

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Producción y Actividad de Metabolitos Secundarios de Diferentes Especies de
Trichoderma en la Producción Radicular del Cultivo de Melón (*cucumis melo* L.)

Por:

ALEXIS VUELVAS CALDERÓN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Producción y Actividad de Metabolitos de Diferentes Especies de *Trichoderma* en
la Producción Radicular del Cultivo de Melón (*Cucumis melo* L.)

Por:

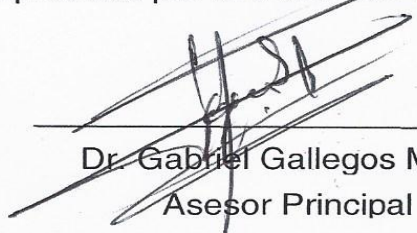
ALEXIS VUELVAS CALDERON

TESIS

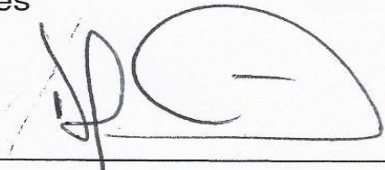
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

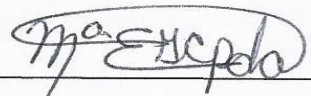
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría



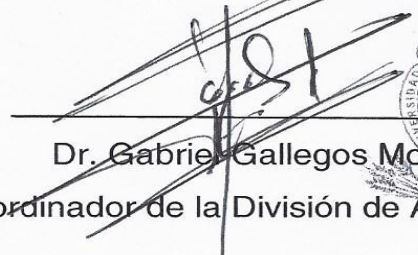
Dr. Gabriel Gallegos Morales
Asesor Principal






Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Coasesor

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la vida. Por haberme dado la facultad de concluir mi carrera profesional, por darme la fuerza suficiente para no dejarme vencer por los problemas que se presentaron y por brindarme salud durante el tiempo que estuve lejos de mi familia.

A mi ALMA MATER por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar un sueño más de mi vida.

A mis ASESORES

AL DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación, que es parte fundamental

AL DR. DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO por su colaboración, tiempo y dedicación que me sirvieron para la realización de este trabajo.

A LA Dra. Ma. ELIZABETH GALINDO CEPEDA por la ayuda en la realización de este trabajo y por las atinadas correcciones realizadas en esta tesis

A LA Dra. MIRIAM DESIREÉ DÁVILA MEDINA por brindarme su apoyo en la realización de este proyecto tan importante para mí.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE GENERACIÓN por haberme brindado su amistad. Por todos los momentos vividos a lo largo de mi carrera, en especial al Ing. Irvin de la Cruz M., Ing. José Valdez M., a todos los cochos del módulo 4, Cristian Contreras, Abner Gómez, César Espinoza, Cesar Monroy, Floriberto J. y todo el equipo de Syngenta Guerrero.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Sr. EULOGIO VUELVAS GARCÍA

Sra. AURELIANA CALDERÓN MARTÍNEZ

Por su infinito amor y confianza que tuvieron en cada instante de mi vida, por su inagotable lucha y esfuerzo que realizaron para brindarme la oportunidad de estudiar y darme la mejor de las herencias: una formación profesional. Por eso y por mucho más les estaré agradecido toda la vida.

A MI ESPOSA: ARACELI MEDINA JIMENEZ

A MI HIJO: JOSUE VUELVAS MEDINA

Por apoyarme incondicionalmente durante toda la estancia en mi ALMA MATER, por ser el principal objetivo de superarme en la vida.

A MIS HERMANOS:

LAURA YURITZI VUELVAS CALDERON

KEVIN VUELVAS CALDERON

CUÑADO: CARLOS GADYEL BAHENA OCAMPO

Por apoyarme en los momentos más difíciles de la vida y aconsejarme en momentos importantes de la misma.

AL ING. FILIVERTO VELARDE GASTELLUM Por brindarme su amistad incondicional y apoyarme en la estancia de mi carrera.

A MIS ABUELOS:

Camerino Calderón De La Sancha, Sabina Martínez Gandarilla

Joaquín Vuelvas Amado, Estefanía García Salgado

Por ser el pilar de una gran familia, que me han ayudado en mi formación profesional.

A mis tíos: Juana Calderón Martínez, Fany Calderón Martínez, Vicenta Calderón Martínez, Honorina Vuelvas García, Jacinto Vuelvas García, Javier Vuelvas García, Jesús Vuelvas García, Mauro Martínez, Alfredo Martínez Pastor Martínez, pero en especial:

(+)ANGELES CALDERON CATALÁN

A MIS PRIMOS: Eder y Edson Pastor Martínez Calderón, Mauro Martínez, Iván Huerta Martínez, Cristián Martínez, Juan Alfredo Martínez.

A TODOS MIS AMIGOS MUSICOS

GRUPO BUITRE UAAAN: Gracias a mi ALMA MATER por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo cultural norteño banda, en especial a mis amigos Daniel Aldaco, Francisco Reyes, Herbert Noriega (tubero), Efraín Maya, Hernán Santiago, Evaristo Maldonado y Luis Enrique Galindrez.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pagina
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	II
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE APENDICE	X
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia de los Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal-	4
Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPM)	5
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento	6
Hongos Micorrizas Arbusculares	7
Generalidades de <i>Trichoderma spp</i>	8
Características morfológica	8
Importancia en la agricultura	8
Control Biológico	9
<i>Trichoderma</i> como estimulante del crecimiento vegetal	9
Metabolitos secundarios de <i>Trichoderma spp.</i>	11

	Pagina
Fitoestimuladores Vegetal -----	12
Fitohormonas -----	13
Biozyme TF -----	14
Tween 20 -----	15
MATERIALES Y METODOS -----	16
Ubicación del Experimento -----	16
Microorganismos Biológicos Evaluados -----	16
Incremento de Microorganismos -----	16
Preparación del Caldo Papa Sacarosa -----	17
Siembra del Microorganismo -----	17
Obtencion del Extracto Metabólico -----	17
Determinación de Ácido 3 Indolacético -----	18
Aplicación de Extractos Extraídos Durante los Tres Tiempos de Incubación -	18
Biozyme TF -----	19
Parámetros de Evaluación -----	19
Tratamientos -----	19
Diseño experimental -----	20
RESULTADOS Y DISCUSIONES -----	21
Producción de Extractos de <i>Trichoderma</i> -----	21
Determinación Cualitativa de Ácido 3 Indolacético (AIA) -----	23
Germinación de Semillas de Melón -----	24

	Pagina
Análisis raíz Primaria -----	24
Análisis raíces Secundarias -----	27
CONCLUSIONES -----	30
BIBLIOGRAFÍA -----	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Microorganismos promotores crecimiento plantas. -----	5
2	Mecanismos de acción directa de las Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas. -----	6
3	Microorganismos fito estimuladores del crecimiento vegetal. -----	12
4	Análisis de longitud raíz primaria de semillas de melón, tratadas con extracto de diversas cepas de <i>Trichoderma</i> , en los tres tiempos diferentes de incubación. -----	25
5	Análisis raíces secundarias de semillas de melón, tratadas con extracto de diversas cepas de <i>Trichoderma</i> , en los tres tiempos diferentes de incubación. -----	28

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> en el medio, Caldo Papa Sacarosa a 24 Horas de incubación. -----	21
2	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> en el medio, Caldo Papa Sacarosa 48 horas de incubación -----	21
3	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> en el medio Caldo Papa Sacarosa a las 72 horas de incubación giratoria. -----	22
4	Sedimentación del micelio de las cepas de <i>Trichoderma</i> incubados durante 48 horas en medio caldo papa sacarosa. -----	22
5	Reacción de AIA comercial a la aplicación del reactivo de Salkowski en relación 1:1. -----	23
6	Tinción del reactivo de Salkowski a las muestras de las cepas de <i>Trichoderma</i> en relación 1:1. -----	26
7	Media del estímulo de crecimiento de raíz primaria de semillas de melón, tratados con extractos de <i>Trichoderma</i> en tres tiempos de incubación. -----	27
8	Media del estímulo de crecimiento de raíces secundarias de semillas de melón, tratados con extractos de <i>Trichoderma</i> en tres tiempos de incubación. -----	29

INDICE DE APENDICE

Cuadro		Página
1	Crecimiento de la raíz primaria de semillas de melón, tratadas 24 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	38
2	Crecimiento de la raíz primaria de semillas de melón, expresado en centímetros, tratadas 24 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	38
3	Crecimiento de la raíz primaria de semillas de melón, expresado en centímetros, tratadas 48 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	39
4	Crecimiento de la raíz primaria de semillas de melón, expresado en centímetros, tratadas 48 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	39
5	Crecimiento de la raíz primaria de semillas de melón, expresado en centímetros, tratadas 72 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	40
6	Análisis de varianza de crecimiento de la raíz primaria de semillas de melón, tratadas 72 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> . -----	40

Cuadro		Página
7	Numero de las raíces secundarias de semillas de melón, tratadas 24 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	41
8	Análisis de varianza del número de raíces secundarias de semillas de melón, tratadas 24 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	41
9	Numero de las raíces secundarias de semillas de melón, tratadas 48 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	42
10	Análisis de varianza del número de raíces secundarias de semillas de melón, tratadas 48 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	42
11	Numero de las raíces secundarias de semillas de melón, tratadas 72 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	43
12	Análisis de varianza del número de raíces secundarias de semillas de melón, tratadas 72 horas después de obtener el extracto de diversas especies de <i>Trichoderma</i> .-----	43

INTRODUCCIÓN

Las hortalizas constituyen un grupo de cultivos fundamentales en la producción agrícola, representando un renglón fundamental desde el punto de vista tanto económico y social (Pulido *et al.*, 2003). Actualmente, el melón mexicano tiene gran importancia en el mercado internacional por su calidad tanto por su superficie sembrada como la captación de divisas (Arellano, 1993).

Actualmente un factor que permite alcanzar mayor competitividad en el mercado mundial de los productos agrícolas es la reducción del uso de agroquímicos, cuyo costo depende en gran medida del precio del petróleo y tiene impactos nocivos sobre el medio ambiente (Caballero- Mellado, 2004). La sustitución parcial o total de agroquímicos por los beneficios de los microorganismos repercute en altos rendimientos del cultivo, además de ser una alternativa valiosa para lograr una producción sostenible. La utilización de microorganismos benéficos ha tenido una amplia difusión en los últimos años, debido a su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos en distintas situaciones y a la factibilidad de permitir desarrollar una agricultura orgánica (Compant, 2005).

Los inoculantes microbianos representan una nueva tecnología para mejorar la productividad de los sistemas agropecuarios a largo plazo. Es una tecnología limpia, alineada con los principios de la agricultura sustentable, frente al abuso de la utilización de pesticidas y fertilizantes. Los microorganismos son utilizados en la práctica agrícola habitual, y otros tienen potencialidad para ser utilizados en el futuro (Naiman *et al.*, 2009). A finales de la década de los 70 Kloepper y Schroth utilizaron el término PGPR (Plant Growth Promoting Bacteria) para referirse a aquellas bacterias que se encuentran libres en el suelo, capaces de adaptarse, colonizar y permanecer en la rizósfera de la planta. Recientemente la denominación se ha extendido a microorganismos PGP (Plant Growth Promoting) para incluir hongos y cualquier organismo afín (Aguirre, 2009).

Desde hace varios años se conoce la habilidad de los hongos para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial de su sistema radicular por excreción de hormonas vegetales como las auxinas. Los microorganismos PGP como *Trichoderma spp.* también ayudan al control de patógenos que podrían estar presentes en la rizósfera, además de actuar como bioestimulador del crecimiento radical (Capull *et al.*, 2010). Un efecto remarcable se observa sobre el sistema radicular, en donde se incrementa el desarrollo de raíces adventicias y pelos absorbentes, estos últimos muy importantes para la absorción de nutrientes (Pérez *et al.*, 2009).

Sandoval *et al.*, (1992) demostró que biopreparados de *T. harzianum* aplicados a plantas de tomate y pimiento favorecen su desarrollo, al conseguirse plantas de mayor altura, hojas más grandes y un crecimiento radicular de mayores dimensiones. La inducción al crecimiento de las plantas superiores por la síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sustentable (Frankenberger, 1995).

Palabras clave. *Trichoderma*, Bioestimulador, Promotores Crecimiento Vegetal, Metabolitos secundarios.

Correo electrónico; Alexis Vuelvas Calderón, honner39vuca@gmail.com

OBJETIVO.

Determinar el efecto de los metabolitos secundarios de varias especies de *Trichoderma* en el desarrollo radical de semillas de melón.

Evaluar el efecto de los metabolitos secundarios en la producción de raíces primarias en el cultivo de melón.

Evaluar el efecto de los metabolitos secundarios en producción de raíces secundarias en el cultivo de melón.

Determinar la producción de Ácido Indol Acético en los exudados de *Trichoderma spp.*

HIPÓTESIS

Al menos una cepa de *Trichoderma spp.* mostrará algún efecto estimulante en la germinación de semillas de melón.

Al menos una cepa producirá el Ácido Indol Acético

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de los Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal

Los microorganismos tienen un papel fundamental en ambientes naturales debido a su cantidad y diversidad pero sobre todo por las actividades que desarrollan ya que en la mayoría de los casos tienen influencia en organismos superiores con los que comparte un nicho ecológico. Concretamente en el suelo, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que influyen en el desarrollo y nutrición vegetal (Barea y Olivares, 1998). El suelo está constituido de una multitud de diferentes especies de microorganismos, la rizósfera es un ambiente que la planta misma ayuda a crear y donde los microorganismos patógenos y benéficos constituyen una fuerte influencia sobre la sanidad y crecimiento de las plantas. Entre los microorganismos y otros agentes que se encuentran en la rizósfera se incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y microartrópodos (Johansson *et al.*, 2004).

En la rizósfera existe una expresión de relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, ya que la raíz proporciona un nicho ecológico, al exudar nutrimentos orgánicos útiles para el metabolismo microbiano (González, 2005). Desde el punto de vista de sus relaciones con las plantas, los microorganismos del suelo se dividen en tres grandes grupos: a) saprofitos; b) simbiontes parasíticos; c) simbiontes, los cuales benefician el desarrollo y nutrición vegetal. Entre los beneficios para el sistema suelo-planta, pueden citarse los siguientes:

- Estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento.
- Incremento en el suministro y disponibilidad de nutrientes
- Mejora de la estructura del suelo como consecuencia de la contribución microbiana.

La fuente de dichos beneficios en general es atribuible a bacterias y hongos relacionados con la mineralización de sustratos orgánicos y procesos metabólicos y fisiológicos en la rizósfera (Ferrera *et al.*, 1995).

Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPM)

Dentro de este grupo podemos citar a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal conocidos hoy como PGPM. Se le definen así a los microorganismos que habitan en la rizósfera y que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. Los mecanismos por los cuales los PGPM ejercen efectos positivos sobre las plantas son numerosos. Entre ellos se pueden mencionar la fijación de N₂, la solubilización de fósforo (P), la capacidad de producir ácidos orgánicos y otros nutrientes. Además, la promoción del crecimiento de las plantas puede asociarse a la producción de fitohormonas y a la protección contra hongos patógenos (Kloepper *et al.*, 1989). Dentro de estos PGPM existe un sin número de géneros y especies que promueven el crecimiento en plantas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Microorganismos Promotores Crecimiento Plantas (Dobbelaere, 1999)

Género	Especies reconocidas	Mecanismos
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	Solubilización de P fosforo
<i>Bacillus</i> ,	<i>subtilis</i>	Promoción del crecimiento vegetal, biocontrol
<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	Producción de fitohormonas
<i>Paenobacillus</i>	<i>polymixa</i>	Producción de fitohormonas
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i> <i>aurantiaca</i> <i>putida</i>	Producción de fitohormonas, incremento en la absorción de nutrientes y producción de sideróforos
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i> <i>meliloti</i> , <i>phaseoli</i>	Producción de fitohormonas, incremento en la absorción de nutrientes, solubilización de P, producción de vitaminas y sideróforos
<i>Penicillium</i>	<i>bilai</i>	Solubilización de P fosforo
<i>Glomus</i>	<i>intraradicies</i>	Incrementos en la absorción de P fosforo

Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas

Entre los microorganismos benéficos para las plantas ya mencionados se encuentran un grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Estas favorecen el crecimiento de la plantas a través de diferentes mecanismos entre los que destaca la fijación biológica de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas como las auxinas, particularmente el ácido 3 indol acético, que promueve el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, permitiendo mejorar la absorción de agua y minerales del suelo y como consecuencia un mejor desarrollo de plantas. Estas bacterias colonizan las raíces de las plantas, y al hacerlo, promueven su crecimiento y reducen las enfermedades producidas por patógenos. La forma de actuar sobre la planta es directa o indirectamente (Caballero-Mellado, 2006).

Mecanismo Directo: En este mecanismo las rizobacterias sintetizan compuestos que producen un beneficio a la planta, cuyos compuestos pueden ser, hormonas del crecimiento y ciertos nutrientes como hierro o fósforo, provenientes del mundo natural (Cuadro 2).

Cuadro 2. Mecanismos de acción directa de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (Chanway, 1997).

Mecanismo	Efecto
Fijación de nitrógeno asociada a la raíz	Biomasa y contenido en nitrógeno
Producción de hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas)	Biomasa (parte aérea y radical); ramificación de raíces; floración
Inhibición de síntesis de etileno	Longitud radical

Aumento de la permeabilidad de raíz	Biomasa y captación de nutrientes
-------------------------------------	-----------------------------------

Mecanismo Indirecto: En este mecanismo Kloepper (1993) menciona que la bacteria libera algún metabolito, que afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta es decir las bacterias protegen a las plantas de microorganismos fitopatógenos. Estos métodos suponen una alternativa potencial porque es un método de control biológico (Antoun *et al.*, 2006).

Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)

Muchas plantas captan los nutrientes por medio de interacciones que establecen con los microorganismos que viven en la rizósfera, especialmente con aquellos que se han denominado simbioses. De estos simbioses de la raíz, los hongos denominados micorrizas arbusculares (HMA), son las asociaciones más comunes que se establecen con la mayoría de las especies de plantas, y probablemente son, en cantidad, las más importantes.

Esta simbiosis facilita la captación de fósforo, un nutriente limitante en la mayoría de los suelos. También influye directa o indirectamente en la absorción de otros iones minerales (N, K, Ca, Mg, Fe, Mn). Al igual que las rizobacterias promueven un mayor crecimiento de las plantas especialmente en aquellos suelos donde estos nutrientes son escasos. Además, juegan un papel importante en la protección contra patógenos de las raíces a través de diversos mecanismos de acción, entre los que se encuentran el micoparasitismo, la lisis enzimática, la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrientes, y la inducción de resistencia en la planta (Whipps, 2001).

Azcón (2000) describió la capacidad de los HMA para sintetizar fitohormonas tales como las auxinas, citoquininas y giberelinas “*in vitro*” y otras sustancias que

al igual que las rizobacterias, pueden alterar la morfología y fisiología de raíz. Como resultado de los compuestos sintetizados por HMA se produce una modificación en la composición de los exudados radicales.

Generalidades de *Trichoderma spp.*

Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbiotes de plantas, y otras son micoparásitas. Además, pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Harman *et al.*, 2004). Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, humedad y sus temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (Papavizas, 1985). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin, 1988).

Características Morfológicas

Este hongo crece y se ramifica en hifas que pueden oscilar entre 3 a 12 μm de diámetro, según las condiciones del sitio en donde se esté reproduciendo. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. La esporulación asexual ocurre en conidios, los cuales son unicelulares, de color verde, hialinos, poseen un solo núcleo haploide, son ovoides, generalmente tienen 3 a 6 μm de diámetro y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fialidas. Conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos. Las conidias son de distinto tamaño y forma, pueden ser subglobosas y ovoides. Comúnmente forman clamidosporas intercaladas o raramente terminales, las cuales pueden ser azules a verdes (Trabanino *et al.*, 2003; Lisboa, 2003).

Importancia en la Agricultura

Uno de los beneficios que más se ha reportado de *Trichoderma* para la agricultura es el antagonismo de microorganismos patógenos de las plantas. El antagonismo microbiano es una relación negativa; es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro. Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógenos, el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en la rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

Control Biológico

El género *Trichoderma* como agente de control biológico actúa contra los fitopatógenos en forma de antagonistas por parasitismo, competencia, antibiosis o por una combinación sinérgica de estos modos de acción (Ordentlich, 1992).

Micoparasitismo: Es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos, este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista (Correa *et al.*, 2007).

Competencia: La presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas y forestales), se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales (Infante *et al.*, 2009).

Antibiosis: Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibitorias son consideradas "antibióticos" como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina (Infante *et al.*, 2009).

***Trichoderma* como Estimulante del Crecimiento Vegetal**

Durante muchos años ha sido conocida la habilidad de los hongos para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial de su sistema radicular por la producción de hormonas vegetales como las auxinas (Sandoval *et al.*, 1992). *Trichoderma* es un género de hongos que tiene bastante importancia para la vida humana y la funcionalidad de un ecosistema, descomponedor de la materia orgánica, esencial en la recirculación de nutrientes en el medio ambiente.

Algunos miembros de este género tienen asociaciones simbióticas con plantas, leguminosas, gramíneas, solanáceas etc, mientras otros son utilizados como biocontroladores contra organismos patógenos como *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Druzhinina, 2005), también se conoce que algunas especies llevan a cabo la producción de metabolitos secundarios (MS) como antibióticos y promotores del crecimiento de plantas (Harman *et al.*, 2004).

Trichoderma spp. uno de los hongos que está presente en todo tipo de suelos agrícolas y ecosistemas, su versatilidad, adaptación y fácil manipulación ha permitido su uso por más de 70 años como antagonista para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos (Kubicek, 1993).

Agrios (1996) reporta que este hongo hiperparásito actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y micoparasitismo, además de producir sustancias promotoras del crecimiento de plantas. El uso de estas sustancias secretadas mediante biopreparados con especies de *Trichoderma* han demostrado estimular el crecimiento vegetal en el cultivo del tabaco donde se han conseguido plantas de mayor peso, altura y hojas de dimensiones más grandes (Sandoval *et al.*, 1992).

Weber *et al.*, (2000) Observo que *T. harzianum* y *T. viride* promovían el crecimiento de plantas ornamentales y que al mismo tiempo eran protegidas contra *Fusarium oxysporum*, patógeno ocasiona los marchitamientos vasculares

en sus huéspedes al mismo tiempo se encontró que una cepa de *Trichoderma* spp. contribuía al crecimiento, en profundidad de las raíces de maíz y de algunos pastos, haciendo que estos cultivos fueran más resistentes a la sequía.

Mientras tanto Bellone *et al.*, (1999) mencionan que en plántulas cultivadas en vermiculita a partir de semillas tratadas con *Trichoderma* spp. se observó un incremento en el porcentaje de germinación, el peso seco y la longitud de las plántulas respecto al de las no tratadas, lo que indica mayor absorción de nutrientes. Fernández (2006), también hace mención de utilización de productos a base de *Trichoderma* spp. y reporta que plantas tratadas con productos a base de *Trichoderma* incrementan la altura y la biomasa seca de plántulas de jitomate de hasta un 32% en comparación a plantas no tratadas.

Por otra parte Estévez *et al.*, (2001) demostró que cepas de *Trichoderma* spp. incrementan el crecimiento de las plantas y la capacidad de absorción de nitrógeno, fósforo y ciertos microelementos en la plantas inoculadas con biopreparados de este hongo. Bailey *et al.*, (1993) menciona que diversos aislados de *Trichoderma harzianum* estimulan el crecimiento vegetal hasta un 300%, debido a que son capaces de sintetizar determinados compuestos con carácter hormonal. Estos aislados producen además diferentes ácidos orgánicos que disminuyen el pH, solubilizando el fósforo del medio, así como otros nutrientes, mejorando el desarrollo de la planta.

Metabolitos Secundarios de *Trichoderma* spp.

El término “metabolito secundario” incluye un grupo heterogéneo de compuestos naturales de diferente composición química, posiblemente relacionados con funciones de sobrevivencia del organismo, tales como competencia contra otros micro y macroorganismos, simbiosis (Demain, 2000). *Trichoderma* produce gran cantidad de metabolitos los cuales son capaces de inhibir el crecimiento microbial (Sivasithamparam, 1998).

La producción de metabolitos secundarios por *Trichoderma spp.* depende de la cepa; de acuerdo a Sivasithamparam (1998), estos fueron clasificados en tres Categorías:

- Peptaiboles, los cuales son oligopéptidos lineales de 12 a 22 aminoácidos ricos en ácido α -aminoisobutírico como las trichorzianinas.
- Antibióticos polares como ácido heptelídico y ácido koníngico, gliotoxina, gliovirina, viridiol y viridina.
- Antibióticos volátiles por ejemplo 6-pentil- α -pirona (6PAP), 6-pent-1-eni1- α - pirona, koninginina A, cloroformo, 5-metil-2-etilfuran y muchos de los derivados de isocianidos, las cuales pertenecen a las pironas.

Gravel *et al.*, (2007) menciona que entre los MS de *Trichoderma spp.* se encuentra el ácido-3-indolacético (AIA) una hormona inductora del crecimiento vegetal.

Fito - Estimuladores Vegetales

Algunas bacterias y hongos producen sustancias que estimulan el crecimiento de planta. El mejor ejemplo entendido es la hormona auxina. Además, otras hormonas así como ciertos compuestos volátiles y el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) estimulan el crecimiento de las plantas.

La hormona promotora del crecimiento de la raíz auxina está presente en los exudados de la raíz y por lo general es sintetizada a partir del aminoácido exudado triptófano (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Cuadro 3. Microorganismos Fito - Estimuladores del Crecimiento Vegetal.

MICROORGANISMO	FITOESTIMULANTE	EFECTO
<i>Trichoderma spp</i>	ácido-3-indolacético (AIA)	Hormonas inductoras del crecimiento (Gravel <i>et al.</i> , 2007)
Hongos Micorrizas Arbusculares (HMA)	Auxinas: ácido-3-indolacético (AIA) Citoquininas	Hormonas inductoras del crecimiento (Gravel <i>et al.</i> , 2007) Procesos de división celular (Klee,1991)

Rizobacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas	Auxinas ácido-3-indolacético (AIA)	Hormona inductora del crecimiento (Glick <i>et al.</i> , 2007)
--	---------------------------------------	---

Fito - Hormonas

Las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas, que controlan diversos procesos del metabolismo vegetal. Estas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y además, que dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta (Srivastava, 2002).

Las hormonas regulan muchos procesos fisiológicos en plantas superiores, tales como el crecimiento y alargamiento celular, diferenciación y especialización de tejidos, y la inducción de síntesis de proteínas (Davis, 1995). De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas (AX), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas (Srivastava, 2002).

La aplicación práctica de estos compuestos es muy diversa y su utilización actual en la agricultura es frecuente y en continuo aumento. Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas que, entre otros efectos, influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de raíces. Fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indolacético (AIA), la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Srivastava, 2002). Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos,

formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular y de la dominancia apical (Davis, 1995).

Rayle (1992) señala que las auxinas se generan principalmente en las partes jóvenes de las plantas: ápices, frutos y hojas en desarrollo. Las auxinas estimulan la elongación del tallo y promueven la formación de raíces.

Wightman *et al.* (1980) estudiaron los factores hormonales como control de la iniciación y desarrollo de raíces laterales de frijol, encontraron que a determinada concentración de AIA, promueve la iniciación de raíces laterales.

Algunas auxinas, como el propio AIA, son sintetizadas por algunos microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*. La síntesis microbiológica de estas sustancias resulta de gran importancia ya que su aplicación permite el aumento de los rendimientos y la calidad de las cosechas en la agricultura (Patten *et al.*, 1996).

BIOZYME TF

Es un regulador de crecimiento de tipo complejo, obtenido de extracto de origen vegetal. Se aplica foliarmente y permite incrementar rendimiento y calidad en todo tipo de cultivo. Estimula diferentes procesos metabólicos y fisiológicos en la planta como división celular (GBM, 2008).

Composición porcentual Biozyme TF

Ingredientes activos

Micro elementos.....	1.86%
(Equivalente a 19.34 g/L)	
Zinc (Zn).....	0.37%
Fierro (Fe)	0.49%
Magnesio (Mg).....	0.14%
Boro (B).....	0.30%

Azufre (S).....	0.44%
Extractos de origen vegetal y fitohormonas biológicamente	
Activas.....	78.87%
Giberelinas	32.2 ppm
(Equivalente a 0.031 g/L)	
Ácido indol acético.....	32.3ppm
(Equivalente a 0.031 g/L)	
Zeatina.....	83.2 ppm
(Equivalente a 0.083 g/L)	
Ingredientes inertes:	
Diluyentes y acondicionadores.....	19.27%
Total.....	100%

TWEEN 20

COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Descripción del producto	Ester de un ácido graso saturado y sorbitán polioxi etilenado
INCI Denominación:	Polysorbate 20

INGREDIENTES PELIGROSOS

Nombre químico	Número EINECS %	SímboloFrases-R
No contiene ingredientes peligrosos (2001/58/CE).		

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Microorganismos Biológicos Evaluados

Se evaluaron 5 cepas de *Trichoderma* spp. y un producto comercial Biozime TF. Las cepas de *Trichoderma* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad, fueron resembrados para su conservación en papa dextrosa agar, con las siguientes claves.

- *Ta = Trichoderma asperellum*
- *Ty = Trichoderma yunnanense*
- *Tl = Trichoderma lignorum*
- *Thz = Trichoderma harzianum*
- *Tv = Trichoderma viride*

Incremento de Microorganismo

Los microorganismos bajo estudio fueron incrementados en cajas petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Se depositó un explante de cada una de las cepas de *Trichoderma spp.* en el medio de cultivo incubándolas por 4 días a 28 °C. Posteriormente se realizaron resiembras en PDA con el fin de tener las cepas activas para los siguientes ensayos.

Preparación de caldo de papa sacarosa (CPS)

Para la preparación del medio de cultivo donde se desarrollaron las cepas de *Trichoderma spp.* se utilizó caldo de papa, licor hidrolizado de maíz, extracto de malta, azúcar, cloruro de calcio en las siguientes concentraciones:

- 140 gr de papa/ 700 ml de agua
- 1 gr sacarosa/ 700 ml de agua
- 1 ml licor hidrolizado de maíz / 700 ml de agua
- 0.5 gr extracto de malta/ 700 ml de agua
- 0.5 gr de ClCa/ 700 ml de agua

Se prepararon un total de 5 matraces con 700 ml de caldo de papa, posteriormente se agregaron 10.5 gr de sacarosa, 0.5 gr de extracto de malta, 1 ml de licor hidrolizado de maíz y 0.5 gr de Cloruro de calcio. La mezcla se esterilizó, obteniendo como resultado el medio de cultivo para crecimiento y desarrollo de las cepas bajo estudio.

Siembra de Microorganismo

Una vez obtenido el medio nutritivo se sembró en cada uno de los matraces y por separado un explante de cada una de las cepas de *Trichoderma*, todo esto en condiciones asépticas para evitar la contaminación con otros microorganismos.

Posteriormente se colocaron (incubaron) en una agitadora a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) durante 72 h a 130 rpm.

Obtención del extracto metabólico

A las 24, 48 y 72 horas de incubación se obtuvieron 50 ml del medio en crecimiento de cepas de *Trichoderma* (bajo condiciones asépticas) para posteriormente usarlas en las determinaciones de Ácido 3 Indol acético y como tratamientos por aspersión a semillas de melón.

Determinación de Acido 3 Indol Acético

Para la detección cualitativa del Ácido 3 Indol acético, se seleccionaron las muestras extraídas a las 72 h de incubación de las cepas de *Trichoderma*, se utilizó la técnica colorimétrica de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995), donde se colocaron 30 ml de las muestras en tubos Falcon de 50 ml, los cuales fueron centrifugados durante 15 minutos a 4000 rpm. Posteriormente en tubos de ensaye de 10 ml se colocó 1 ml de las muestras centrifugadas, agregando el reactivo de Salkowski (7.5 ml HClO_4 , 0.056 g FeCl_3 anhidro en 12.5 ml de H_2O), en relación 1:1. Para el testigo positivo se preparó una muestra de Ácido Indol acético comercial a una concentración de 20 $\mu\text{g}/1$ ml de agua. Al aplicar el reactivo de Salkowski, las muestras se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos para esperar su reacción.

Aplicación de Extractos Obtenidos Durante los Tres Tiempos de Incubación.

Para cada uno de los tratamientos se tomaron 10 mL de las muestras que se extrajeron a las 24, 48 y 72 de horas de incubación de cada una de las cepas, colocándolas en matraces de 50 mL incorporando una gota de tween 20. Posteriormente se seleccionaron 10 semillas híbridas de melón a las cuales se les agregaron 50 μL de los concentrados por separado, dejándolas reposar durante 20

minutos, con la finalidad de que la semilla absorbiera el tratamiento. Una vez transcurrido el tiempo se colocaron las semillas de melón en tacos de germinación y se trasladaron a la cámara bioclimática donde estuvieron por 6 días a una temperatura aproximada de 28 °C.

Biozyme TF

En el caso del testigo comercial Biozyme TF, se utilizaron 1 ml de Biozyme por cada 100 mL de agua. Para el testigo absoluto, solo se trató con agua bajo las mismas condiciones que los demás tratamientos.

Parámetros de Evaluación

Los parámetros evaluados en los ensayos fueron: longitud de raíz principal (Lr) y número de raíces secundarias (Rs). Estos parámetros se midieron a los 6 días de iniciado la germinación en la cámara bioclimática.

La determinación cualitativa del Ácido Indol Acético en las cepas de *Trichoderma* se efectuó mediante la técnica colorimétrica de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995).

Tratamientos

Los tratamientos fueron siete, con diez repeticiones, su distribución fue la siguiente forma:

- *Trichoderma asperellum*.....T1
- *Trichoderma yunnanense*.....T2
- *Trichoderma lignorum*.....T3
- *Trichoderma harzianum*.....T4
- *Trichoderma viride*.....T5

- AGUAT6
- Biozyme TF.....T7

Diseño Experimental

Para determinar la influencia de los extractos de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre el desarrollo de raíz principal y raíces secundarias, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 7 tratamientos (cepas de *Trichoderma*, Agua y Biozyme) y diez repeticiones con una semilla por repetición. Se realizó un análisis de varianza con la prueba de comparación de medias por Tukey al 0.05% de significancia. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa SAS versión 8 (Online Doc, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de Extractos de *Trichoderma*

La propagación y el crecimiento de las diversas cepas de *Trichoderma* en el medio caldo papa sacarosa (CPS), se dio de forma rápida y abundante, en las primeras 24 horas de agitación, observándose un crecimiento micelial abundante en cada matraz (Figura 1).

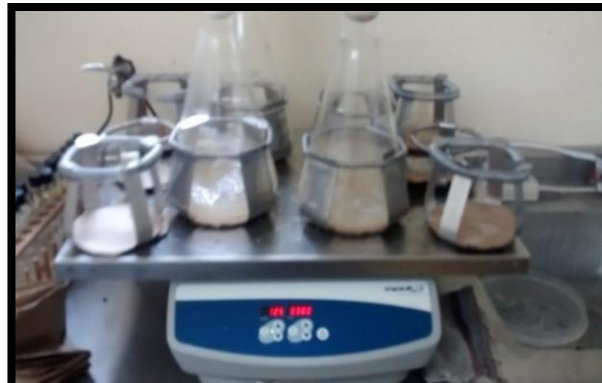


Figura 1. Crecimiento de *Trichoderma* en el medio, Caldo Papa Sacarosa a las 24 Horas de incubación.

La gitacion a 48 h de las cepas de *Trichoderma* en el medio caldo papa sacarosa se dio de manera más abundante, observando un aceite de color amarillo en los matraces (Figura 2).



Figura 2. Crecimiento de *Trichoderma* en el medio, Caldo Papa Sacarosa de las cepas de *Trichoderma*, a las 48 h de incubación giratoria.

medio CPS, se mostró un cubrimiento total de micelio sobre el medio, por lo que se procedió a vaciar en frascos esterilizados, para ser refrigerados y esperar su sedimentación (Figura 3).



Figura 3. Crecimiento de *Trichoderma* en el medio, Caldo Papa Sacarosa, a las 72 horas de incubación giratoria.

En el proceso de sedimentación del micelio de las diferentes cepas de *Trichoderma* se obtuvo un comportamiento no uniforme, en algunas cepas el concentrado fue más turbio como el caso de los tratamientos *Ty*, *Tv*, *Thz*, mientras tanto los tratamientos *Ta* y *Tl* mostraron un exudado transparente y cristalino (Figura 4).



Figura 4. Sedimentación del micelio de las cepas de *Trichoderma* incubados durante 48 h en medio caldo papa sacarosa.

Detección cualitativa de Acido 3 Indol Acetico (AIA)

La producción del compuesto indól por el género *Trichoderma*, puede ser un factor muy importante en la asociación con plantas superiores, además de ser un hongo antagonista y con beneficios para diferentes cultivos, puede llegar influir en el crecimiento del sistema radicular y como consecuencia obtener un rendimiento rentable con la aplicación de sus extractos de crecimiento.

Para la determinación de Ácido 3 Indol Acetico se realizó una prueba con el reactivo de Salkowski con AIA comercial a una concentración de 20 $\mu\text{g}/1 \text{ ml H}_2\text{O}$, para obtener un testigo positivo y hacer la comparación con las muestras de las cepas de *Trichoderma*, en donde se observó que al aplicar el reactivo a la muestra comercial en proporción 1:1, la muestra se teñió de un color rosa intenso (Figura 5)



Figura 5. Reacción de AIA comercial en la aplicación del reactivo de salkowski (7.5 ml HClO_4 , 0.056 g FeCl_3 anhidro en 12.5 ml de H_2O), en relación 1:1.

Al realizar la técnica colorimétrica de Salkowski en las cepas de *Trichoderma* se utilizó el mismo reactivo en la misma concentración y en la misma proporción. Al esperar 30 min de la aplicación del reactivo se observó una coloración muy débil en las muestras de la cepas *T. asperellum*, *T. yunnanense*, *T. harzianum*.

De manera general, las cepas de *Trichoderma* mostraron una tinción de color rosa notable en comparación con el testigo comercial, esto nos indica la presencia del Ácido 3 Indol Acético durante la producción de metabolitos secretados por las cepas de *Trichoderma* (Figura 6).

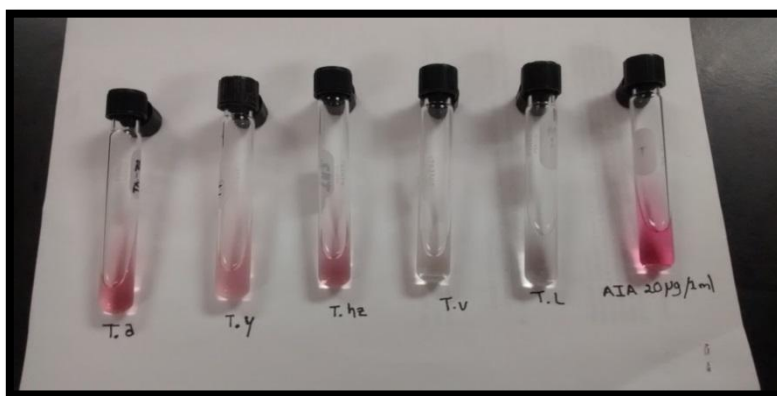


Figura 6. Tinción del reactivo de Salkowski a las muestras de las cepas de *Trichoderma* en relación 1:1.

Germinación de Semillas de Melón.

Análisis de Raíz Primaria

La producción de metabolitos por las cepas de *Trichoderma* estimula el crecimiento radical de semillas de melón y esto depende de cada especie, en acuerdo con Gaspar *et al.*, (1986) esto puede deberse a la producción del Ácido 3 Indol Acético (AIA), una auxina que estimula el crecimiento de la raíz.

En la aplicación de los extractos en los tres tiempos diferentes de incubación, podemos observar que el análisis estadístico de las 24 horas nos arroja 3 grupos

estadísticamente iguales, siendo los tratamientos 1, 2, y 3 lo mejores estimulantes de la raíz principal y solo los tratamientos 5 y 6 los que menos estímulo obtuvieron (Cuadro 4).

El análisis de 48 h difirió en cuanto el estímulo con una diferencia de hasta un 10% en la longitud del primer bioensayo, pero nuevamente podemos observar a *T. asperellum* y *T. yunnanense* como los tratamientos que mejor estimulan el crecimiento de la raíz primaria (Cuadro 4).

En el análisis de incubación a las 72 h podemos observar que nuevamente el tratamiento uno es el mejor estimulante en comparación con los tratamientos 3 y 6 que son los que menos indujeron al crecimiento de la raíz principal, sin embargo todos los tratamientos se encontraron con valores mayores que el testigo absoluto (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de longitud raíz primaria de semillas de melón, tratadas con extracto de diversas cepas de *Trichoderma*, en tres tiempos diferentes de incubación.

TRATAMIENTO	Incubación 24 h	Incubación 48 h	Incubación 72 h	Análisis media 3 tiempos
T1= Ta	7.100 A	6.000 A	9.400 A	7.50 A
T2= Ty	7.320 A	6.040 A	6.460 ABC	6.6066 AB
T3= Tl	7.030 A	2.810 AB	4.250 BC	4.6966 ABC
T4= Thz	3.770 AB	3.530 AB	7.400 AB	4.9000 ABC
T5= Tv	3.150 B	3.530 AB	4.800 BC	3.8266 BC
T6= H2O	2.400 B	2.200 B	2.450 C	2.3500 C
T7= BIOZYME	5.650 A	5.500 AB	7.400 AB	6.1833 AB

*Medias del crecimiento de raíz primaria en cm y con las mismas letras son estadísticamente similares

El análisis estadístico de los tres bioensayos de aplicación de los extractos de las cepas de *Trichoderma* muestra a *T. asperellum*, *T. yunnanense* y Biozyme como los mejores estimuladores del crecimiento de raíz primaria de melón,

aunque estadísticamente son iguales podemos observar que *T. asperellum* es mejor en el estímulo, puesto a que solo se usan los metabolitos secretados por el hongo en comparación a Biozyme que es un producto comercial compuesto (Cuadro 4).

La utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal puede ser una gran alternativa para la producción agrícola como lo menciona Gambaudo (2001) al utilizar microorganismos para incrementar los rendimientos en el cultivo de Colza al obtener rendimientos muy similares comparados con el uso de fertilizantes químicos, a treves del estímulo vegetal por medio de promotores del crecimiento vegetal.

El estímulo de la raíz primaria en este experimento es notable ya que todas las cepas de *Trichoderma* están por encima de testigo absoluto tratado únicamente con agua, esto concuerda con lo reportado por Sandoval 1992, donde menciona al género *Trichoderma* como estimulante del crecimiento vegetal.

Por otra parte en el experimento de estímulo de raíz primaria podemos observar que las cepas *T. harzirun* y *T. viride* son las que generan menor estímulo. Weber (2000), las menciona como estimulantes en planta ornamentales pero al observar el experimento podemos concluir que con la utilización de diferentes especies se pueden obtener mejores resultados en cuanto a los estímulos generados.

Las cepas de *Trichoderma* evaluadas inducen de cierta manera el crecimiento de las raíz primaria, en comparación al testigo comercial que se ve superado por dos cepas *T. asperellum*, *T. yunannense* y las demás por encima del testigo absoluto tratado únicamente con agua. Este efecto se debe a que las cepas de *Trichoderma* producen la auxina Acido 3 Indol Acético en pequeñas cantidades que estimulan el crecimiento de raíces primarias de semilla de melón (Figura 7)

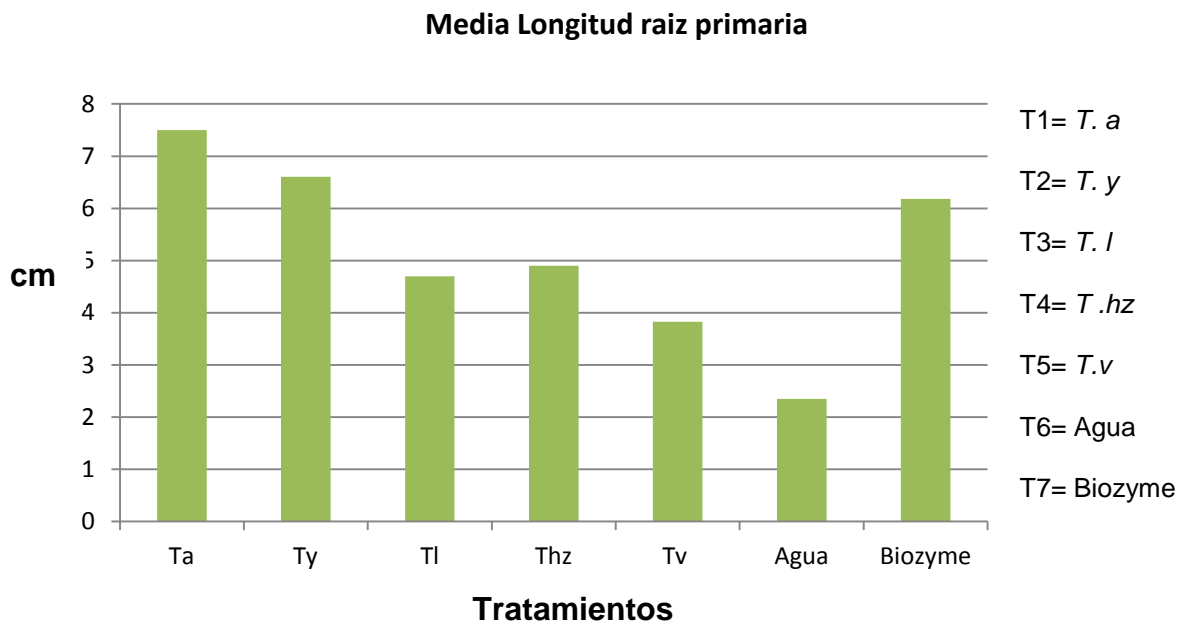


Figura 7. Media del estímulo de crecimiento de raíz primaria de semillas de melón, tratados con extractos de *Trichoderma* en tres tiempos de incubación.

Análisis Raíces Secundarias

La producción de raíces secundarias en estos análisis nuevamente se ve influenciada en las cepas de *Trichoderma*, con valores altos en algunas cepas, para el caso del ensayo a las 24 h de incubación el mejor estimulante en raíces secundarias es para el tratamiento 3 (*T. lignurum*) el cual supero al testigo comercial, siendo los tratamientos 5 y 6 el de menor estímulo en este parámetro.

El análisis a las 48 h de incubación muestra al tratamiento 1 como el mejor estimulante de raíces secundarias. En el ensayo de 72 h de incubación podemos

observar que la producción de raíces secundarias es un poco más elevado que en los demás ensayos para el caso de la mayoría de las cepas y nuevamente tenemos a *Trichoderma asperellum* como el mejor estimulante en este parámetro con una notable producción de raíces secundarias en comparación con lo demás tratamientos siendo *T. lignurum* y el testigo absoluto los que menos estimularon en este ensayo (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis raíces secundarias de semillas de melón, tratadas con extracto de diversas cepas de *Trichoderma*, en los tres tiempos diferentes de

TRATAMIENTO	Incubación 24 h	Incubación 48 h	incubación 72 h	Análisis media 3 tiempos.
T1= TA	25.100 A	23.600 A	28.400 A	25.700 A
T2= TY	25.800 A	20.000 AB	21.900 AB	22.560 AB
T3= TL	27.300 A	7.800 B	15.000 AB	16.700 ABC
T4= THZ	11.800 AB	9.900 AB	21.100 AB	14.266 ABC
T5= TV	8.700 B	12.600 AB	16.700 AB	12.666 BC
T6= H2O	7.400 B	6.200 B	8.000 B	7.2000 C
T7= BIOZYME	18.000 AB	18.500 AB	20.500 AB	19.000 ABC

*Medias del crecimiento de raíces secundarias en cm y con las mismas letras son estadísticamente similares

El análisis estadístico de los tres bioensayos de aplicación de los extractos de las cepas de *Trichoderma* muestra a *T. yunnanense*, *T. asperellum* y Biozyme como los mejores estimuladores del crecimiento de raíces secundarias de semillas de melón (Cuadro 5).

En general podemos definir que el comportamiento en cada tiempo de incubación es inestable pero siempre por encima del testigo absoluto y solo 2 cepas de *Trichoderma* por encima del testigo comercial (Biozyme TF), esto demuestra que existe una influencia importante en la producción de raíces secundarias en las semillas de melón al aplicar los extractos de *Trichoderma* (Figura 8).

La presencia del Ácido 3 indolacético en algunas cepas de *Trichoderma* puede ser un factor en estímulo de las raíces secundaria ya que Wightman (1980), menciona que la iniciación y desarrollo de raíces laterales en el cultivo de frijol se ve influenciado por la presencia del AIA.

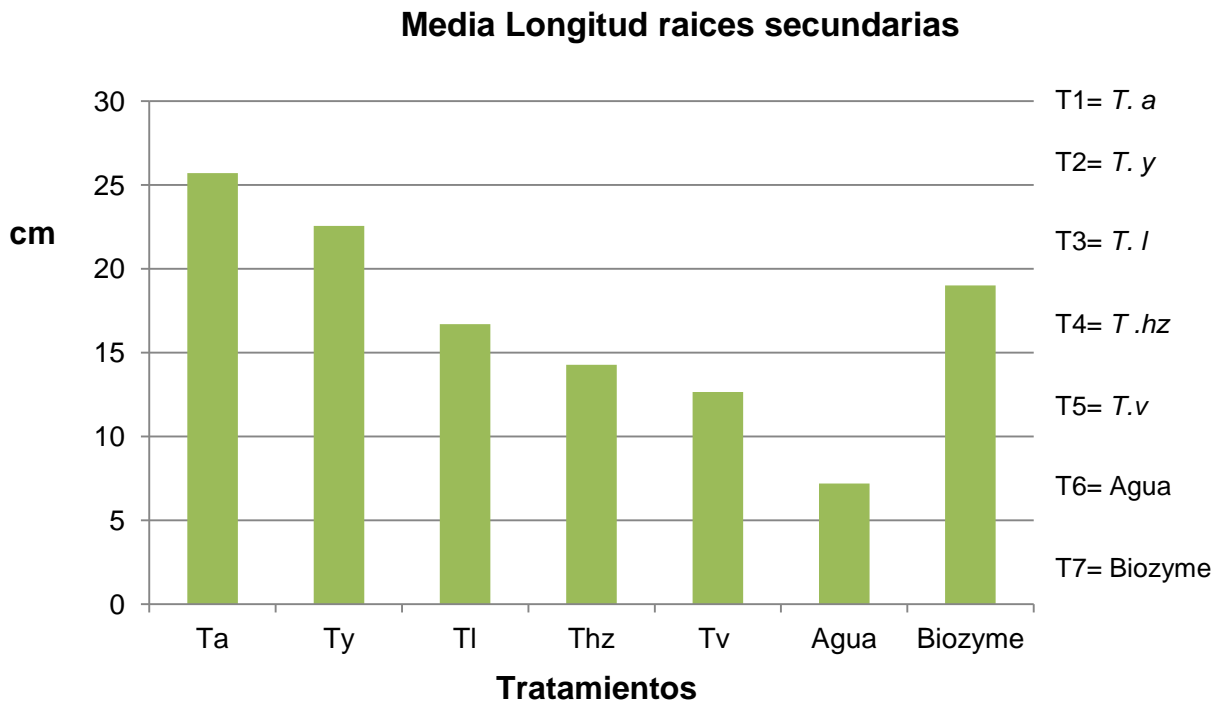


Figura 8. Media del estímulo de crecimiento de raíces secundarias de semillas de melón, tratados con extractos de *Trichoderma* en tres tiempos de incubación

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló esta investigación podemos concluir lo siguiente:

- Las especies evaluadas de *Trichoderma* durante su desarrollo producen metabolitos que estimulan el crecimiento radical de los cultivos en este caso del cultivo de melón.
- La estimulación del crecimiento de la raíz primaria es positiva en todas la especies evaluadas de *Trichoderma*, no todas con el mismo estímulo, pero si por encima del testigo absoluto y solo una superando al testigo comercial.
- La estimulación del crecimiento de la raíces secundarias es positiva en todas la especies evaluadas de *Trichoderma*, no todas con el mismo estímulo, pero si por encima del testigo absoluto y solo dos especies superando al testigo comercial.
- Las especies de *Trochoderma* logran la producción de la Auxina- Ácido 3 Indol Acetico en pequeñas cantidades que estimulan el crecimiento radical de semilla de melón.

- La cepa de *Trichoderma asperellum* es mejor estimuladora en los dos parámetros medidos en este experimento, superando al testigo comercial Biozyme TF.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. 5ta reimpression de la 2 edicion. Editorial Limusa. México 838 pp.
- Aguirre, M. J, Irizar, M. B, Durán, P. A, Grajeda, C. A, Peña, R. M, Loredó, O. C y Gutierrez, B. A. 2009. Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Inifap; 5: 1-86.
- Antoun, H.C, Presvost, D, K. 2006., *et al.*, Ecology of Plant growth promoting rhizobacteria. In PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer. Netherlands. pp 1-38
- Arellano, S. J. 1993. Efecto del acolchado en el desarrollo y producción de melón (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones de riego por goteo y gravedad. Tesis de maestría. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.
- Azcón, R. L, 2000. "Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola", en Alarcón, A. y R. Ferrera (eds). Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Mundi Prensa, México, 15 p.
- Bailey, A. M, Muñoz, S. C, Martinez, H. P., Manríquez, E.M. 1993. Detection of additional gene products Induced by the interation between *Phytophthora capsici* and its host, *Capsicum annum*, and the identification of an eliciting gene. Revista Mexicana de Fitopatología. 19: 23-31.
- Barea, J. M, Olivares, J. N, 1998. Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: Jiménez Díaz, L. R. y R. Lamo de Espinosa (ed). Agricultura Sostenible. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 173-193.
- Bellone, C. H., Carrizo, de B. S. y Guerrero, O. S. 1999. Inoculaciones con *Azospirillum brasiliense* incrementan el peso seco y la micorrización en frutilla. Actas II Reunión Científico Técnica Biología del Suelo Fijación de Nitrógeno. pp. 225-257

- Caballero C, y Mellado, J. 2004. Uso de *Azospirillum* como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui M. A., García de Salamone, I. E., Miyazaki S. S. (eds.). Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial FAUBA. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 45-49.
- Caballero C, Mellano J. 2006. Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con plantas. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 48 (2): 154-161.
- Chanway C. P. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. Forest Science. 43 (1): 99-112.
- Compant S, Duffy D, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology 71:4951-4959.
- Correa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Minaré B. L., Pàdua, R. R., Gómez, D. 2007. Cepas de *Trichoderma spp.* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. SACC. FITOSANIDAD vol. 11, no. 1.
- Cupull, S. R., Ortiz, A. A., Sánchez, E. C. Efecto de *Trichoderma viride* Rifai en el desarrollo de los injertos *hipocotiledonares* de café. Centro Agrícola 2010; 37(4):37-40.
- Davies, P.J. 1995. The plant hormone: Their nature, occurrence, and functions. In: Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.1.
- De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía. Marín N. L. 515 p.
- Demain, A. L., Fang, A. L. 2000. The natural functions of secondary metabolites. Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology 69: 1-39.

- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande, A. and Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 212: 155–164.
- Druzhinina I, Kubicek C. P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J Zhejiang*. 6B, 100-112.
- Estevez, De J. C., Perich, J. A., Graham, P. H. 2001. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minesota. *Field crops research*.74:107-115.
- Fernández, H. E., Acosta, R. M., Ponce. G, F., y Manuel, P. V. 2006. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. Y *Rhizoctonia solani* Kuhn en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* mil). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 35-42.
- Ferrera, C. R., Perez, M. J. 1995. Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias agrícolas, Montecillo, México. pp 234.
- Franhenberger, J. W, Arshad. M. J. Phytohormones in soils. Microbial production and function. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Gambaudo. S., Corti, S., Fontanetto, H. y Cencig, G., 2011. Microorganismos promotores del crecimiento del cultivo de Colza: Publicación Miscelánea N° 119
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant*
- GBM, 2008. Regulador de crecimiento vegetal, Extracto de Plantas mas Micronutrientes. Arysta LifeScience.

- Glickmann E. Dessaux Y., Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 793-796.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem.* 2007; 39:1968- 1977.
- González. M. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23(1): 29-37.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43-56.
- Johansson, F., Paul, L., Finlay, R. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 1-13.
- Infante, D., Martínez, B., Gonzales, N. y Reyes, 2009. *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi, *Revista de Protección Vegetal.* 24:14-21.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-43
- Kloepper, J. W., Schippers, B., Bakker, P. 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*, 82: 726-727.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., y Kubicek-Pranz, E.M. 1993. The *Trichoderma cellulase* regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15, 90-99.

- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Naiman, A. D., Latronico, A. E., García, S. E. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology.* 45:44-51.
- Ordentlich, A., Weisman, Z., Gottlieb, H. E., Cojocar, M., Chet I. 1992. Inhibitory furanone produce by the biocontrol *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry.* 32, 485-486.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma and Gliocladium*: biology and potential for biological control. *Annu Rev Phytopathol.* 19:332-349.
- Patten, C., Glick B, R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology.* 42: 207-220.
- Pérez, T. E., Milanés, V. P., Rodríguez, G. N., García, R. G., Torres, Á. O., Martínez, E. H., Viamontes, V. R., Tamayo, E. Y., Pérez, C. E. y Prada, F. J. 2009. Acción de *Trichoderma harzianum* Rifai en el incremento de biomasa en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. prod. anim;* 21(2): 127-130.
- Pulido, L. E., Medina, N., Cabrera, A. 2003. Biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.). i. crecimiento vegetativo; 24(1): 15-24.
- Reyle, D. L. y Cleland, R.E. 1992. The acid growth theory of auxin- induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology,* 99: 1271- 1274.
- Sandoval, T., 1992. Efitividad de biopreparados de *Trichoderma app.*, en el control de fitopatogenos de suelo. *Boletin técnico CVI INISAV,* 2,2 10-22.
- Srivastava, L. M. 2002. Crecimiento y desarrollo de las Plantas: hormonas y ambiente natural Amsterdam: Academic Press. Pp. 140.

- Sivasithamparam, G.E., Ghisalberti, E.L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: *Trichoderma* and *Gliocladium* (Vol. 1). C.P. Kubicek and G.E. Harman (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp. 139-191.
- Trabanino, R., Kuniyoshi, C., Michel, M. 2003. Manual de agentes de control biológico. Centro de control biológico para Centroamérica. Honduras. Revista de Horticultura Internacional Biológico. p. 51- 54.
- Weber, H., Damond, M., Farmer, E. E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 707- 719.
- Whipps, J. M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Widden, P. y Scattolin, V. 1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80, 795-803.
- Wightman, F., Elnora, A., y Kenneth, V. 1980. Hormonal Factors controlling the initiation and development of lateral roots. *Plant Physiology*, 149: 304- 314.
- Zhang, G., Dong, H., Xu, Z., Zhao, D., Zhang, C. 2005. Microbial Diversity in Ultra-High-Pressure Rocks and Fluids from the Chinese Continental Scientific Drilling Project in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3213 - 3227.

APÉNDICE

Cuadro 1. Crecimiento de la raíz primaria expresado en centímetros, de los siete tratamientos inoculados a las 24 h de obtener el extracto de las cepas de *trichoderma spp.*

Tratamiento	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	9	10	8	6	5	8	4	10	5	6
2	8	8.8	8	7	5.5	8	8	7	7.9	5
3	0.5	8	10	9	9.9	10	4	5	5.6	8
4	.8.5	1	7.2	0	3	1	3	6	8	0
5	10	4	3	3	0.5	0	0	0	5	6
6	4	5	1	3	1	1	6	1	8	11
7	8	7	5	1	7	6	5	0.5	9	8

Cuadro 2. Análisis de varianza de la medición de raíz primaria de las cinco cepas de *Trichoderma* y los dos testigos, inoculados al 24 horas de obtener el extracto.

Fv	GL	SC	CM	F Valu	Pr > F
REPETICIONES	9	73.3765714	8.1529524	1.20	0.3120
TRATAMIENTO	6	257.4314286	42.9052381	6.34	<.0001
ERROR	54	365.7114286	6.7724339		
TOTAL	69	696.5194286			

Cuadro 3. Crecimiento de la raíz primaria expresado en centímetros, de los siete tratamientos inoculados a las 48 h de obtener el extracto de las cepas de *trichoderma spp.*

Tratamiento	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5	3.5	8.5	6.2	2	7.7	6.6	6.8	6.7	7
2	2	3	6	7	5.5	8	8	4.5	7.9	8.5
3	2	2	0.5	0	0	0	3	6	6.6	8
4	6.5	5.5	7	2.3	3	7	4	0	0	0
5	7	4.5	5.3	0.5	1	2	6	4	5	0
6	4	4	1	3	1	1	5	1	8	9
7	7	2	7	7	4	8	4	9	0	7

Cuadro 4. Análisis de varianza de la medición de raíz primaria de las cinco cepas de *Trichoderma* y los dos testigos, inoculados al 48 h de obtener el extracto.

Fv	GL	SC	CM	F Valu	Pr > F
REPETICIONES	9	44.4498571	4.9388730	0.79	0.6273
TRATAMIENTO	6	151.3920000	25.2320000	4.03	0.0021
ERROR	54	337.9251429	6.2578730		
TOTAL	69	533.7670000			

Cuadro 5. Crecimiento de la raíz primaria expresado en centímetros, de los siete tratamientos inoculados a las 72 h de obtener el extracto de las cepas de *Trichoderma spp.*

Tratamiento	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	10	11	9	10	10	9	8	8	8	11
2	3	11	8.3	4	5	8	9.3	11	5	0
3	6	7	6.5	10	2	6	2	3	0	0
4	11	9	0	9	5	5	11	7	10	7
5	3	10	3	10	7	0	0	7	8	0
6	4	5	0.5	5	1	0	6	0	8	14
7	0	11	9	10	10	0	5	12	6	11

Cuadro 6. Análisis de varianza de la medición de raíz primaria de las cinco cepas de *Trichoderma* y los dos testigos, inoculados a las 72 h de obtener el extracto.

Fv	GL	SC	CM	F Valu	Pr > F
REPETICIONES	9	162.9034286	18.1003810	1.81	0.0868
TRATAMIENTO	6	327.9294286	54.6549048	5.48	0.0002
ERROR	54	538.810571	9.977974		
TOTAL	69	1029.643429			

Cuadro 7. Numero de las raíces secundarias de los siete tratamientos inoculados a las 24 h de obtener el extracto de las cepas de *trichoderma spp.*

Tratamiento	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	39	38	44	16	11	16	14	41	13	19
2	26	32	20	28	23	29	34	12	30	24
3	0	31	43	38	34	39	18	22	17	31
4	28	1	28	0	1	1	2	25	32	0
5	34	8	3	3	0	0	0	0	18	21
6	14	15	1	16	1	1	6	1	8	11
7	29	28	4	1	30	24	19	0	26	19

Cuadro 8. Análisis de varianza de la medición de raíces secundarias de las cinco cepas de *Trichoderma* y los dos testigos, inoculados a las 24 h de obtener el extracto.

Fv	GL	SC	CM	F Valu	Pr > F
REPETICIONES	9	923.557143	102.617460	0.76	0.6571
TRATAMIENTO	6	4345.142857	724.190476	5.33	0.0002
ERROR	54	7335.14286	135.83598		
TOTAL	69	12603.84286			

Cuadro 9. Numero de las raíces secundarias de los siete tratamientos inoculados a las 48 h de obtener el extracto de las cepas de *trichoderma spp.*

Tratamiento	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	18	12	33	26	1	27	32	30	25	32
2	1	2	20	23	20	29	34	10	30	31
3	1	1	0	0	0	0	1	28	19	28
4	16	14	24	1	4	26	14	0	0	0
5	32	15	23	0	1	3	25	8	19	0
6	11	9	1	16	1	1	5	1	8	9
7	21	4	26	29	23	12	5	36	0	29

Cuadro 10. Análisis de varianza de la medición de raíces secundarias de las cinco cepas de *Trichoderma* y los dos testigos, inoculados a las 48 h de obtener el extracto.

Fv	GL	SC	CM	F Valu	Pr > F
REPETICIONES	9	2045.200000	227.244444	1.70	0.1122
TRATAMIENTO	6	2454.400000	409.066667	3.06	0.0120
ERROR	54	7227.600000	133.84444		
TOTAL	69	11727.20000			

Cuadro 11. Numero de las raíces secundarias de los siete tratamientos inoculados a las 72 h de obtener el extracto de las cepas de *trichoderma spp.*

Tratamiento	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	29	34	28	23	25	31	26	27	29	32
2	6	38	44	14	11	16	36	41	13	0
3	21	30	28	31	10	28	1	1	0	0
4	32	29	0	24	12	18	29	23	30	14
5	1	39	8	37	24	0	2	0	3	4
6	14	15	0	22	1	0	6	0	8	14
7	0	34	30	21	28	0	18	28	18	28

Cuadro 12. Análisis de varianza de la medición de raíces secundarias de las cinco cepas de *Trichoderma* y los dos testigos, inoculados a las 72 h de obtener el extracto.

Fv	GL	SC	CM	F Valu	Pr > F
REPETICIONES	9	362.694429	40.299381	0.75	0.6625
TRATAMIENTO	6	2849.473429	474.912238	8.83	<.0001
ERROR	54	2904.326571	53.783825		
TOTAL	69	6116.494429			