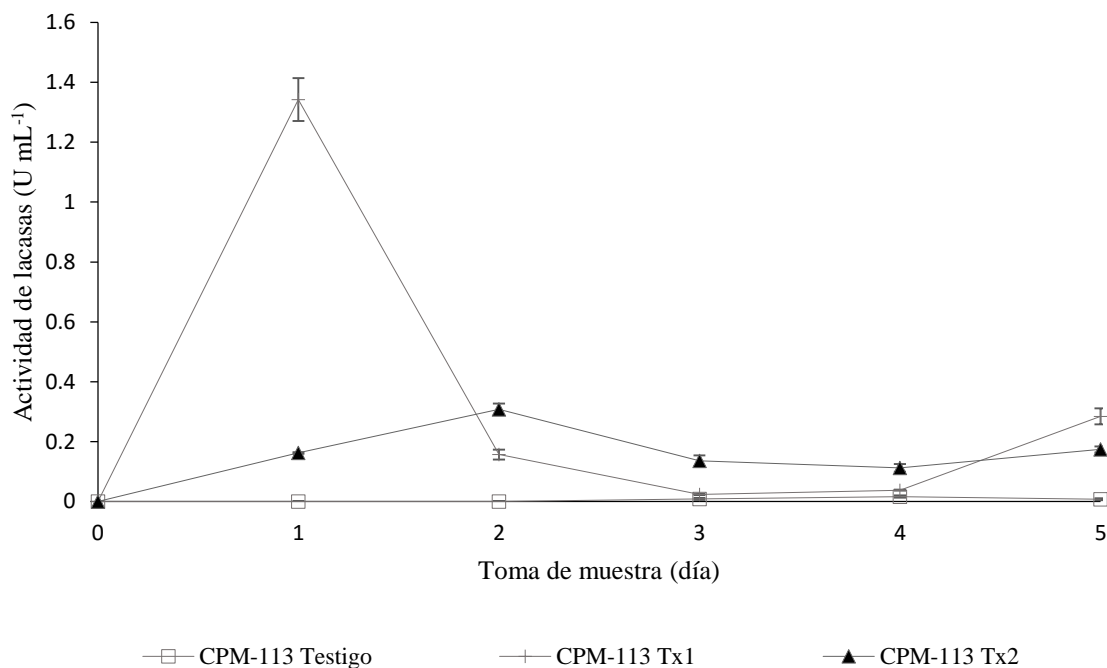


Figura 31. Producción de lacasas de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.

8.2.2.3 CPM-115 de *T. pleuroti*

El análisis de varianza muestra que el mejor tratamiento fue el de Tx2 en el primer tiempo, con un valor de 1.18 U mL⁻¹. Aunado a ello se puede observar que también existió un estímulo con Tx1 el cual alcanzó un valor máximo de 0.95 U mL⁻¹, un 20% menor que el primero (Cuadro 14). Se pudo observar que a partir del día 2 el tratamiento Tx1 superó al

Tx2 conservando la misma tendencia hasta el final de la cinética traslapándose ambos tratamientos (Fig. 32).

Cuadro 14. Producción de lacasas de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	0±0 ^h	0±0 ^h	0±0 ^h	0.01±0 ^g	0.02±0 ^g
Tx1	0.95±0.02 ^{bc}	0.63±0.03 ^{ce}	0.26±0.02 ^{eg}	0.2±0.02 ^{fg}	0.13±0.03 ^{fgh}
Tx2	1.18±0.07 ^a	0.43±0.01 ^d	0.15±0.01 ^f	0.13±0.02 ^f	0.12±0.03 ^f

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey p<0.05). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 µM. Tx2= PDA + AAS 100 µM.

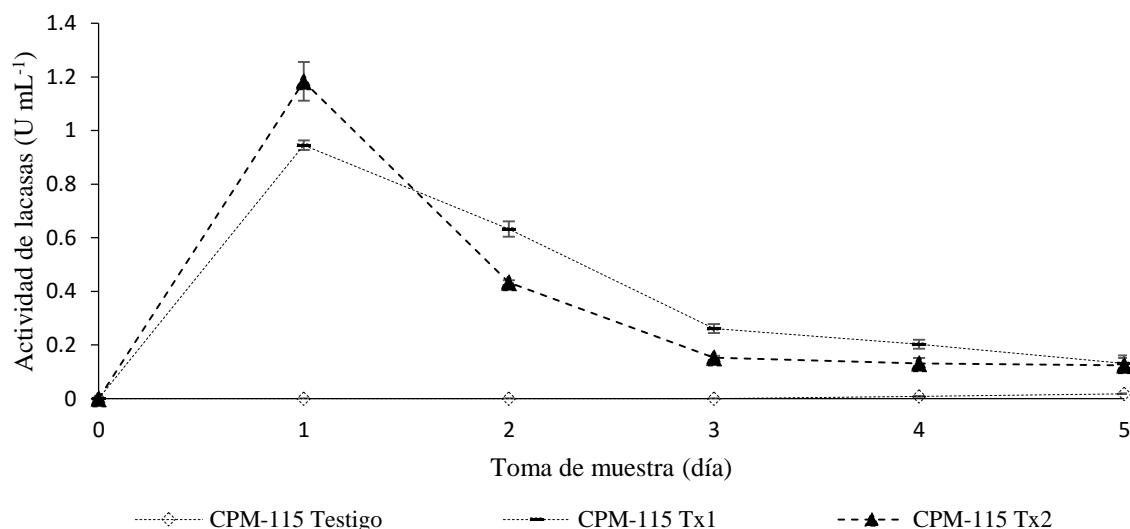


Figura 32. Producción de lacasas de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 µM. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 µM.

8.2.2.4 CPM-121 de *T. atroviride*

La cepa de *T. atroviride* fue la única en presentar actividad de lacasa en el testigo. Se observó que en este se obtuvo el valor más alto en el primer día, pese a ello se notó que el Tx1 estimuló paulatinamente la producción de lacasas provocando que en los últimos días se alcanzaran los valores más altos, hasta 10 puntos más que en el testigo, destacando como el mejor tratamiento, con una significancia de <0.0001 (Cuadro 15). Para el tratamiento de Tx2 no

hubo gran diferencia en comparación con el testigo y Tx1, ya que se presentó durante la cinética homogéneo con valores bajos y en el último día decae (Fig. 33).

Cuadro 15. Producción de lacasas de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	0.58±0.01 ^b	0.37±0.01 ^c	0.16±0.01 ^e	0.01±0 ^f	0±0 ^f
Tx1	0.03±0 ^f	0.01±0 ^f	0.04±0 ^f	0.26±0.01 ^d	0.68±0 ^a
Tx2	0.15±0.03 ^e	0.2±0.04 ^{ed}	0.13±0.02 ^e	0.13±0.01 ^e	0±0 ^f

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM .

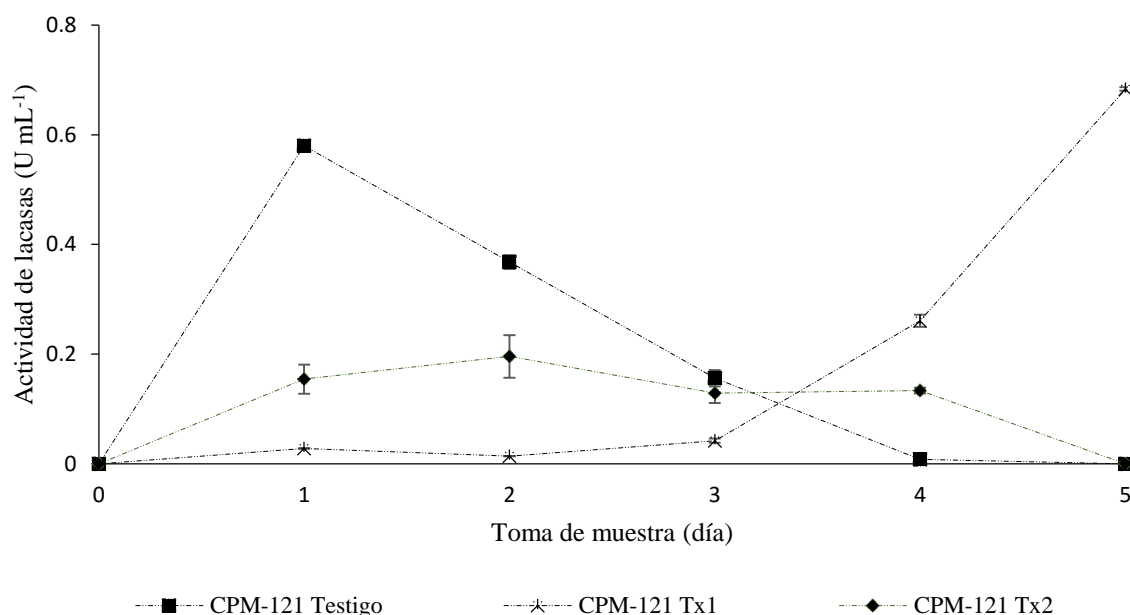


Figura 33. Producción de lacasas de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, cinética de cinco tiempos. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

8.2.2.3 Producción de esporas

Se evaluó la producción de esporas en la cinética de cinco tiempos para las cuatro cepas de *Trichoderma* (Fig. 34). La CPM-115 en el testigo fue la que obtuvo la mayor cantidad de esporas con una producción de 6.95×10^6 esporas mL^{-1} , en comparación con las demás.

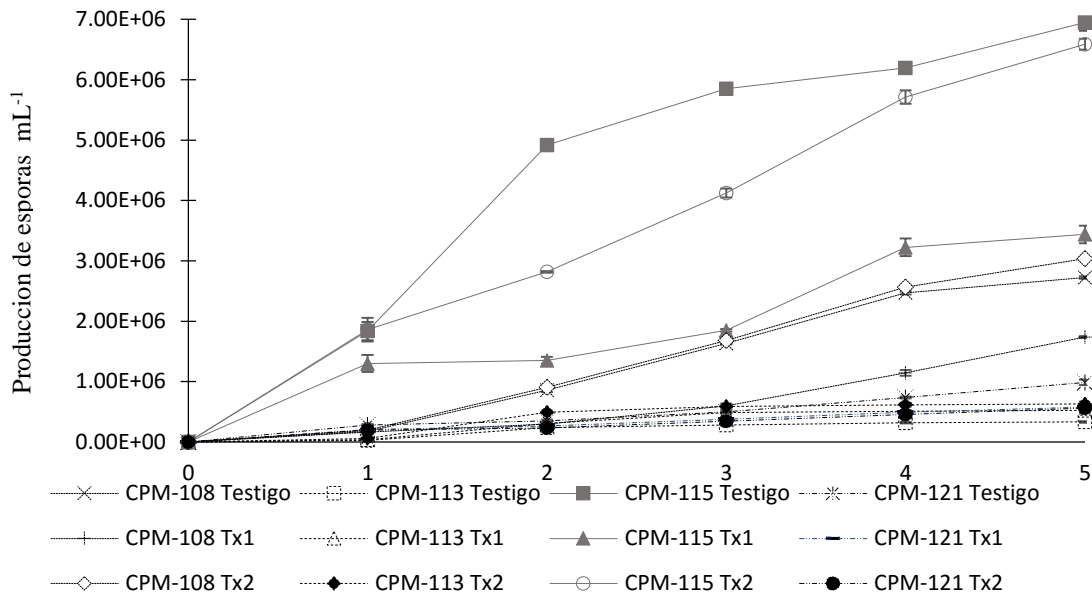


Figura 34. Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} , de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS $1 \mu\text{M}$. Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS $100 \mu\text{M}$.

8.2.2.3.1 CPM-108 de *T. harzianum*

Se realizó un análisis de varianza para conocer si existieron tratamientos diferentes, el cual nos dio una $F= 303$ y una significancia de <0.0001 , por lo que se prosiguió a hacer una comparación de medias de Tukey con un $p<0.005$ (Cuadro 16). Se determinó que el mejor tratamiento fue el Tx2 de AAS $100 \mu\text{M}$, en el quinto día. Dicho tratamiento provocó desde el primer día un incremento paulatino hasta llegar al tiempo cinco, cuando obtuvo una producción de 3.0×10^6 esporas mL^{-1} . Mientras que el Tx1 presentó en el mismo día un 40% menos que el tratamiento y el testigo con una producción de 1.7×10^6 esporas mL^{-1} (Fig. 35).

Cuadro 16. Producción de esporas de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	175,000±10,206 ^k	856,250±15,728 ^h	1,631,250±6,250 ^f	2,468,750±11,967 ^d	2,725,000±10,206 ^b
Tx1	162,500±12,500 ^k	296,875±14,768 ^j	600,000±17,677 ⁱ	1,143,750±23,662 ^g	1,737,500±7,216 ^e
Tx2	193,750±11,967 ^k	906,250±11,967 ^h	1,681,250±18,750 ^{ef}	2,562,500±16,137 ^c	3,037,500±16,137 ^a

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM .

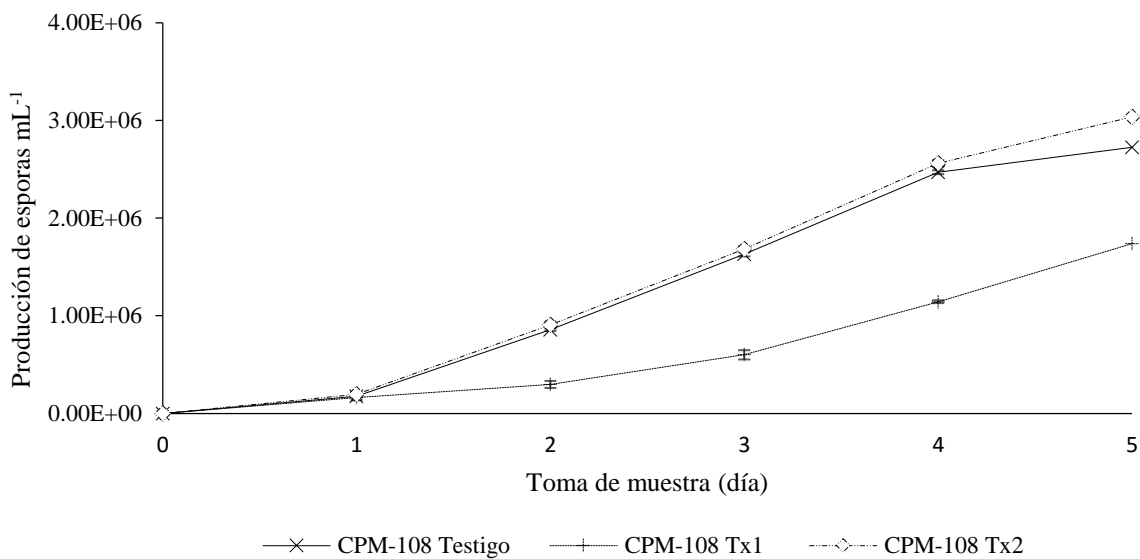


Figura 35. Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

8.2.2.3.2 CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

Se realizó un análisis de varianza para conocer si existieron tratamientos diferentes, dando una $F = 303$ y una significancia de < 0.0001 , por lo que se prosiguió a hacer una comparación de medias de Tukey con un $p < 0.005$ (Cuadro 17). Se destacó el Tx2 en el último tiempo, como el mejor tratamiento por haber obtenido la más alta cantidad de esporas durante toda la cinética, con una producción de 6.3×10^5 esporas mL^{-1} . A la par se comportó el tratamiento de Tx1 con una tendencia similar pero con un 20% menos que Tx2, mientras que el testigo siempre fue el tratamiento más bajo (Fig. 36).

Cuadro 17. Producción de esporas de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	25,000±0 ^f	237,500±7,216.88 ^e	281250±6,250 ^{de}	318,750±6,250 ^{cd}	331,250±6,250 ^c
Tx1	37,500±7,216 ^f	306,250±6,250 ^{cd}	487,500±7,216 ^b	509,375±9,375 ^b	525,000±10,206 ^b
Tx2	56,250±6,250 ^f	493,750±11,967 ^b	587,500±7,216 ^a	612,500±16,137 ^a	631,250±18,750 ^a

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM .

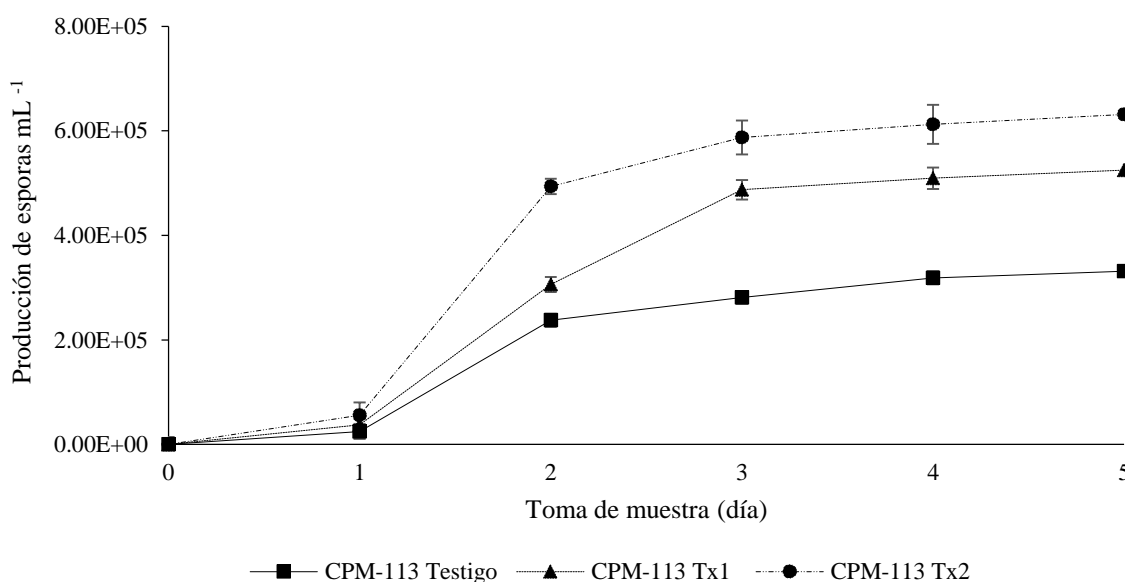


Figura 36. Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

8.2.2.3.3 CPM-115 de *T. pleuroti*

También se le realizó un análisis de varianza para conocer si existieron tratamientos diferentes, el cual nos dio una $F = 303$ y una significancia de < 0.0001 , siguiendo con una comparación de medias de Tukey con un $p < 0.005$ (Cuadro 18). Cuando se analizó a la cepa, se observó que en el último tiempo existió la mayor cantidad de esporas en el testigo con una producción de 6.9×10^6 esporas mL^{-1} . A pesar de que en el primer día el tratamiento Tx2 produjo una cantidad similar de esporas que el testigo, este último incrementó su producción

a partir del segundo día hasta el cuarto día, cuando se estabilizó. Para el caso de Tx1 se mantuvo 50% por debajo de los valores del testigo (Fig. 37).

Cuadro 18. Producción de esporas de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	1,837,500±75,346 ⁱ	4,918,750±21,347 ^e	5,850,000±30,618 ^d	6,193,750±48,277 ^c	6,943,750±70,248 ^a
Tx1	1,300,000±69,970 ^j	1,350,000±28,867 ^j	1,850,000±10,206 ⁱ	3,225,000±72,886 ^g	3,437,500±71,807 ^g
Tx2	1,862,500±98,16 ⁱ	2,818,750±6,250 ^h	4,125,000±36,799 ^f	5,718,750±55,316 ^d	6,618,750±44,924 ^b

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM .

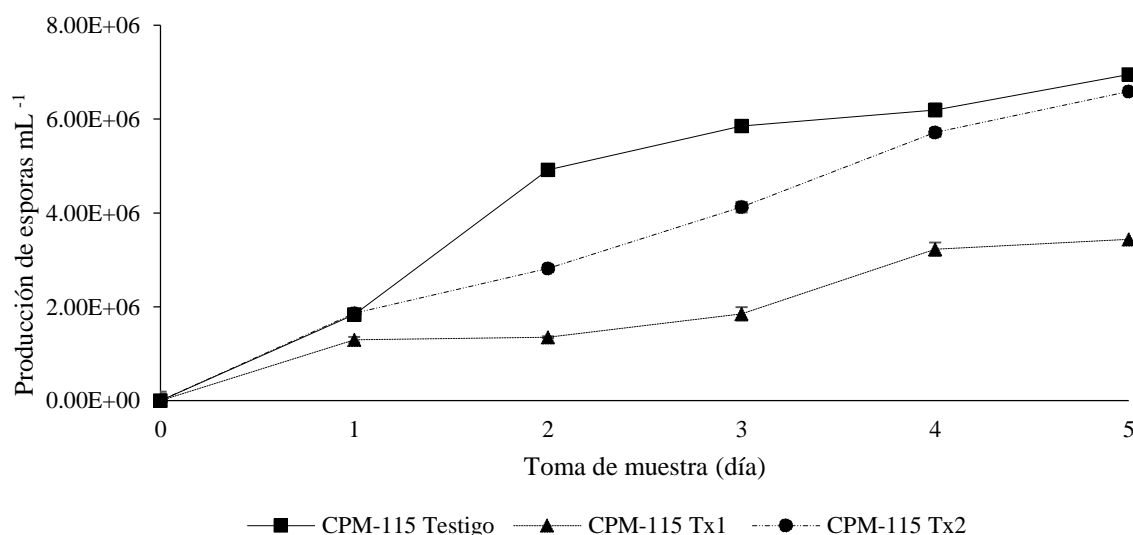


Figura 37. Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} de la cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

8.2.2.3.4 CPM-121 de *T. atroviride*

En esta cepa, los tratamientos con AAS no estimularon la producción de esporas, ya que desde el primer día se marcó una diferencia entre ellos y el testigo. La comparación de medias de Tukey demostró que el testigo fue el mejor en el tiempo 5 con una producción de esporas de 9.87×10^5 esporas mL^{-1} (Cuadro 19). Se pudo observar que la producción de esporas en los tratamientos Tx1 y Tx2 fue muy similar entre ellos, al tiempo final obtuvieron 5.68×10^5 esporas mL^{-1} y 5.62×10^5 esporas mL^{-1} , respectivamente (Fig. 38).

Cuadro 19. Producción de esporas de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride* en los cinco tiempos de toma de muestra.

Condiciones	1	2	3	4	5
Testigo	281,250±6,250 ^f	350,000±10,206 ^e	500,000±14,433 ^d	737,500±7,216 ^b	987,500±21,650 ^a
Tx1	206,250±6,250 ^g	262,500±7,216 ^f	375,000±10,206 ^e	493,750±11,967 ^d	568,750±6,250 ^c
Tx2	193,750±6,250 ^g	231,250±6,250 ^{fg}	343,750±11,967 ^e	456,250±11,967 ^d	562,500±7,216 ^c

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Testigo= PDA. Tx1= PDA + AAS 1 μM . Tx2= PDA + AAS 100 μM .

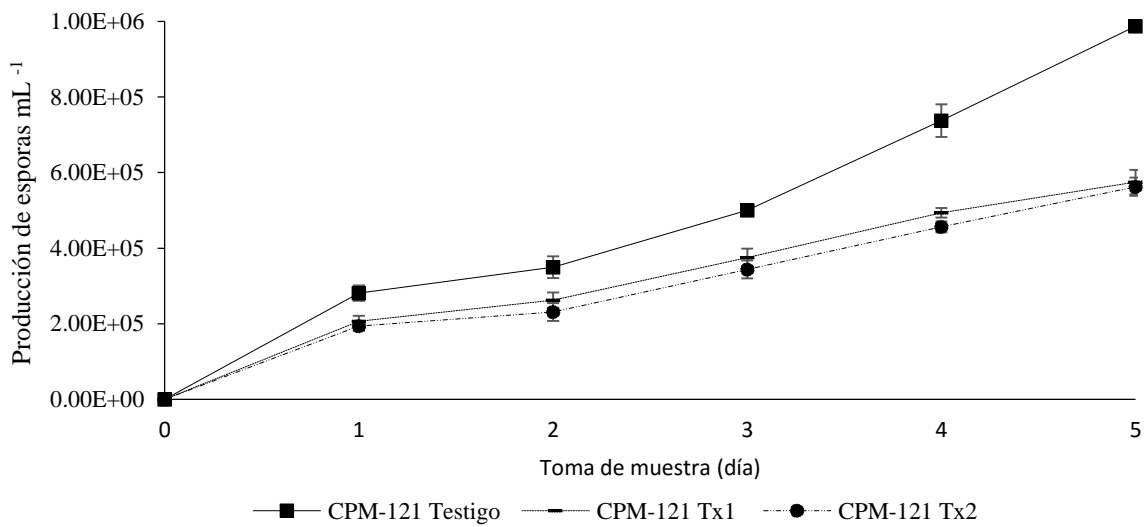


Figura 38. Cinética de cinco tiempos para medir la producción de esporas mL^{-1} de las cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*. Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

8.3 Análisis de varianza y correlación de las variables estudiadas

Para conocer si existieron diferencias significativas entre las variables estudiadas y cada una de las cepas evaluadas (CPM-108, CPM-113, CPM-115 y CPM-121), se realizó un análisis de varianza obteniéndose, que si hubo diferencias con una significancia de < 0.001 , por lo que se realizó una comparación de medias de Tukey, la cual nos mostró que la mejor cepa con los valores más altos en la producción de esporas fue la CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*. La mejor cepa productora de lacasas, mayor crecimiento lineal y área de la colonia fue la CPM-108 de *Trichoderma harzianum* (Cuadro 20).

Cuadro 20. Comparación de medias en la producción de esporas, producción de lacasas, velocidad de crecimiento y área de la colonia de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, al tiempo final de incubación de cada cepa.

Condiciones	CPM-108	CPM-113	CPM-115	CPM-121
P.E	2,058,333±19,555b	469,318±38,926d	5,225,000±384,175a	570,454±40,706c
P.L.	0.39±0.12a	0.05±0.02c	0.1±0.03b	0.12±0.04b
V.C.	5.86±0.04a	4.68±0.07d	5.43±0c	5.63±0.02b
A.C.	50.33±0.93a	40.27±0.8d	46.61±0.89c	47.2±0.12b

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). P.E = Producción de esporas (mL^{-1}). P.L.= Producción de lacasas (U mL^{-1}). V.C.= Velocidad de crecimiento (cm día^{-1}). A.C.= Área de la colonia (cm^2).

El análisis de varianza para determinar si hubo diferencia entre las variables estudiadas en cada uno de los tratamientos con AAS (Tx1, Tx2 y testigo), evidenció que si hubo diferencias significativas de < 0.0001 , por lo que realizó una comparación de medias de Tukey, con α 0.05%. Se observó que el mejor tratamiento para la producción de esporas fue Tx2 y el testigo. Para la actividad de lacasas fue el Tx1, y para el área como la velocidad de crecimiento, el mejor tratamiento fue Tx2 (Cuadro 21).

Cuadro 21. Comparación de los tratamientos Tx1, Tx2 y testigo en la producción de esporas, producción de lacasas, velocidad de crecimiento y área de la colonia, al tiempo 4 de la cinética de crecimiento

Condiciones	Testigo	Tx1	Tx2
P.E	2,429,688±598,566 ^a	1,281,250±298,878 ^b	2,453,333±572,452 ^a
P.L.	0.01±0 ^c	0.36±0.11 ^a	0.18±0.03 ^b
V.C.	5.35±0.04 ^b	5.32±0.1 ^b	5.43±0.09 ^a
A.C.	43.6±0.65 ^c	45.43±1.02 ^b	46.61±0.89 ^a

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). P.E = producción de esporas (mL^{-1}). P.L.= Producción de lacasas (U mL^{-1}). V.C.= Velocidad de crecimiento (cm día^{-1}). A.C.= Área de la colonia (cm^2). Testigo= PDA. Tratamiento 1 (Tx1)= PDA + AAS 1 μM . Tratamiento 2 (Tx2)= PDA + AAS 100 μM .

Se realizó una correlación de las variables con los tratamientos por el coeficiente de Pearson, con el objeto de saber si hubo una relación entre ambos. Para el caso del tratamiento Tx1 y Tx2, existió una correlación con las lacasas, el área y velocidad de crecimiento, mientras que para el testigo solo existió una correlación con el área y la producción de esporas pero a la inversa, es decir entre mayor fue el crecimiento mayor fue la producción de esporas y viceversa (Anexo 2). Con los datos obtenidos se comprueba la hipótesis del efecto del AAS en las variables estudiadas, lo cual nos abre una gama de oportunidades para realizar aplicaciones biotecnológicas en las cepas de *Trichoderma* en el ámbito agrícola.

IX. DISCUSIÓN

En todos los casos se observó un estímulo con los tratamientos que contenían ABTS, debido a que el ABTS en el medio de cultivo funcionó como sustrato del hongo promoviendo el crecimiento y la producción de esporas, además al actuar como co-oxidante de la enzima lacasa (Bourbounnais y Paice, 1990), ayudó en la oxidación del sustrato en un menor tiempo, dando como resultado los valores más altos cuando se mezcló con el AAS. En tres cepas, el crecimiento con los tratamientos que contenían ABTS y su combinación con AAS, fueron homogéneos. La cepa CPM-121 fue la única en presentar un estímulo en el crecimiento con el tratamiento de ABTS + AAS 1 μM , al terminar de colonizar la caja por completo un día antes que los demás tratamientos. La mejor cepa en la producción tanto de lacasas como de esporas fue la CPM-115 de *Trichoderma pleuroti* para lacasas con el tratamiento de ABTS, con una producción de $1.48 \pm 0.03 \text{ UmL}^{-1}$, y esporas con el tratamiento de ABTS + AAS 100 μM con una producción de 5.9×10^6 esporas mL^{-1} .

Se observó que en general la adición del AAS actuó como un estimulante para todas las cepas estudiadas. Para el caso de la morfología y el crecimiento no se presentaron cambios al compararlos con el testigo. En algunas ocasiones la adición del AAS favorecía la coloración y densidad tanto de esporas como de micelio, como fue el caso de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*.

Hasta el momento no se han realizado estudios referentes hacia el uso de AAS y su respuesta en el género *Trichoderma*, por lo que nos apoyaremos de trabajos en donde se ha evaluado al género *Metarhizium*, un hongo perteneciente a la misma división taxonómica que *Trichoderma* y que presenta algunas similitudes de acuerdo a los resultados que se obtuvieron al usar AAS.

Cuando se compara la producción de esporas al tiempo final contra la cinética de cinco tiempos nos indicó que la tendencia para CPM-108, CPM-113 y CPM-121 fue la misma. La producción de esporas no fue afectada en las cepas de CPM-108 y CPM-113, debido a que el AAS funcionó como estimulante, ya que la dosis fue ideal para favorecer este comportamiento. Estudios previos por Barnes y Moore (1997), quienes encontraron que al someter a *Metarhizium acridum* a altas concentraciones de AS (50 mM) la producción de esporas se inhibe por completo. Por otro lado Rangel *et al.* (2012), demostraron que en concentraciones de 1 a 8 mM de AS se disminuye la producción de esporas en un 67%, en

una cepa de *M. robertsii*. Por lo que se concluye que a una menor concentración de AAS, la producción de esporas se ve favorecida, esto coincide con los resultados encontrados en esta investigación. Para el caso de las cepas CPM-121 y CPM-115 probablemente estas concentraciones siguen siendo altas para la producción de esporas.

También se observó que las cepas se adaptaron de diferente manera a las concentraciones de AAS. Mientras que para algunas cepas la dosis más alta fue el AAS 100 μM , estimulando rápidamente la producción de esporas, para otras no tuvo ese efecto, como se describió anteriormente. Se notó que las dosis bajas de AAS 1 μM , estimula la producción de esporas lentamente, como fue el caso de *T. pleuroti* quien en un dato de tiempo final mostró tener un estímulo con AAS 1 μM , mientras que en la cinética de cinco tiempos este tratamiento siempre estuvo por debajo del testigo y el AAS 100 μM , pero aumentando conforme al tiempo, por lo que podemos inferir que le tomaría más tiempo alcanzar un dato similar al obtenido en el tiempo final del primer análisis.

En la fase cualitativa la única cepa que presentó actividad de lacasas fue CPM-121 de *T. atroviride* al ser evaluada tanto en el tratamiento de ABTS como en sus combinaciones con AAS, estudios anteriores realizados por Adnal *et al.* (2015), demostraron que una cepa de *T. atroviride* fue capaz de presentar actividad de la enzima y biodegradar el colorante RB5. Siguiendo su comportamiento durante la cinética se observó que fue a partir del segundo día cuando inició la actividad de lacasas, ya que se presentó un cambio en la coloración del medio de cultivo, un dato similar al que obtuvieron Zafra *et al.* (2015), cuando evaluaron la actividad de lacasas en la degradación de PHAs en una cepa de *T. asperellum*. Cuando se evalúa la actividad volumétrica de lacasas se puede observar que la tendencia en el testigo fue producir en los primeros días la cantidad máxima de enzimas, para después dejar de tener actividad, esto es posible debido la naturaleza de la cepa aun en presencia de un agente que estimule su producción como el caso PHAs (Zafra *et al.*, 2015). La misma tendencia del testigo se observó con el tratamiento de AAS 100 μM aunque en un 20% menor. Caso contrario ocurrió con el tratamiento con AAS 1 μM , quien promovió la actividad enzimática en la cepa a partir del tiempo cuatro, para que al tiempo 5 (8 días de incubación) alcanzara el pico máximo de $0.68 \pm 0 \text{ UmL}^{-1}$, mayor que el testigo. Pese a ello *T. atroviride* no fue la cepa que presento mejor actividad de lacasas, esto pudo deberse al pH y temperaturas óptimas que propician la producción de la enzima, como en el estudio realizado por Adnal *et al.*, (2015).

La mejor cepa que mostró tener la producción más alta de lacasas fue la cepa CPM-113 en el tratamiento de AAS 1 μM en el primer tiempo (3 días de incubación), con una producción de $1.34 \pm 0.07 \text{ U mL}^{-1}$. El estímulo de las demás cepas fue igualmente en el primer tiempo de toma de muestra, para el caso de la cepa CPM-108 fue con el tratamiento de AAS 1 μM con una producción de 1.19 ± 0.1 , este dato concuerda con investigaciones realizadas que confirman el potencial de *T. harzianum* para degradar colorantes (Sadhasivam *et al.*, 2009), y producir lacasas extracelulares dado su producción enzimática (Holker *et al.*, 2002). Se han realizado estudios para la optimización de las condiciones del cultivo para producir lacasas de este género (Gao *et al.*, 2013). Para la cepa CPM-115 fue con el tratamiento de AAS 100 μM con una producción de $1.18 \pm 0.07 \text{ U mL}^{-1}$. Como se pudo notar las cepas que presentaron actividad de lacasas no presentaron la actividad cualitativa debido a que el sustrato no fue el indicado para realizar la determinación, sería recomendable confirmar el estudio con otros sustratos enzimáticos, como el guayacol, siringaldanzina, DPM tal y como lo realizó Spezzia (2012), al evaluar a cepas de hongos basidiomicetos del género *Pleurotus*.

Contrastación de hipótesis

Se confirma que la aplicación de AAS obtuvo un efecto en las cepas de *Trichoderma* evaluadas, por lo que presentan un potencial considerable de aplicaciones biotecnológicas. A partir de los resultados obtenidos es factible planear una estrategia que involucre aplicaciones innovadoras de estas cepas de *Trichoderma*, encaminadas al área agrícola, la cual representa un interés colectivo.

X. CONCLUSIONES

1. El AAS mostro tener un efecto estimulante para la mayoría de las cepas evaluadas.
2. Para cada cepa la respuesta ante el AAS fue diferente. Cada concentración tuvo un estímulo distinto en la producción de esporas y la actividad de lacasas por lo que se recomienda realizar aplicaciones biotecnológicas enfocadas para cada cepa.
3. Las concentraciones altas de AAS 100 μ M favorecieron la producción de esporas en dos cepas de *Trichoderma*: *T. harzianum* y *T. aggressivum* f *aggressivum*, lo cual demostró su potencial para ser utilizadas en el control biológico.
4. Las mejores cepas que presentaron actividad volumétrica de lacasas con los tratamientos de AAS fueron la CP-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, CPM-108 de *T. harzianum* y CPM-115 de *T. pleuroti*, lo que nos indica un potencial para poder ser usadas en aplicaciones de biorremediación.

XI. ESTRATEGIA PARA APROVECHAR EL HONGO *Trichoderma* COMO BIOCONTROL DE FITOPATOGENOS Y BIORREMEDIAADOR DE SUELOS AGRICOLAS

11.1 Introducción

Con la llegada de la revolución verde (mediados del siglo XX) se dio un cambio en el modo de producir y utilizar pesticidas nocivos para el ambiente y la salud (Pichardo, 2006). La contaminación del suelo presenta una problemática importante ya que es utilizado en la agricultura como la principal actividad para la obtención de alimentos y la economía de muchas familias mexicanas, requiriendo especial atención por parte de varios sectores.

Por otro lado, se sabe que actualmente no es posible hablar de un control de plagas sin la utilización de agroquímicos y pesticidas que faciliten el control. Con tal panorama, se buscan nuevas tecnologías que ayuden a mitigar estos problemas de una manera sustentable.

Se sabe que el género *Trichoderma* tiene una alta capacidad para degradar diversos compuestos del sustrato donde se desarrolla. Su metabolismo enzimático tiene la capacidad de degradar una amplia variedad de sustratos, que van desde celulosa hasta compuestos inorgánicos (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Dicho potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su capacidad adaptativa de crecer en diferentes ambientes (Field *et al.*, 1993). Esta habilidad les permite a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes sustratos y acceder a los compuestos que constituyen los contaminantes más frecuentes de los suelos (Martín-Moreno *et al.*, 2004).

La presente estrategia plantea la producción y aplicación de bioformulados a base de inóculos de hongos del género *Trichoderma* en suelos agrícolas para atenuar los compuestos tóxicos derivados del petróleo. La cual se basa en el potencial de degradar y crecer en compuestos poliaromáticos del petróleo. Para conocer los recursos con que se cuentan para la elaboración de una propuesta de estrategia se realizó una matriz de potencialidades, limitaciones y problemas (Cuadro 22).

Cuadro 22. Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas de la estrategia.			
Área temática	Potencialidades	Limitaciones	Problemas
Recursos naturales y ambientales	Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas e identificadas de hongos comestibles	Falta de conocimiento de las especies con potencial enzimático	No se aprovecha los recursos genéticos con potencial para la biorremediación.
Sistema físico-natural	Suelos agrícolas fértiles	Residuos de pesticidas agrícolas, fertilizantes sintéticos e hidrocarburos; uso indiscriminado de agroquímicos	Perdida de la biodiversidad disminución de la calidad del suelo: Erosión, infertilidad, incapacidad para retener agua. Resistencia de enfermedades en las plantas cultivadas.
Área económica	Existencia de mercado para la comercialización de hongos Disponibilidad del AAS y su precio accesible	Pocas investigaciones aplicadas en las especies de <i>Trichoderma</i> en biorremediación	Baja producción y aprovechamiento del recurso genético de hongos competidores en diversas áreas.
Demografía y mercado de trabajo	Población: suelos de uso agrícola de alta productividad	Pocas oportunidades de empleo. Migración. Enfermedades causadas por tener contacto con los pesticidas	Enfermedades crónicas degenerativas a largo plazo.
Infraestructura	Espacios accesibles para la producción de hongos.	Falta de conocimiento sobre tecnologías para la producción del hongo y la aplicación en campo	Contaminación con otros microorganismos, no exista una reducción de las enfermedades en campo.
Aspectos institucionales	Planes de desarrollo sustentable. Normas mexicanas para la regulación de agroquímicos y contaminantes en México.	Poco conocimiento de las normas y aplicación de las mismas. Brindar apoyos técnicos especialistas en el área.	Falta de prevención y sanciones por parte de las instituciones

11.2 Actores sociales

La aplicación de nuevas tecnologías para el control de enfermedades, requiere del intercambio y el trabajo coordinado de los diferentes actores involucrados en el proceso de

adopción de la tecnología. Para los actores involucrados son de importancia los aspectos de responsabilidad acerca de la contaminación del suelo, la eliminación de los riesgos y la protección a la salud. A continuación se describen los principales actores implicados (Fig. 39).

1. La comunidad afectada: son los campesinos propietarios de los suelos agrícolas afectados por la contaminación de diferentes químicos (pesticidas, fertilizante y agroquímicos) e hidrocarburos, quienes tienen la responsabilidad de estar conscientes de los riesgos de la contaminación y de participar en las acciones necesarias para minimizarlos.
2. Responsables de la contaminación: son todas las personas o figuras que están involucradas en los problemas de contaminación, que sea de forma accidental o imprudencial. Tienen como responsabilidad la remediación y eliminación de los riesgos a la salud del público.
3. Las instituciones gubernamentales: son las instituciones encargadas de regular, administrar, gestionar soluciones relacionadas con los problemas de contaminación. Por ejemplo SAGARPA, CONAGUA, COFEPRIS, PROFEPA, SEMARNAT, CNH. Tienen una corresponsabilidad por los procesos de gestión administrativa (en cuanto al cumplimiento de las disposiciones legales) y la responsabilidad por la protección de los recursos naturales y la protección de la salud humana.
4. La comunidad científica: tienen que dar informaciones científicas y apoyar en el proceso de minimizar el riesgo para la salud. Tienen que proporcionar los servicios necesarios complementarios para formar recursos humanos calificados y competitivos en todos los campos de la formación, así como en lo referente a la investigación y desarrollo (I+D) y la transferencia de tecnología.

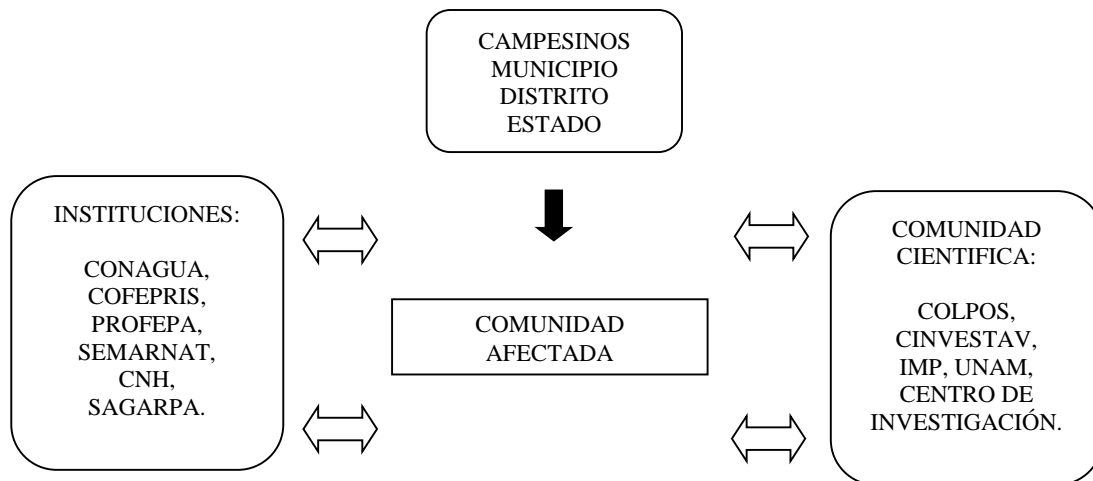


Figura 39. Actores implicados en el proceso de la implementación de la estrategia.

11.3 Objetivos estratégicos y específicos

En el cuadro 23, se presentan los objetivos, resultados y actividades principales que conlleva la propuesta de estrategia para recuperar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos y pesticidas en México.

Cuadro 23. Objetivos de la estrategia para el manejo del hongo *Trichoderma* y la aplicación de formulados para el biocontrol y la biorremediación de suelos agrícolas contaminados en México.

OBJETIVO GENERAL	Disminuir el uso de agroquímicos así como lograr un desarrollo sustentable en la producción agrícola conservando a los suelos agrícolas contaminados con pesticidas en México utilizando hongos filamentosos (mohos).
OBJETIVOS ESPECIFICOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aprovechar el potencial de los hongos en las actividades agrícolas. 2. Restaurar suelos agrícolas contaminados con residuos de agroquímicos, tales como herbicidas y pesticidas 3. Mejorar la calidad de vida de las familias agrícolas afectadas.
RESULTADOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suelos agrícolas libres de contaminación. 2. Desarrollo de técnicas para recuperar suelos contaminados <i>in situ</i>. 3. Manejo integral sostenible en el campo agrícola. 4. Manual para el cultivo de hongos con potencial para el control biológico y para biorremediar suelos agrícolas.
ACTIVIDADES	<ol style="list-style-type: none"> 1. Experimentación en microcosmos para evaluar la producción enzimática en suelo. 2. Realizar pruebas antagónicas con hongos patógenos de plantas. 3. Determinación de la expresión genética de cepas de <i>Trichoderma</i>. 4. Evaluación de diferentes sustratos sólidos suplementados con ácido acetil salicílico para la producción de enzimas. 5. Recuperación de las enzimas producidas por los mohos. 6. Diseños de técnicas para la aplicación <i>in situ</i> (Bioreactores y Biopilas). 7. Elaboración de manuales para la recuperación de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos usando hongos.

XII. LITERATURA CITADA

- Abadulla, E., T. Tzanov, S. Costa, K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo y G. M. Gübitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3357-3362.
- Adnan, L. A., P. Sathishkumar, A. R. M. Yusoff y T. Hadibarata. 2015. Metabolites characterisation of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104: 274-282.
- Adrio, J. L. y A. L. Demain. 2014. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4(1): 117-139.
- Alexopoulos, C. J. y C. W. Mims. 1979. *Introductory Mycology*. 3rd. New York: Willey.
- Amici, C., A. Rossi y M. G. Santoro. 1995. Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the Heat Shock Response. *Cancer Research* 55: 4452-4457.
- Andberg, M., N. Hakulinen, S. Auer, M. Saloheimo, A. Koivula, J. Rouvinen y K. Kruus. 2009. Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. *FEBS Journal* 276: 6285-6300.
- Argumedo-Delira, R. 2011. Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Postgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Edo de México.
- Argumedo-Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato y J. J. Peña-Cabriales. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (4): 257-269.
- Aristegui, B. 2002. El reino de los hongos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1-3.
- Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P.S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe y J. Kaplan. 1994. The FET3 gene of *S. Cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for the ferrous iron uptake. *Cell* 76: 403-410.
- Assavaning, A., B. Amornkitticharoen, N. Ekpaisal, V. Meevootisom y T. M. Flegel. 1992. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology Biotechnology* 38: 198-210.
- Barnes, S. E. y D. Moore. 1997. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research* 101(06): 662-666.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd. Minnesota: Burgess Publishing Company. 241p.
- Bell, D., H. Wells H. y C. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*: 72: 379-382.
- Bell, D. E. 1992. Convention on Biological Diversity: The Continuing Significance of US Objections at the Earth Summit, The. *Geo. Wash. J. Int'l L. & Econ.*, 26, 479.
- Benavides-Mendoza, A., A. M. Ramirez, F. Robledo, V. Ramírez y H. Maiti. 2004. Tratamiento de semilla de chile con ácidos salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío. *Terra Latinoamericana* 22(1): 41-47.
- Benhamou, N. y I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultraestructure and Gold Cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83(10): 1062-1071.

- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes of section *Longibrachiatum*. *Can J. Bot.* 69: 2418-2420.
- Borsani, O. V. Valpuesta, M. A. Bottella. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126: 1024-1030.
- Bourbonnais, R. y M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
- Bourbonnais, R., M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie y S. Borneman. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4627-4632.
- Buchert, J. M., Ranua, M. Siika-aho, J. Pere y J. Viikari. 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. *Applied Microbiology Biotechnology* 40: 941-945.
- Camacho, F. 2013. Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. México. 88 pp.
- Cañedo V. y T. Ames. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pp 62.
- Cázeres-García, S. V., M. S. Vázquez-Garcidueñas y G. Vázquez-Marrufo. 2013. Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a bioinformatic approach. *PLoS one* 8(1): e55295. DOI: 10.1371/journal.pone.0055295.
- CENAPRED. 2001. *Diagnóstico de Peligros e Identificación de Riesgos de Desastres en México: Atlas Nacional de Riesgos de la República Mexicana*, 1ª edición, Centro Nacional de Prevención de Desastres, Secretaría de Gobernación, D. F., México.
- Chakroun, H., T. Mechichi, M. J. Martínez, A. Dhouib y S. Sadayi. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 45: 507-513.
- Chet, I., N. Benhamou y S. Haran. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Harman GE, Kubicek C.P. (eds). *Enzymes, biological control and commercial application. (Trichoderma and Gliocladium, vol 2)* Taylor and Francis, London, pp 153-171.
- Choi, I.-Y., G.-T. Joung, J. Ryu, J.-S. Choi y Y.-G. Choi. 2003. Physiological characteristics of green mold (*Trichoderma* spp.) isolated from oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Microbiology* 31(3) 139-144.
- Colavolpe, M. B., S. Jaramillo Mejía y E. Albertó. 2014. Efficiency of treatments for controlling *Trichoderma* spp. during spawning in cultivation of lignicolous mushrooms. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(4): 1263-1270.
- Convention on Biological Diversity. 1992.
- Desai, S. S. y C. Nityanand. 2011. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 98-124.
- Druzhinina, I. S., A. G. Kopchinskiy y C. P. Kubicek. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Duran, N. y E. Esposito. 2000. Potencial aplicaciones of oxidative enzymes and phenoloxidase- like compounds in wast water and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B. Environ.* 28: 83-99.
- Enríquez del Valle, J. R., G. Carrillo Castañeda, P. Sánchez García, M. N. Rodríguez Mendoza y M. C. Mendoza Castillo. 2001. Efecto de los ácidos acetilsalicílico e

- indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista de Fitotecnia Mexicana* 24(1): 71-78.
- Esperanza-Ramírez, N., M. C. Vargas, J. C. Ariza y C. Martínez. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5 (2): 64-72.
- Fan, Y., W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin, K. Jin, M. J. Bidochka, e Y. Pei, 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 295–302.
- Galante, Y. M., R. Monteverdi, S. Inama, C. Caldini, A. De Conti, V. Lavelli y F. Bonomi. 1993. New applications of enzymes in wine making and olive oil production. *Italian Journal of Biochemistry* 4: 34-38.
- Gao, H. J., Y. W. Wang, K. Zhao y Q. X. Liu. 2013. Media optimization for laccase production by *Trichoderma harzianum* ZF-2 using response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(12): 1757-1764.
- Gochev, V. K. y A. I. Krastanov. 2007. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13: 171-176.
- Harman, G., I. Chet y R. Baker. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. *Phytopathology* 71: 569-572.
- Harman, G. E., M. B. Kurtz y S. P. Champe. 1983. Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordial of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 154: 955-964.
- Hatvani, L. 2008. Mushroom pathogenic *Trichoderma* species: occurrence, biodiversity, diagnosis and extracellular enzyme production. Ph. D. dissertation. Department of Microbiology, University of Szeged, Hungría.
- Herrera-Estrella, A. e I. Chet. 1998. Biological control of bacteria and phytopathogenic fungi. En “Agricultural Biotechnology”. Arie Altman Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, NY 10016, USA. pp. 263-282.
- Higgins, S. M. y W.W. Lilly. 1993. Multiple responses to heat stress by the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Current Microbiology* 26: 123-127.
- Holker, U., J. Dohse y M. Hofer. 2002. Extracellular laccases in ascomycetes. *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiology* 47: 423-427.
- Hublik, G. y F. Schinner. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 330-336.
- Huiju, G., X. Chu, Y. Wang, F. Zhou, K. Zhao, Z. Mu y Q. Liu. 2013. Media optimization for laccase production by *Trichoderma harzianum* ZF-2 using response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(12): 1757-1764.
- INEGI-SEMARNAP, 1997. *Estadísticas del Medio Ambiente*. INEGI-SEMARNAP, México.
- Infante, D., B. Martínez, N. González e Y. Reyes. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal* 24(1): 14-25.
- Jiménez-Cisneros, B. E. 2001. *La Contaminación Ambiental en México. Causas, Efectos y Tecnología*. Limusa. México. 925 pp.
- Kalra, K., R. Chauhan, M. Shavez y S. Sachdeva. 2013. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of pH and temperature on its activity. *International Journal of ChemTech Research* 5(5): 2229-2235.

- Khan, N., S. Syeed, A. Masood, R. Nazar y N. Iqbal. 2010. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *International Journal of Plant Biology* 1e110.4081/pb.2010.e1.
- Kilaru, S., P. J. Hoegger, A. Majcherczyk, C. Burns, K. Shishido, A. Bailey, G. D. Foster y U. Kües. 2006a. Expression of laccase gene *IccI* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 200-210.
- Kredics, L., L. García Jiménez, S. Naeimi, D. Czifra, P. Urbán, L. Manczinger, C. Vágvölgyi y L. Hatvani. 2010. A challenge to mushroom growers: the green disease of cultivated champignons. Méndez-Vilas, A. (Ed.). In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Pp: 295-305.
- Krystofová, S., L. Varecla, Y. Voller, J. Grimova y V. Betina. 1994. Growth and conidiation of *Trichoderma viride* are affected by non-steroidal antiinflammatory agents. *Folia Microbiologica* 39(1): 44-48.
- Kunamneni, A., A. Ballesteros, F. J. Plou y M. Alcalde. 2007. Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 1: 233-245.
- Lucas, L. R., A. M. Robles Gómez, A. Galvez del Postigo Ruíz, T. García Gutiérrez, T. Pérez Pulido, R. Álvarez de Cienfuegos y G. López. 2001. Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaén. Pp. 148.
- Manual- Biorad. 2000. Instruction manual and applications guide. Bio-rad laboratories.
- Marco-Urrea, E., I. García-Romera y E. Aranda. 2015. Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology* 32(6): 620-628.
- Martínez, E. 2003. Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 305 p.
- Martínez-Carrera, D. 1995. Classical and molecular characterization of the *Agaricus bitorquis* complex. Ph. D. Thesis. King's College London.
- Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schüller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis y F. Estruch. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *The EMBO Journal* 15(9): 2227-2235.
- Mathur, G., R. Nigam, A. Jaiswal, A. y C. Kumar, C. 2013. Bioprocess parameter optimization for laccase production in solid state fermentation. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research* 4(6): 521-530.
- Matsumura, E., E. Yamamoto, A. Numata, T. Kawano, T. Shin y S. Murao. 1986. Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS [2, 2'-Azino-di-(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]. *Agricultural and Biological Chemistry* 50: 1355-1357.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y A. Díaz-Castro. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154-167.

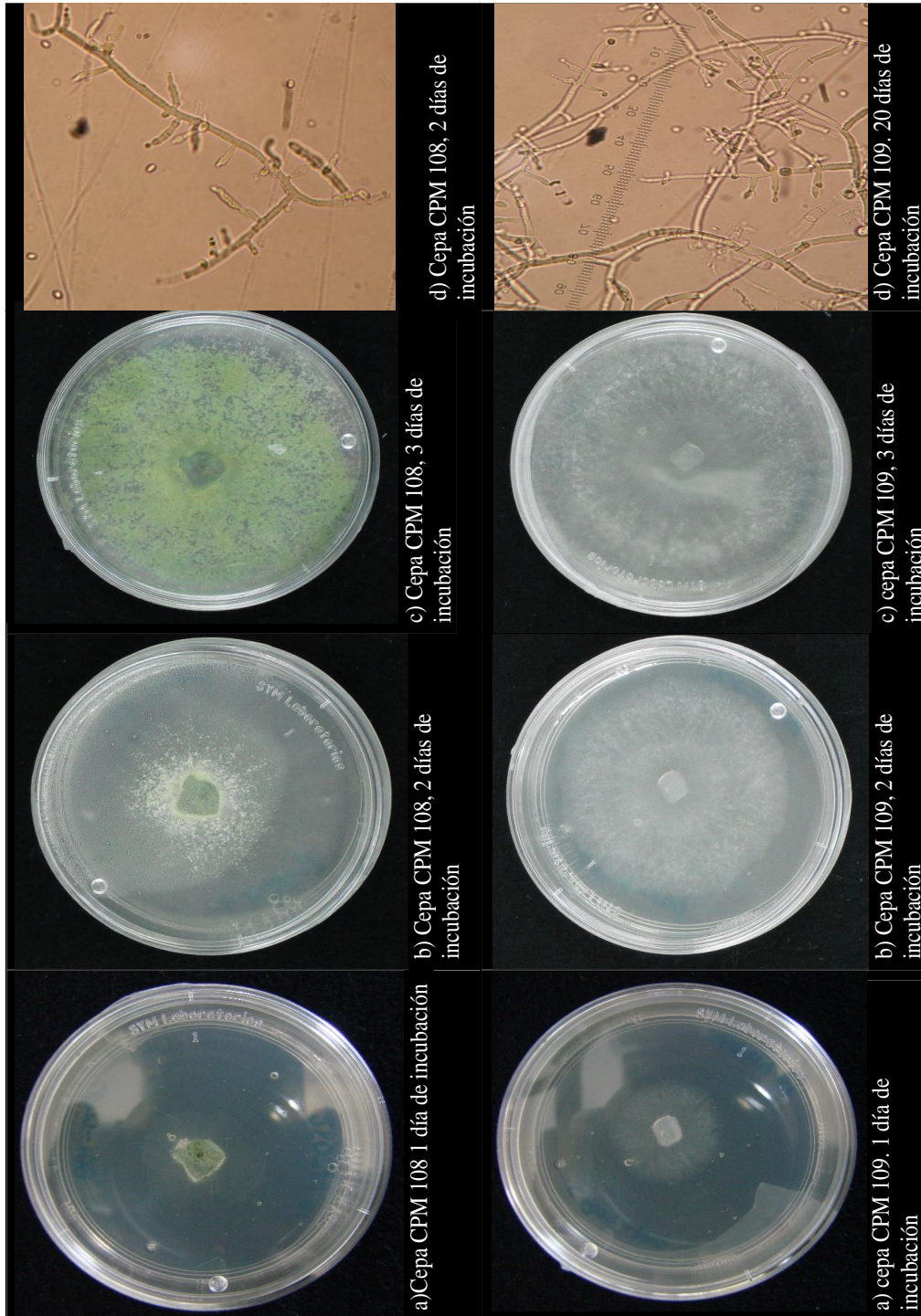
- Michel-Aceves, A. C., M. A, Otero-Sánchez, R. D. Martínez-Rojero, N. L. Rodríguez-Morán, R. Araiza-Flores y A. Barrios-Ayala. 2006. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 185-191.
- Mordechai, T. 1989. Method of growing *Trichoderma*. Unite States Patent. Patent Number 4,837,155. U. S. A.
- Novotny, C., K. Svobodova, P. Erbanova, T. Cajthaml, A. Kasinath, E. Lang y V. Sasek. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracelular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1545-1551.
- Ortega, P. 2002. Plagas, enfermedades y competidores en plantas productoras de hongos comestibles en la región central de México y la estrategia para su prevención y control. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *Campus Puebla*.
- Pantone, 2001. Formula Guide Solid Costed Colors por Fiery, (Pantone Inc., 2001, E.U.A).
- Papavizas, G, J. Lewis y T. Abd-Elmoity. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Pemex. 2001. Derrames y fugas de hidrocarburos. Seguridad, salud y medio ambiente. Pp 18-19. Disponible en: http://www.pemex.com/files/content/dsi_01_12_derrames_fugas.pdf.
- Pérez-Armendáriz, B., O. Loera-Corral, L. Fernández-Linares, F. Esparza-García y R. Rodríguez-Vázquez. 2004. Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in Applied Microbiology* 38: 373-377.
- Persoon, C. H. 1794. Dispositio methodica fungorum. *Neues Magazin für die Botanik* 1: 81-128.
- Pichardo, B. 2006. La revolución verde en México. *Agraria* (Sao Paulo) 4: 40-68.
- Pitt, J. L. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, 634 pp.
- Rangel, A. M. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia de patógenos en plantas. *Instituto de Investigaciones Químico Biológicas* 12(2): 90-95.
- Rangel, D. E., É. K. Fernandez, A. J. Anderson y D. W. Roberts. 2012. Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. *Fungal Biology* 116(3): 438-442.
- Ravelet, C., S. Krivobok, L. Sage y R. Steiman. 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40: 557-563.
- Rendón, G. A. 2015. Caracterización y cultivo de diferentes recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*. Puebla. Pp 158.
- Resing, L., C. Monnerjahn y U. Meyer. 1998. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. *FEMS Microbiology letters* 168: 159-166.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116: 1-56.
- Rodríguez, S. 2006. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*, expresión heteróloga de estas enzimas y aplicación en la degradación de compuestos aromáticos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. 175 p.

- Rojo, F. G., M. M. Reynoso, M. Ferez, S. N. Chulze y A. M. Torres. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Prot.* 26: 549-555.
- Sadhasivam, S., S. Savitha y K. Swaminathan. 2007. Exploitation of *Trichoderma harzianum* micelial waste for the removal of rhodamine 6G from aqueous solution. *Journal of Environment Management* 85: 155-161.
- Sadhasivam, S., S. Savitha y K. Swaminathan. 2009. Redox metiated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 25: 1733-1741.
- Salgado-Siclán, M. L. 2012. Inductores de Resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Samuels, G. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100: 923-935.
- Samuels, G., W. Gams, L. A. Castlebury y O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94(1): 146-170.
- Saraswathy, A. y R. Helberg. 2002. Degradation of pyrene by indigenus fungi for a former gasworks site. *FEMS Microbiol Lett.* 210: 227-232.
- Sekme, S., N. Atacı e I. Arisan. 2013. Studies on Laccase Activity in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *IUFS Journal of Biology* 72(2): 37-42.
- SEMARNAT. 2007. Fuentes de contaminación en México. Instituto Nacional de Ecología. Periférico 5000, Col. Insurgentes Cuicuilco, C.P. 04530, Delegación Coyoacán, México D.F. Última Actualización: 15/11/2007. Disponible en <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2008. *La Biodiversidad y la Agricultura: Salvaguardando la biodiversidad y asegurando alimentación para el mundo*. Montreal, 56 páginas.
- Siwulski, M., K. Sobieralski, J. Lisiecka, L. Blaszczyk, D. Fruzynska-Jozwiak, R. Gorski e I. Sas-Golak. 2013. The effect of substrate infestation with *Trichoderma* isolates on yielding of *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 12(1): 77-88.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta y D. Martínez-Carrera. 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Pp. 14. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds: J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, W. Martínez, F. Galván, D. Sihuana, F. Quiriz, M. Juárez y D. Martínez-Carrera. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. Pp. 175-187. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 13*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.

- Spezzia, T. 2012. Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de bioremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.
- Stefanova, M., A. Leiva, L. Larriganaga y M. F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía* 16: 509-516.
- Subramanian, C. V. 1983. *Hyphomycetes; Taxonomy and Biology* (1a Ed). New York: Academic Press.
- Téllez-Jurado, A., M. G. Cruz Ramírez, Y. Mercado Flores, A. Asaff Torres y A. Arana-Cuenca. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30: 73-80.
- Tovar, J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* vs *Rhizoctonia solani*. Tesis Doctoral en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá.
- Van Deuren, J., Z. Y. Wang y J. Ledbetter. 1997. *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. Third ed. Technology Innovation Office.
- Velázquez-Cedeño, M. A. M. Farnet, C. Billette, G. Mata y J. M. Savoie. 2007. Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions based on the production of laccase isozymes. *Biotechnology Letters* 29(10): 1583-1590.
- Verdin, A., A. L. Sahraoui y R. Durand. 2004. Degradation of benzo [a] pyrene by mitosporic fungi and extracelular oxidative enzymes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 53: 65-70.
- Verma, M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli y J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.
- Wesenberg, D., I. Kyriakides, y S. N. Agathos. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22(1): 161-187.
- Winegarden, N. A., K. S. Wong, M. Sopta y J. T. Westwood. 1996. Sodium silylate decreases intracellular ATP, induces both heat shock factor binding and chromosomal puffing, but does not induce hsp 70 gene transcription in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 26971-26980.
- Woo, S. L., M. Ruocco, F. Vinale, M. Nigro, R. Marra, N. Lombardi, A. Pascale, S. Lazuisse, G. Manganiello y M. Lorito. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal* 8(1): 71-126.
- Zafra, G., A. Moreno-Montaña, Á. E. Absalón y D. V. Cortés-Espinoza. 2015. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 1034-142.
- Zhang, C., I. Druzhinina, C. P. Kubick y T. Xu. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 251-257.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1. Mohos del genero *Trichoderma* depositadas en el cepario del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.

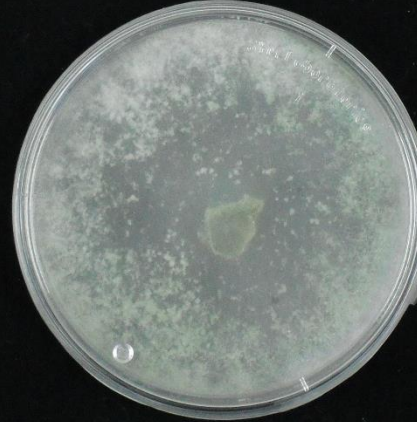




Cepa CP-M 37. 1 día de incubación



Cepa CPM 37. 2 días de incubación



Cepa CPM 37. 3 días de incubación



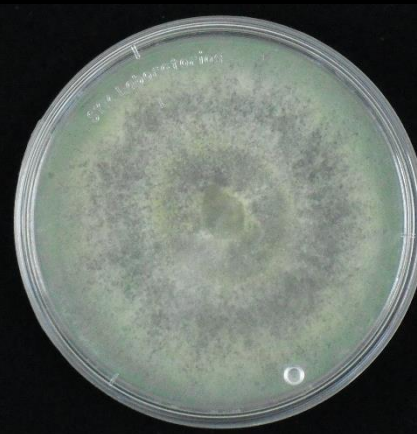
Cepa CPM 37. 13 días de incubación



a) Cepa CPM 38. 1 día de incubación



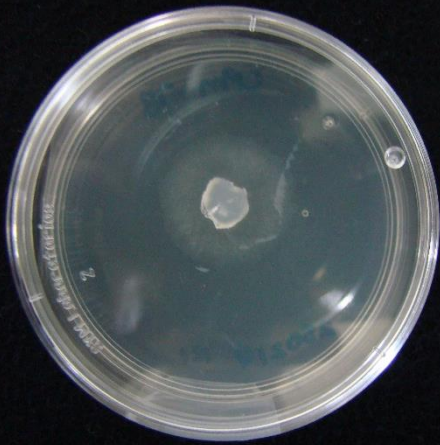
b) cepa CPM 38. 2 días de incubación



c) cepa CPM 38. 3 días de incubación



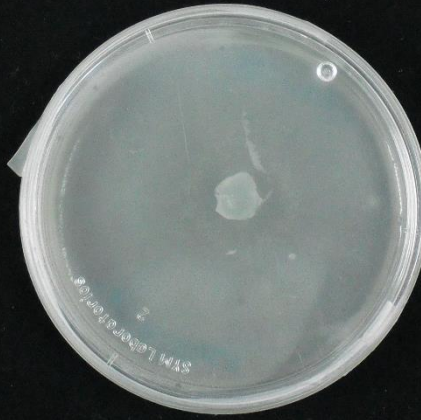
c) cepa CPM 38. 3 días de incubación. Muestra montada en azul de metileno



a) Cepa CPM-78. 1 día de incubación



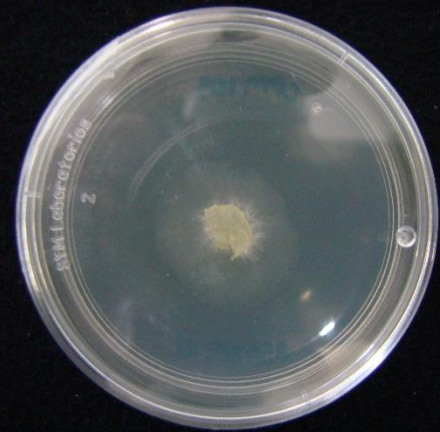
b) Cepa CPM-78. 2 días de incubación



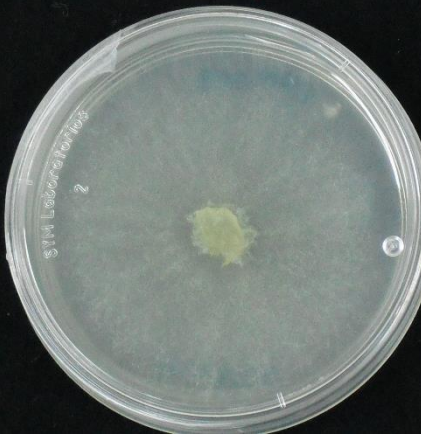
c) Cepa CPM-78. 3 días de incubación



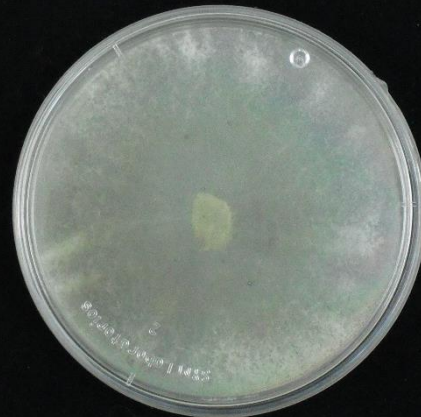
CPM-78, 3 días de incubación, micelio



a) cepa CPM 103. 1 día de incubación



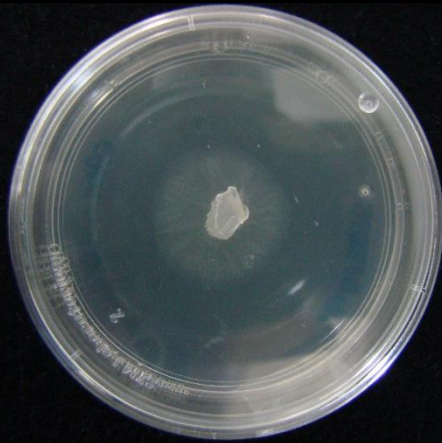
a) cepa CPM 103. 2 días de incubación



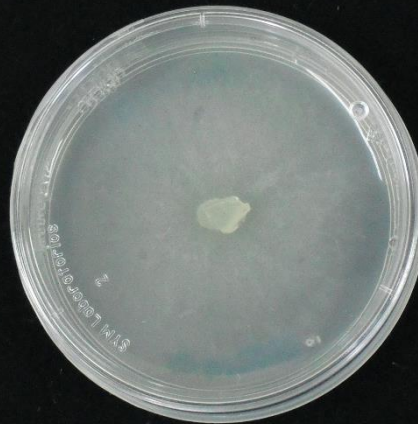
a) cepa CPM 103. 3 días de incubación



Cepa CPM 103. 10 Días de incubación.



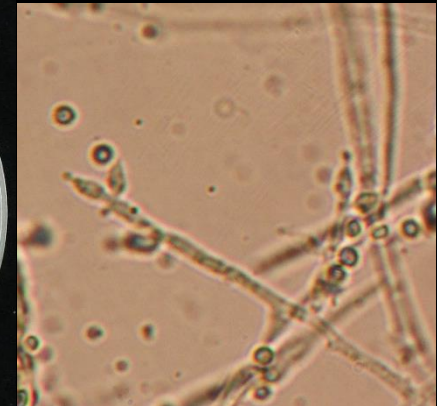
a) Cepa CPM 110. 1 día de incubación



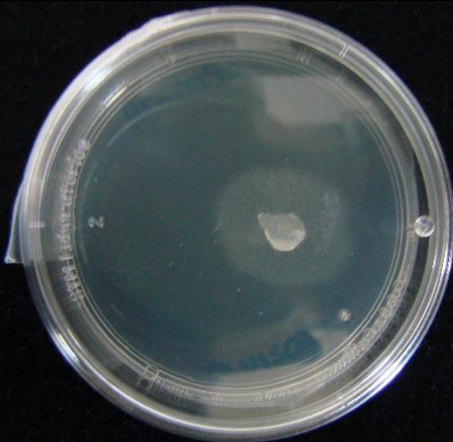
b) Cepa CPM 110. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 110 3 días de incubación



Cepa CPM 110. 12 días de incubación.



a) cepa CPM 111. 1 día de incubación



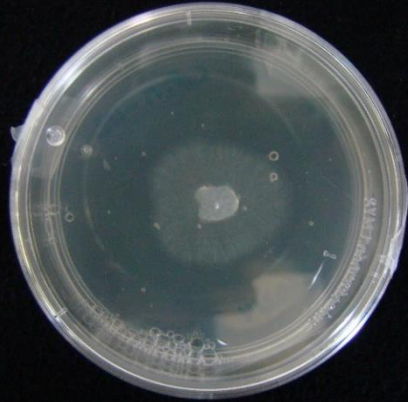
b) cepa CPM 111. 2 días de incubación



c) cepa CPM 111. 3 días de incubación



Cepa CPM 111. 3 días de incubación



a) cepa CPM 112. 1 día de incubación



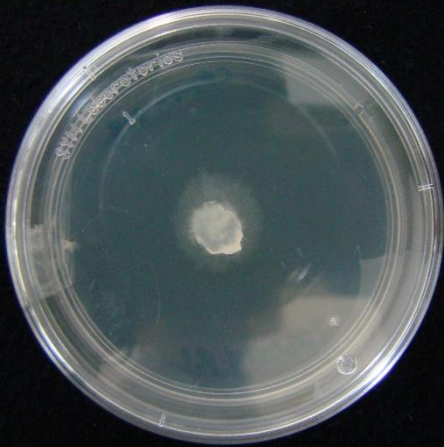
b) Cepa CPM 112. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 112. Tres días de incubación



Cepa CPM 112. 6 días de incubación



a) Cepa CPM 113. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 113. 2 días de incubación



c) cepa CPM 113. 3 días de incubación



Cepa CPM 113. 10 días de incubación



a) Cepa CPM 114. Un día de incubación



b) Cepa CPM 114. 2 días de incubación



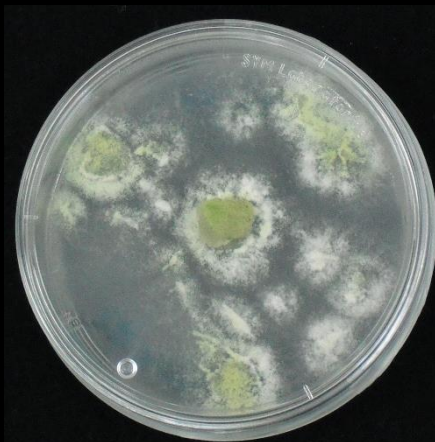
c) Cepa CPM 114. 3 días de incubación



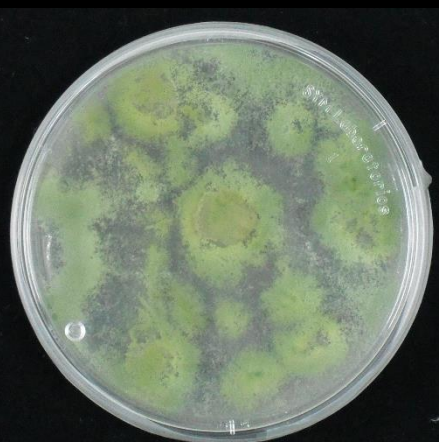
d) Cepa CPM 114. 6 días de incubación



a) Cepa CPM 115. 1 día de incubación



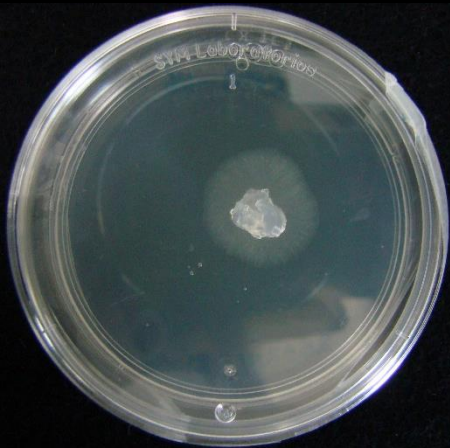
b) cepa CPM 115. 2 días de incubación



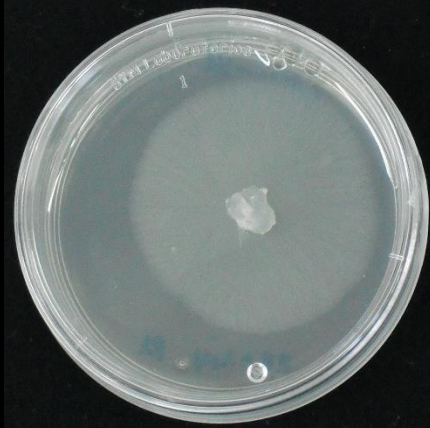
c) cepa CPM 115. 3 días de incubación



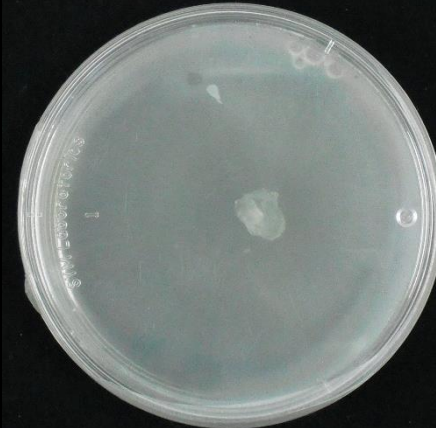
Cepa CPM 115. 4 días de incubación



a) cepa CPM 116. Un día de crecimiento



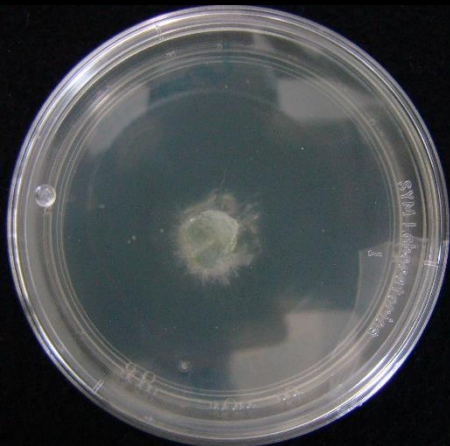
b) cepa CPM 116 dos días de crecimiento



c) cepa CPM 116. Tres días de crecimiento



CPM- 116,cinco días de incubación, micelio.



a) Cepa CPM 117. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 117. 2 días de incubación



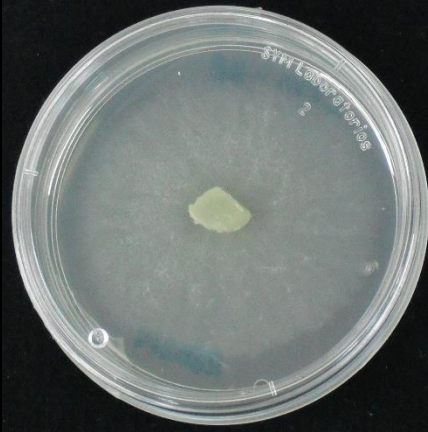
c) Cepa CPM 117. 3 días de incubación



d) Cepa CPM 117. 4 días de incubación.



a) Cepa CPM 118. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 118. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 118. 3 días de incubación



d) Cepa CPM 118. 8 días de incubación. objetivo: 10X



a) Cepa CPM 119. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 119. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 119. 3 días de incubación



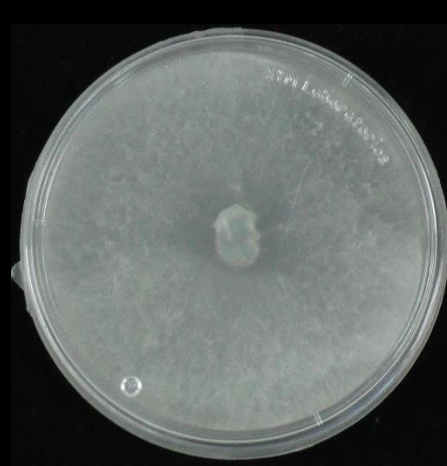
d) Cepa CPM 119. Cuatro días de incubación



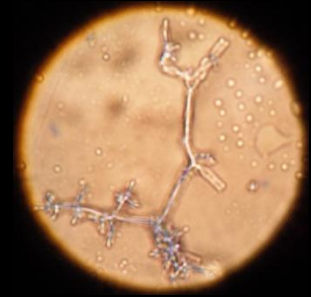
a) Cepa CPM 120. 1 día de incubación



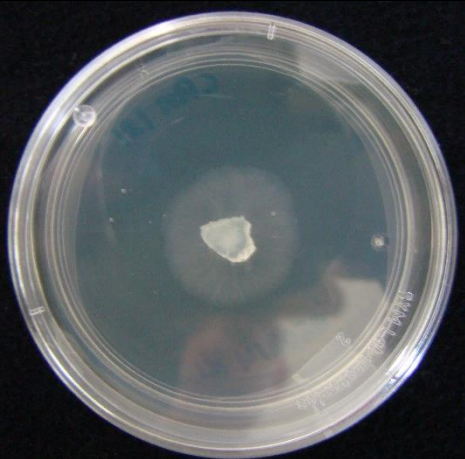
b) Cepa CPM 120. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 120. 3 días de incubación



CPM-120, 3 días de incubación



a) Cepa CPM 121. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 121. 2 días de incubación



c) cepa CPM 121. 3 días de incubación



Cepa CPM 121. 10 días de incubación



a) cepa CPM 122. 1 día de incubación



b) cepa CPM 122. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 122. 3 días de c incubación



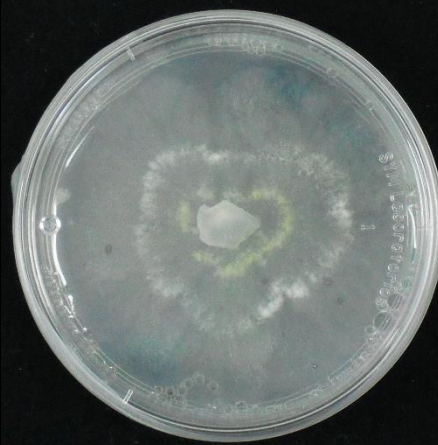
d) Cepa CPM 122. 13 días de incubación



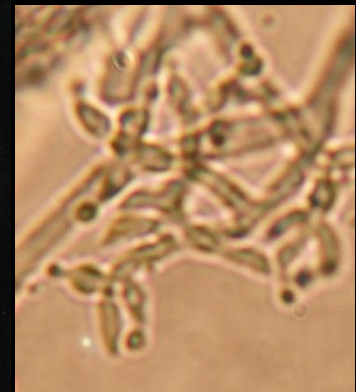
a) Cepa CPM 123. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 123. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 123. 3 días de incubación



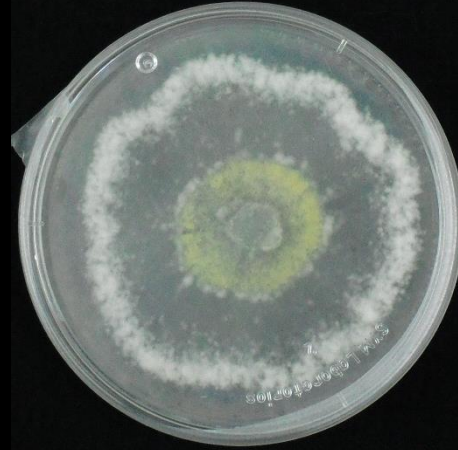
d) Cepa CPM. 123. 9 días de incubación



a) Cepa CPM 124. 1 día de incubación



b) Cepa 124. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 124. Tres días de incubación



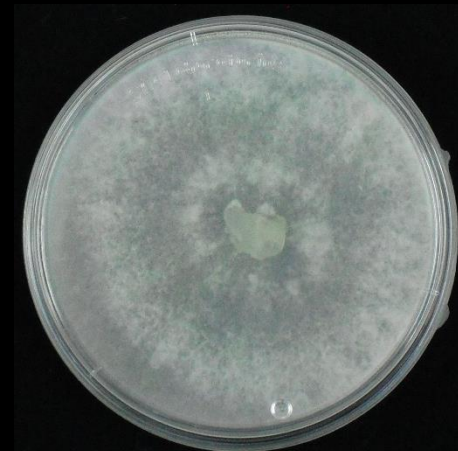
d) Cepa CPM 124. 6 días de incubación



a) Cepa CPM 125. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 125. 2 días de incubación



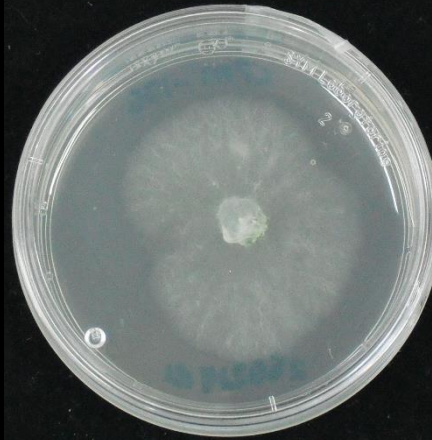
c) Cepa CPM 125. 3 días de incubación



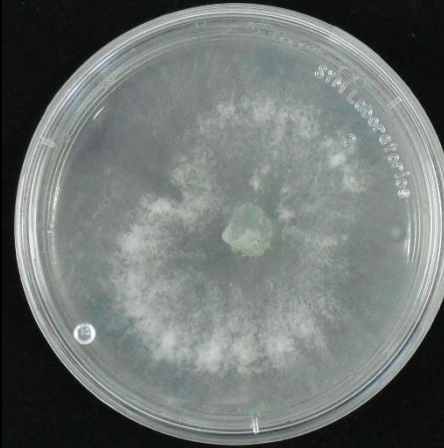
d) Cepa CPM 125. 15 días de incubación



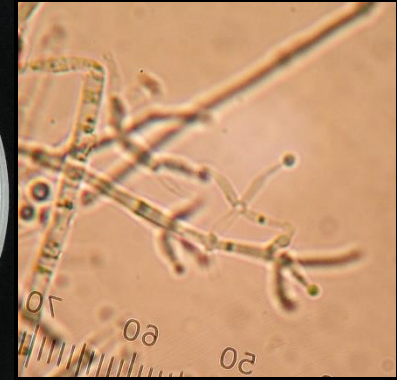
a) Ceba 126. 1 día de incubación



b) Ceba 126. 2 días de incubación



c) cepa 126. 3 días de incubación



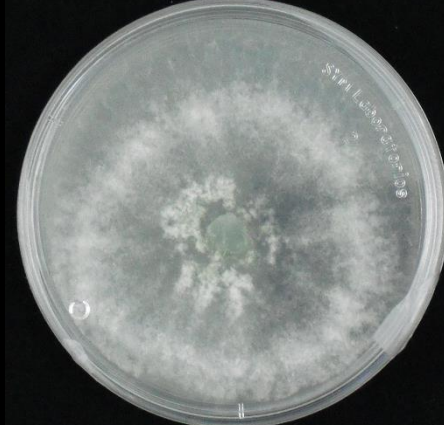
d) Ceba 126. 6 días de incubación



a) Ceba CPM 127. 1 día de crecimiento



b) Ceba CPM 127. 2 días de incubación



c) Ceba CPM 127. 3 días de incubación



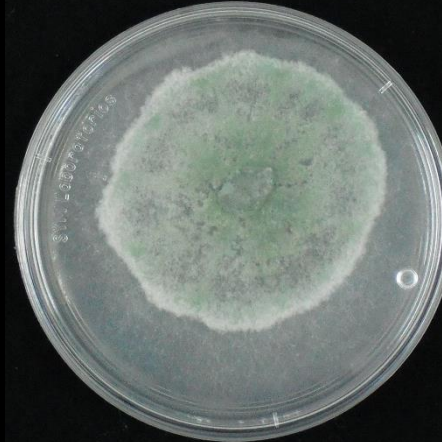
d) Ceba CPM 127 15 días de incubación



a) Cepa CPM 128. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 128. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 128. 3 días de incubación



d) Cepa CPM 128. 15 días de incubación



a) Cepa CPM 129. 1 día de incubación



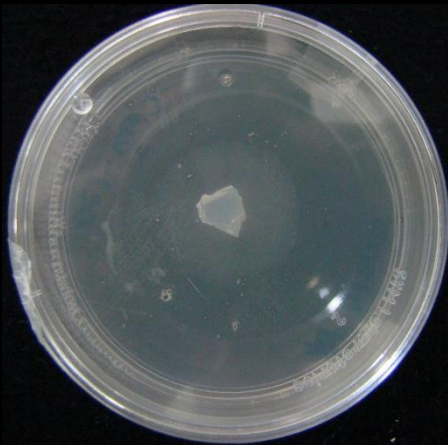
b) Cepa CPM 129. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 129. 3 días de incubación



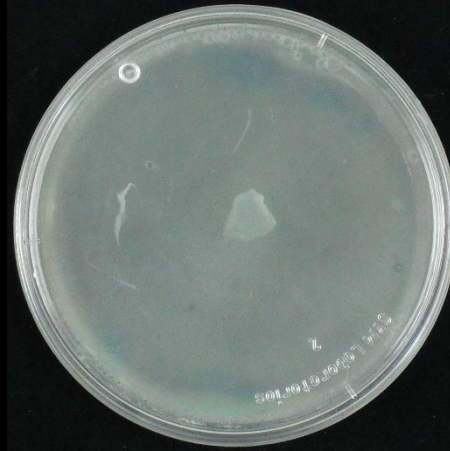
c) Cepa CPM 129. 3 días de incubación



a) Cepa CPM 130. 1 día de incubación



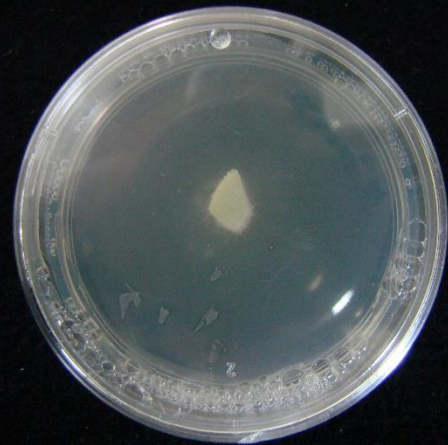
b) Cepa CPM 130. 2 días de incubación



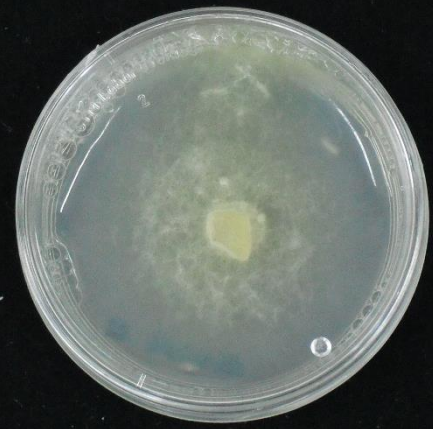
c) Cepa CPM 130. 3 días de incubación



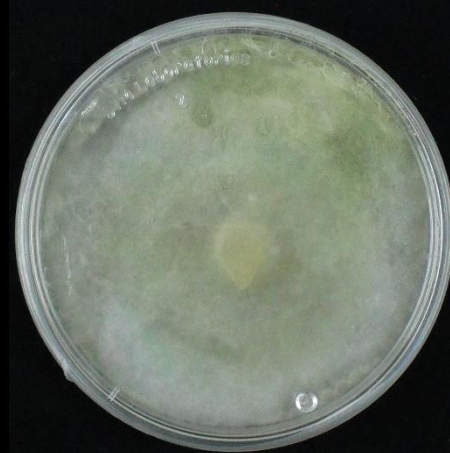
d) Cepa CPM 130. 19 días de incubación



a) Cepa CPM 136. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 136. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 136. 3 días de incubación



d) Cepa CPM 136. 19 días de incubación



a) Cepa CPM 137. 1 día de incubación



b) Cepa CPM 137. 2 días de incubación



c) Cepa CPM 137. 3 días de incubación



d) Cepa CPM 137. 2 días de incubación. Muestra montada en azul de metileno.

ANEXO 2. Análisis estadístico de la actividad de lacasas

2.1 Cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 72

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	5.16909191	0.36922085	148.96	<.0001
Error	30	0.07435733	0.00247858		
Total correcto	44	5.24344924			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Esp Media
0.985819	16.55586	0.049785	0.300711

Fuente	DF	Cuadrado de Anova SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	5.16909191	0.36922085	148.96	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	30
Error de cuadrado medio	0.002479
Valor crítico del rango estudentizado	5.21140
Diferencia significativa mínima	0.1498

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	1.19300	3	8A1L1
B	0.84633	3	8A1L4
C	0.54333	3	8A100L5
D C	0.46633	3	8A1L2
D E	0.32567	3	8A100L4
D E	0.32133	3	8A1L5
E	0.28867	3	8A1L3
E	0.27733	3	8A100L3
E	0.24000	3	8A100L2
F	0.00867	3	8TL5
F	0.00000	3	8A100L1
F	0.00000	3	8TL2
F	0.00000	3	8TL3
F	0.00000	3	8TL4
F	0.00000	3	8TL1

2.2 Cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*.

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 81

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	4.74211685	0.33872263	236.85	<.0001
Error	30	0.04290344	0.00143011		
Total correcto	44	4.78502029			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Esp Media
0.991034	20.47943	0.037817	0.18465

Fuente	DF	Cuadrado de Anova SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	4.74211685	0.33872263	236.85	<.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 82

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 30
 Error de cuadrado medio 0.00143
 Valor crítico del rango estudentizado 5.21140
 Diferencia significativa mínima 0.1138

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	1.34233	3	13A1L1
B	0.30767	3	13A100L
C B	0.28467	3	13A1L5
C D	0.17400	3	13A100L5
D	0.16233	3	13A100L1
D	0.15700	3	13A1L2
E D	0.13567	3	13A100L3
E D F	0.11200	3	13A100L4
E F	0.03800	3	13A1L4
E F	0.02353	3	13A1L3
F	0.01667	3	13TL4
F	0.00833	3	13TL3
F	0.00767	3	13TL5
F	0.00000	3	13TL2
F	0.00000	3	13TL1

2.3 Cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 90

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	5.62406493	0.40171892	220.49	<.0001
Error	30	0.05465696	0.00182190		
Total correcto	44	5.67872189			

R-cuadrado 0.990375
 Coef Var 15.16331
 Raiz MSE 0.042684
 Esp Media 0.281493

Fuente	DF	Cuadrado de Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	5.62406493	0.40171892	220.49	<.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 91

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 30
 Error de cuadrado medio 0.001822
 Valor crítico del rango estudentizado 5.21140
 Diferencia significativa mínima 0.1284

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	1.18300	3	15A100L1
B	0.94533	3	15A1L1
C	0.63267	3	15A1L2
D	0.43267	3	15A100L2
E	0.26100	3	15A1L3
F E	0.20300	3	15A1L4
F E	0.15240	3	15A100L3
F G	0.13133	3	15A100L4

F	G	0.13067	3	15A1L5	
F	G	H	0.12400	3	15A100L5
G	H	0.01833	3	15TL5	
G	H	0.00800	3	15TL4	
H	0.00000	3	15TL3		
H	0.00000	3	15TL2		
H	0.00000	3	15TL1		

2.4 Cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 99

Procedimiento ANOVA
Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	1.87562920	0.13397351	210.98	<.0001
Error	30	0.01905000	0.00063500		
Total correcto	44	1.89467920			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Esp Media
0.989946	13.73004	0.025199	0.183533

Fuente	DF	Cuadrado de Anova SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	1.87562920	0.13397351	210.98	<.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 100

Procedimiento ANOVA
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	30
Error de cuadrado medio	0.000635
Valor crítico del rango estudentizado	5.21140
Diferencia significativa mínima	0.0758

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.68333	3	21A1L5
B	0.58000	3	21TL1
C	0.36800	3	21TL2
D	0.26067	3	21A1L4
E D	0.19567	3	21A100L2
E	0.15600	3	21TL3
E	0.15433	3	21A100L1
E	0.13367	3	21A100L4
E	0.12900	3	21A100L3
F	0.04200	3	21A1L3
F	0.02800	3	21A1L1
F	0.01400	3	21A1L2
F	0.00833	3	21TL4
F	0.00000	3	21A100L5
F	0.00000	3	21TL5

2-5 Cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 4

Procedimiento ANOVA
Variable dependiente: Concentración de Esporas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	5.6324755E13	4.0231968E12	4873.53	<.0001
Error	45	37148437500	825520833.33		
Total correcto	59	5.6361904E13			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	CE Media
0.999341	2.135868	28731.88	1345208

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	5.6324755E13	4.0231968E12	4873.53	<.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 5

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Concentración de Esporas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	45
Error de cuadrado medio	8.2552E8
Valor crítico del rango estudentizado	5.07062
Diferencia significativa mínima	72844

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	3037500	4	8A100E5
B	2725000	4	108TE5
C	2562500	4	8A100E4
D	2468750	4	108TE4
E	1737500	4	108A1E5
F E	1681250	4	8A100E3
F	1631250	4	108TE3
G	1143750	4	108A1E4
H	906250	4	8A100E2
H	856250	4	108TE2
I	600000	4	108A1E3
J	296875	4	108A1E2
K	193750	4	8A100E1
K	175000	4	108TE1
K	162500	4	108A1E1

2.6 Cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 14

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: CE

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	2.4311302E12	173652157738	482.04	<.0001
Error	45	16210937500	360243055.56		
Total correcto	59	2.4473411E12			

R-cuadrado	0.993376
Coef Var	5.232874
Raiz MSE	18980.07
CE Media	362708.3

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	2.4311302E12	173652157738	482.04	<.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 15

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para CE

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	45
Error de cuadrado medio	3.6024E8
Valor crítico del rango estudentizado	5.07062
Diferencia significativa mínima	48120

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	631250	4	13A100E5
A	612500	4	13A100E4
A	587500	4	13A100E3

B	525000	4	113A1E5
B	509375	4	113A1E4
B	493750	4	13A100E2
B	487500	4	113A1E3
C	331250	4	113TE5
D C	318750	4	113TE4
D C	306250	4	113A1E2
D E	281250	4	113TE3
E	237500	4	113TE2
F	56250	4	13A100E1
F	37500	4	113A1E1
F	25000	4	113TE1

2.7 Cepa CPM-115 de *Trichoderma pleuroti*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 44

Procedimiento ANOVA
Variable dependiente: Concentración de Esporas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	2.3124631E14	1.6517594E13	1325.09	<.0001
Error	45	560937500000	12465277778		
Total correcto	59	2.3180725E14			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	CE Media
0.997580	2.884961	111648.0	3870000

Fuente	DF	Cuadrado de Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	14	2.3124631E14	1.6517594E13	1325.09	<.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 45

Procedimiento ANOVA
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Concentración de Esporas
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	45
Error de cuadrado medio	1.247E10
Valor crítico del rango estudentizado	5.07062
Diferencia significativa mínima	283062

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	6943750	4	115TE5
B	6618750	4	15A100E5
C	6193750	4	115TE4
D	5850000	4	115TE3
D	5718750	4	15A100E4
E	4918750	4	115TE2
F	4125000	4	15A100E3
G	3437500	4	115A1E5
G	3225000	4	115A1E4
H	2818750	4	15A100E2
I	1862500	4	15A100E1
I	1850000	4	115A1E3
I	1837500	4	115TE1
J	1350000	4	115A1E2
J	1300000	4	115A1E1

2.8 Cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 54

Procedimiento ANOVA
Variable dependiente: Concentración de Esporas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
--------	----	-------------------	----------------------	---------	--------

Modelo	14	2.6543333E12	189595238095	426.59	<.0001
Error	45	20000000000	444444444.44		
Total correcto	59	2.6743333E12			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	CE Media
0.992522	4.827905	21081.85	436666.7

		Cuadrado de		
Fuente	DF	Anova SS	la media	F-Valor Pr > F
trat	14	2.6543333E12	189595238095	426.59 <.0001

Sistema SAS 13:08 Wednesday, November 17, 2015 55

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Concentración de Esporas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	45
Error de cuadrado medio	4.4444E8
Valor crítico del rango estudentizado	5.07062
Diferencia significativa mínima	53449

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	987500	4	121TE5
B	737500	4	121TE4
C	568750	4	121A1E5
C	562500	4	21A100E5
D	500000	4	121TE3
D	493750	4	121A1E4
D	456250	4	21A100E4
E	375000	4	121A1E3
E	350000	4	121TE2
E	343750	4	21A100E3
F	281250	4	121TE1
F	262500	4	121A1E2
G F	231250	4	21A100E2
G	206250	4	121A1E1
G	193750	4	21A100E1