



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**INTERACCIÓN DE *Trichoderma* Y *Glomus intraradices*
EN PLÁNTULAS DE MAÍZ INOCULADAS CON
HONGOS FITOPATÓGENOS**

VERÓNICA AZUCENA IBARRA MEDINA

TESIS

PRESENTADA CONMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2015

La presente tesis, titulada: INTERACCIÓN DE *Trichoderma* Y *Glomus intraradices* EN PLÁNTULAS DE MAÍZ INOCULADAS CON HONGOS FITOPATÓGENOS, realizada por la alumna Verónica Azucena Ibarra Medina, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR:



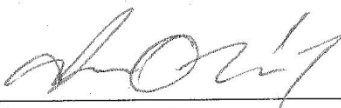
DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR:



DR. JOHN LARSEN

ASESOR:



DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR:



DR. JUAN JOSÉ PEÑA CABRIALES

Montecillo, Texcoco, México, Enero de 2015

INTERACCIÓN DE *Trichoderma* Y *Glomus intraradices* EN PLÁNTULAS DE MAÍZ INOCULADAS CON HONGOS FITOPATÓGENOS

Verónica Azucena Ibarra Medina (Dra.)
Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Este estudio propuso a un hongo micorrízico arbuscular y *Trichoderma* como alternativas naturales para favorecer el crecimiento de plantas de maíz y para el control biológico de *Fusarium verticillioides*. Primero, se realizó la selección y caracterización de la actividad antagónica de cuatro aislamientos de *Trichoderma* (*T. viride*1, *T. viride* 2, *T. virens* y *T. harzianum*) contra cinco patógenos del maíz (*Phytium*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*), y se evaluó su capacidad para producir índoles totales como posible mecanismo promotor del crecimiento vegetal. La mayoría de las confrontaciones de *Trichoderma* mostró inhibición hacia *Fusarium* por posible antibiosis. Todas las cepas de *Trichoderma* produjeron índoles, pero *T. viride* 2 produjo mayor cantidad. Segundo, se seleccionó la compatibilidad de cepas de *Trichoderma* con *Glomus intraradices*. Ambos microorganismos pueden ser inoculados conjuntamente, pero algunas combinaciones pueden beneficiar directamente a las plantas de maíz en corto plazo. Tercero, se evaluó la interacción entre *G. intraradices* y *T. harzianum* en el control de *F. verticillioides*, inoculados en plantas de maíz, así como su efecto en el crecimiento y nutrición de las plantas. La presencia de *G. intraradices* en la rizosfera estimuló la proliferación de *F. verticillioides*, sin presentar signos o síntomas de enfermedad en raíz, tallo o follaje, pero produjo mayor acumulación de materia seca. La interacción *Trichoderma* + *G. intraradices* produjo plantas más vigorosas con mayor volumen radical, materia seca total, y contenido foliar de fósforo. La interacción de *G. intraradices* y *T. harzianum* favoreció algunos parámetros de crecimiento de las plantas de maíz, pero en ausencia de *F. verticillioides*.

Palabras clave: Maíz, *Trichoderma*, *Glomus intraradices*, *Fusarium verticillioides*, índoles, biocontrol.

***Trichoderma* AND *Glomus intraradices* INTERACTION ON MAIZE SEEDLINGS
INOCULATED WITH FUNGAL PHYTOPATHOGENS**

Verónica Azucena Ibarra Medina (Dr.)

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

This study proposed an arbuscular mycorrhizal fungus and *Trichoderma* as natural alternative to favor the growth of maize plants and the biocontrol of *Fusarium verticillioides*. Firstly, the antagonism of four *Trichoderma* isolates (*T. viride*1, *T. viride* 2, *T. virens* and *T. harzianum*) against five fungal pathogens of maize (*Phytophthora*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides*) was screened and characterized, and their total indole production was also determined as a possible mechanism for promoting plant growth. Most confrontations indicated that *Trichoderma* showed antibiosis towards *Fusarium*. All the *Trichoderma* isolates produced indoles, *T. viride* 2 had the highest amount. Secondly, the compatibility of *Trichoderma* and *Glomus intraradices* was assessed. Both microorganisms may be co-inoculated, but some combinations may exert short-term benefits to maize plants. Thirdly, the interaction between *G. intraradices* and *T. harzianum* on the control of *F. verticillioides*, inoculated in maize plants, and their effects on growth and nutritional status of plants were determined. *Glomus intraradices* stimulated the proliferation of *F. verticillioides* in the rhizosphere which did not show signs or symptoms of disease in roots, stems or leaves, but the greatest dry weight was produced. The *Trichoderma* + *G. intraradices* interaction resulted in plants with more vigor with high root volume, total dry weight, and leaf phosphorus content. The interaction between *G. intraradices* and *T. harzianum* favored some growth parameters of maize plants, but only in the absence of *F. verticillioides*.

Key words: *Zea mays*, *Trichoderma*, *Glomus intraradices*, *Fusarium verticillioides*, indoles, biocontrol.

AGRADECIMIENTOS



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de doctorado, con el no. de becario: 160363.

Al proyecto SEP-CONACYT 2012-179319, “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz”

AGRADECIMIENTOS

A dios por los momentos difíciles, por los buenos momentos, por la familia, por los amigos, por los errores que he cometido, por todo lo que me has dado, por lo que esta por venir y por estar siempre a mi lado.

Al Dr. Alejandro Alarcón, gracias por compartir su experiencia, dedicación y apoyo para que llevara a cabo este trabajo con éxito.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato y Dr. Julian Delgadillo Martínez, gracias por su apoyo y dedicación en esta etapa de formación.

Al Dr. John Larsen y Dr. Juan José Peña Cabriales, por su tiempo, apoyo y dedicación en esta etapa de mi formación.

A mis amigos (as) y personal del Postgrado de Genética y Edafología, a quienes quiero y respeto.

¡Mil gracias!

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mi hijo: Joaquín Eduardo por ser luz y esperanza en mi vida.

A mis padres y hermanos: Ana Rosa Medina Ramírez, Javier Ibarra Ortiz, Alberto, Jacobo y Francisco, por su cariño y apoyo, sin condiciones ni medida, en todo momento los llevo con migo.

A mis tíos: Susana Sánchez y Rubén Ibarra Ortiz ¹, por brindarme su cariño, consejo y apoyo incondicional.

A Javier Piloni por tener la paciencia y estar con migo en este proceso de mi vida.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	
RESUMEN.....	4
1.1 EL MAÍZ Y SU CONTEXTO AGRÍCOLA.....	5
1.2 ENFERMEDADES EN MAÍZ.....	6
1.3 PUDRICIÓN DE RAÍZ.....	7
1.4 <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> EN MAÍZ.....	8
1.5 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE <i>TRICHODERMA</i> Y HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES.....	12
1.6 HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES.....	12
1.7 <i>TRICHODERMA</i>	15
1.8 CONCLUSIÓN.....	19
1.9 LITERATURA CITADA.....	20
CAPÍTULO II. ANTAGONISMO <i>in vitro</i> DE CUATRO AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> A PATÓGENOS DE MAÍZ Y SU PRODUCCIÓN DE INDOLES TOTALES	
RESUMEN.....	33
ABSTRACT.....	34
2.1 INTRODUCCIÓN.....	35
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.3 RESULTADOS.....	39

2.4 DISCUSIÓN.....	44
2.5 CONCLUSIÓN.....	46
2.6 LITERATURA CITADA.....	47
CAPÍTULO III. COMPATIVILIDAD DE <i>Glomus intraradices</i> CON CUATRO ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> EN PLANTAS DE MAÍZ	
RESUMEN.....	51
ABSTRACT.....	52
3.1 INTRODUCCIÓN.....	53
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.3 RESULTADOS.....	57
3.4 DISCUSIÓN.....	64
3.5 LITERATURA CITADA.....	69
CAPÍTULO VI. <i>Trichoderma</i> y MICORRIZA ARBUSCULAR Y SU INTERACCIÓN CON PLANTAS DE MAÍZ CON <i>Fusarium verticillioides</i>	
RESUMEN.....	76
ABSTRACT.....	77
4.1 INTRODUCCIÓN.....	78
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
4.3 RESULTADOS.....	84
4.4 DISCUSIÓN.....	94
4.5 CONCLUSIÓN.....	97
4.6 LITERATURA CITADA.....	98
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES.....	104
Anexos.....	106

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	
Figura 1.1 Estructura química de la fumonisina y los esfingolípidos. (Adaptado de Stockmann Juvala H. y Savolainen K. 2008)...	11
CAPÍTULO II. ANTAGONISMO <i>in vitro</i> DE CUATRO AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> A PATÓGENOS DE MAÍZ Y SU PRODUCCIÓN DE INDOLES TOTALES	
Figura 2.1 Curva estándar utilizadas para la determinación de índoles totales.	39
Figura 2.2 Evaluación de micoparasitismo en cultivos duales de cuatro aislamientos de <i>Trichoderma</i> (a: <i>T. virens</i> , b: <i>T. viride</i> 1, c: <i>T. harzianum</i> , d: <i>T. viride</i> 2) y cinco patógenos (1: <i>Gibberella moniliformis</i> , 2: <i>Fusarium subglutinans</i> , 3: <i>Fusarium verticillioides</i> , 4: <i>Fusarium</i> sp., y 5: <i>Phytium ultimum</i>).	41
Figura 2.3 Microscopia de Ridell de <i>Fusarium subglutinans</i> y cuatro aislamientos de <i>Trichoderma</i> ; Donde: a y b, <i>F. subglutinans</i> + <i>T. virens</i> ., c y d, <i>F. subglutinans</i> + <i>T. viride</i> 1., e y f, <i>F. subglutinans</i> + <i>T. harzianum</i> ., g y h, <i>F. subglutinans</i> + <i>T. viride</i> 2. (Fotografías tomadas a 40X).	42
Figura 2.4 Producción de índoles totales de cuatro aislamientos de <i>Trichoderma</i> (<i>T. virens</i> , <i>T. viride</i> 1, <i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i> 2), en comparación de un aislamiento bacteriano productor de AIA (<i>Pseudomona tolasii</i>). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$ n=4).	45
CAPÍTULO III. COMPATIBILIDAD DE <i>Glomus intraradices</i> CON CUATRO ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> EN PLANTAS DE MAÍZ	
Figura 3.1 Peso seco total (A), Peso seco de follaje (B), y área foliar (C) de plantas inoculadas con <i>Glomus intraradices</i> (micorriza) y cuatro especies de <i>Trichoderma</i> : <i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma viride</i> (1	58

y 2), *Trichoderma harzianum*. A los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=5.

Figura 3.2 Peso seco de raíz (A) y volumen radical (B) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza) y cuatro especies de *Trichoderma*: *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* (1 y 2), *Trichoderma harzianum*. A los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=5. 59

Figura 3.3 Contenido foliar de fósforo (A) y nitrógeno (B) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza) y cuatro especies de *Trichoderma*: *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* (1 y 2), *Trichoderma harzianum*. A los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=4. 62

Figura 3.4 Colonización micorrízica (A) en presencia de *Trichoderma* en plántulas de maíz, y unidades formadoras de colonias (B) de cuatro cepas de *Trichoderma* (*Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* cepas 1 y 2, *Trichoderma harzianum*) en la rizosfera de plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza), a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=4. 63

CAPÍTULO VI. *Trichoderma* Y MICORRIZA ARBUSCULAR Y SU INTERACCIÓN CON PLANTAS DE MAÍZ INOCULADAS CON *Fusarium verticillioides*

Figura 4.1 A) Fotosíntesis y B) Clorofila (índice de verdor en unidades SPAD) en plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* en presencia de *F. verticillioides* (patógeno), a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=6. 85

- Figura 4.2** Altura (A), área foliar (B), volumen de raíz (C) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). 87
- Figura 4.3** Materia seca total de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza), *Trichoderma harzianum* y *F. verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). 90
- Figura 4.4** Contenido de nitrógeno y fósforo en follaje de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza), *Trichoderma harzianum* y *F. verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$), n=6). 91
- Figura 4.5** Porcentaje de colonización micorrízica de *Glomus intraradices* en plantas de maíz inoculadas con *Trichoderma harzianum* y *F. verticilloides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=3. 92
- Figura 4.6** Unidades formadoras de colonias de *Trichoderma harzianum* en suelo rizosférico de plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices* y *F. verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=3. 92
- Figura 4.7** Unidades formadoras de colonias de *Fusarium verticillioides* en suelo rizosférico de plantas de maíz inoculadas con *Trichoderma harzianum* y *Glomus intraradices*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=3 93
- Figura 4.8** Apreciación visual de: A) raíz de plantas de maíz del tratamiento testigo, y B) raíz dañada por *Fusarium verticillioides*. 94

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO III. COMPATIBILIDAD DE *GLOMUS INTRARADICES* CON CUATRO ESPECIES DE *TRICHODERMA* EN PLANTAS DE MAÍZ

- Cuadro 3.1** Unidades SPAD medidas en tres fechas de muestreo, y fotosíntesis de plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices* (Gi) y cuatro especies de *Trichoderma*, a los 58 días después de la siembra. 60

INTRODUCCIÓN

El cultivo del maíz y la elaboración de sus diversos productos alimenticios, están ligados con el surgimiento y evolución de las civilizaciones mesoamericanas precolombinas. Su adaptabilidad y productividad hizo que el maíz se expandiera rápidamente en el mundo. *Fusarium verticillioides* es un hongo asociado al maíz, y es la especie fúngica contaminante más frecuente, cuya infección en grano puede ocurrir de forma asintomática o causar pudriciones. La contaminación en grano de maíz se relaciona con la presencia de fumonisinas, que causan trastornos en humanos y animales.

La especie de *F. verticillioides* se distribuye por todo el mundo, y con alta frecuencia es aislada del maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas cuantiosas que varían año con año. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrófica, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, y las condiciones ambientales.

A diferencia de otros hongos que son estrictamente biotróficos, *F. verticillioides* no genera estructuras especializadas que faciliten la entrada al tejido y a las células. Sin embargo, es capaz de producir cantidades importantes de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso infeccioso. Entre las micotoxinas que sintetiza la especie se hallan,

ácido fusárico, fusarina C, naftoquinonas, la moniliformina y fumonisinas, las cuales son abundantes y están catalogadas como compuestos carcinógenos.

Las estrategias de control, destinados a reducir la infección por fitopatógenos de cultivos, han sido ampliamente basadas en el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, la aplicación de altas dosis de estos fungicidas puede resultar en la contaminación del ambiente, en el deterioro de la salud humana, y en el aumento de la resistencia de los hongos. Por lo que se propone la incorporación de procesos naturales a las prácticas agrícolas convencionales como el aprovechamiento de los microorganismos capaces de ejercer efectos de control biológico, y evitar o reducir el uso de recursos no renovables o cuyo uso signifique riesgos al ambiente o al agricultor, uso del potencial biológico y genético de las especies microbianas vista de un incremento en la productividad, y en pro de una agricultura sostenible.

Tanto *Trichoderma* como los hongos micorrízicos arbusculares, aplicados en combinación pueden representar una alternativa para reducir los efectos negativos de fitopatógenos del maíz, por lo que esta investigación planteó los siguientes objetivos:

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar los efectos de la combinación de *Trichoderma harzianum* y *Glomus intraradices* en el control de *Fusarium verticillioides* en plantas de maíz y evaluar sus efectos en el crecimiento de plantas de maíz.

Objetivos particulares

- Seleccionar cepas de *Trichoderma* con capacidad antagónica *in vitro* contra cepas de hongos patógenos de maíz.
- Seleccionar cepas de *Trichoderma* compatibles con *Glomus intraradices*, para su utilización en consorcio en plantas de maíz.
- Evaluar la interacción de *Trichoderma harzianum*–*Glomus intraradices*–*Fusarium verticillioides* en las plantas y en la rizosfera de maíz.

Hipótesis General

Los hongos del género *Trichoderma* en consorcio con *Glomus intraradices* ejercen un efecto positivo en plantas inoculadas con *Fusarium verticillioides*.

Hipótesis particulares

- Las cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad antagónica y micoparasítica *in vitro* a patógenos fúngicos de maíz.
- Las cepas de *Trichoderma* son compatibles con *Glomus intraradices* por lo que se pueden utilizar de manera conjunta en la rizosfera de maíz.
- El consorcio de *Trichoderma*-*Glomus intraradices* presenta efecto positivo en plantas de maíz inoculadas con *Fusarium verticillioides*.

CAPÍTULO I
REVISIÓN DE LITERATURA
RESUMEN

El cultivo del maíz y la elaboración de sus diversos productos alimenticios, están ligados con el surgimiento y evolución de las civilizaciones mesoamericanas precolombinas. Su adaptabilidad y productividad hizo que el maíz se expandiera rápidamente en el mundo. El maíz es producido en la mayoría de los países del mundo siendo el tercer cultivo de importancia (después del trigo y del arroz). La mayor parte de la producción de maíz ocurre en los Estados Unidos, la República Popular China, Brasil, y México, entre otros. *Fusarium verticillioides* es un hongo asociado al maíz, y es la especie fúngica contaminante más frecuente, cuya infección en grano puede ocurrir de forma asintomática o causar pudriciones. La contaminación en grano de maíz se relaciona con la presencia de fumonisinas, que causan trastornos en humanos y animales. La biotecnología propone la incorporación de alternativas naturales a las prácticas agrícolas convencionales; como ejemplo, el aprovechamiento de los microorganismos que ejercen efectos benéficos y de control biológico. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Trichoderma* promueven el crecimiento y la resistencia de las plantas a las enfermedades a través de la síntesis de fitohormonas o la absorción de nutrimentos. Estos microorganismos ocurren normalmente en la naturaleza e influyen en la respuesta frente a patógenos como *Fusarium*. La compatibilidad de HMA y *Trichoderma* ha sido estudiada; sin embargo, no todos los aislamientos son efectivos bajo diferentes condiciones climáticas al dificultarse su establecimiento y su efectividad biológica. La presente revisión recopila información sobre los aspectos más importantes del maíz, y los microorganismos como *Fusarium*, HMA y *Trichoderma* que cohabitan su rizosfera, y su impacto en las plantas de maíz.

1. 1 EL MAÍZ Y SU CONTEXTO AGRÍCOLA

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante a nivel mundial y de particular preponderancia, en las regiones en desarrollo; en México y Centro América, así como en algunos países asiáticos y africanos, el maíz es consumido tanto en fresco como en diversas formas industrializadas, constituyendo la base de la alimentación además de ser la principal fuente de energía y proteínas de la población, en América latina, el maíz es canalizado principalmente a la industria nixtamalizadora para elaboración de tortillas y productos derivados (Melesio *et. al.*, 2008).

México produce 1.154 millones de toneladas de grano (ciclo 2013), siendo el 8° productor a nivel global, detrás de Estados Unidos, China y Brasil. (SIAP, 2013; FAO, 2014). El maíz es uno de los cultivos más importante, presentando un rendimiento de 341,705 ton ha⁻¹ de grano nacional (ciclo 2013), de las cuales 90% es maíz blanco y se destina al consumo humano (SIAP, 2013). La producción nacional de maíz se centra en cuatro estados: Jalisco, Sinaloa, México y Chiapas; seguidos por Guerrero, Michoacán, Puebla y Oaxaca en menor proporción. Para 2010, el consumo anual de maíz fue de 123 kilogramos por persona, principalmente en forma de tortilla elaborada a partir de masa de nixtamal o de harina de maíz nixtamalizada, cifra muy superior al promedio mundial que es de 16.8 kg per cápita (SIAP, 2013; INEGI, 2011; FAO, 2013; Desjardins *et al.*, 2005).

El nivel de producción en la agricultura en México es bajo, debido a factores económicos y sociales, sin embargo, lo que respecta a la susceptibilidad a la colonización de sus granos por hongos y mohos; estos provocan pérdidas económicas importantes, debido a las deficiencias en la calidad del germoplasma, prácticas agronómicas, transporte y condiciones de almacenamiento, que acentúan el problema, esto provoca que los granos de maíz contaminados pueden presentar decoloración y manchado, lo que el valor

nutricional, favorece la pérdida de peso, así como la contaminación por micotoxinas (Martín *et al.*, 2001; Martínez, 1998).

Uno de los fenómenos importantes en la producción masiva de maíz en México fue la “revolución verde” que cumplió su objetivo de incrementar el rendimiento de cosechas por unidad de superficie, aunque su impacto en el ambiente y la sostenibilidad muestran un balance negativo, entre los efectos del uso indiscriminado de plaguicidas dio como resultado la aparición e incremento de plagas y enfermedades; la aparición de microorganismos resistentes que limitan la producción de las variedades mejoradas debido a su uniformidad genética y a la erosión de genes de resistencia, por su siembra en monocultivo. Los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola, y su combate se realiza básicamente mediante métodos químicos, los cuales tienen un costo económico como ambiental (Dalgaard *et al.*, 2003; Tilman *et al.*, 2002).

1.2 ENFERMEDADES EN MAÍZ

El cultivo de maíz es atacado por un gran número de patógenos que causan importantes daños económicos a su producción. La monografía de Wellman (1972) *Tropical American Plant Diseases*, destaca 130 enfermedades que afectan al maíz en los trópicos, comparadas con 85 que ocurren en los ambientes templados. Información detallada sobre las enfermedades del maíz es también proporcionada, Ullstrup (1976, 1977, 1978), Renfro (1985) y Smith y White (1988). La Universidad de Illinois y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (Anónimo, 1973) publicaron el *Compendium of corn diseases* que comprende un relato ilustrado de los problemas patogénicos y no patogénicos que afectan al maíz. De León (1984) publicó una guía de campo ilustrada para la identificación de las enfermedades más importantes del

maíz y menciona 44 enfermedades causadas por hongos, tres por bacterias, 10 por virus y una por "mollicutes".

1.3 PUDRICIÓN DE RAÍZ

La pudrición de las raíces ocurre en condiciones y ambientes similares a la pudrición de las semillas y a los tizones. Generalmente es causada por hongos de los géneros *Fusarium* y *Pythium*. Estos microorganismos provocan que la raíz se debilite y se pudra; consecuentemente, el abastecimiento de nutrientes para la planta se retarda. La infección que provoca la pudrición puede entrar por la raíz principal, a través de mesocotilo, corona, raíces y nodos inferiores (Leslie *et al.*, 1990, Gatch *et al.*, 2002; Agrios, 2004; Muppa, 2009). Una vez que infecta *Fusarium*, otros hongos como *Diplodia maydis*, *Gibberella zae*, *Fusarium verticillioides* pueden entrar a la planta a través de las raíces dañadas y causar la pudrición del tallo (Ferrigo *et al.*, 2014). Una asociación positiva de la incidencia de la pudrición de la raíz con la del tallo, también es causada por varias especies de *Fusarium* que pasan el invierno como micelio o microconidios en restos vegetales o en suelo (Solano-Báez *et al.*, 2011).

La colonización fúngica en raíz también puede ser causada por semillas infectadas, aberturas naturales y por estrés ambiental; sin embargo, los principales factores que provocan la infección, son las heridas causadas por insectos rizófagos y/o prácticas de labranza (Cruz *et al.*, 2014; Muppa, 2009; Logrieco *et al.*, 2002; Munkvold *et al.*, 1997; Leslie *et al.*, 1990; Chambers 1987; Dodd 1980; Francis *et al.*, 1975).

Regularmente la pudrición del tallo se espera después de la cosecha, esto es importante para el reciclaje de nutrientes y materia orgánica, pero si se produce antes de la madurez fisiológica de la planta de maíz, entonces conduce a la pérdida de rendimiento debido al desarrollo del patógeno (Dodd, 1980; Muppa, 2009). Sin embargo, si se produce

la infección en la madurez de grano no sólo conduce a la pérdida de rendimiento, sino que también provoca contaminación de grano por aflatoxinas, donde la aflatoxina B1 (FB1) es la toxina natural más tóxica, que se clasifica como cancerígeno humano clase 1, por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002).

1.4 FUSARIUM VERTICILLIOIDES EN MAÍZ

El maíz con frecuencia es colonizado por el hongo *Fusarium verticillioides* (teleomorfo *Gibberella moniliformis*), patógeno de importancia económica que causa pérdidas significativas tanto para los productores de maíz y sorgo, que contamina los alimentos para consumo animal y humano (Jurgenson *et al.*, 2002; Ferreira-Castro *et al.*, 2014).

La disminución del rendimiento, calidad, y por ende, la disminución del valor de los granos por especies de *Fusarium*, se traduce en pérdidas económicas en todo el mundo. La contaminación del maíz por micotoxinas es un problema mundial para la salud humana y animal (Ferrigo *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2014; Ferreira-Castro *et al.*, 2014). Las especies de *Fusarium* producen una amplia gama de micotoxinas, como diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, zearalenona, fumonisinas, fusarina C, beauvericina, moniliformina, y fusaproliferin. Las fumonisinas fueron descubiertas en 1988 y comprenden un grupo de micotoxinas relacionadas estructuralmente. Estas toxinas son producidas por especies del género *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) y *F. proliferatum*, especies ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales (Bezuidenhout *et al.*, 1988). Hasta el momento, se han identificado 28 análogos de fumonisinas. De éstos, las fumonisinas B1 (FB1), FB2 y FB3 se producen de forma natural, y la FB1 es la más importante que representa el 70% del total de fumonisinas (Pittet, 1998; Shephard *et al.*, 1996). La

fumonisina B1 ha sido identificada como el agente causante de leucoencefalomalacia equina, un síndrome neurotóxico (Bullerman, 199; Kellerman *et al.*, 1990; Mallmann *et al.*, 1999; Marasas, 1995; Nelson *et al.*, 1993; Norred y Voss, 1994), hidrotórax y edema pulmonar en cerdos (Bullerman, 1996; Dilkin *et al.*, 2003; Marasas, 1995; Nelson *et al.*, 1993; Norred y Voss, 1994; Osweiller *et al.*, 1992; Rotter *et al.*, 1996).

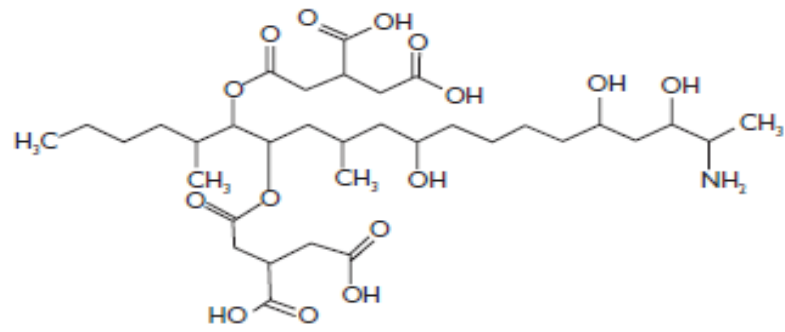
Las dos enfermedades dominantes en cereales son el tizón de espiga en granos pequeños y la pudrición de mazorca en maíz (Jurgenson *et al.* 2002), donde, *Fusarium verticillioides* accede a los tallos de maíz a través de heridas creadas por insectos o daños mecánicos, o bien, penetra directamente la raíz o el tallo por puntos de entrada naturales (nodos), o vía semilla infectada (Afolabi *et al.*, 2008; Gatch y Munkvold, 2002; Wilke *et al.*, 2007). Este hongo se asocia comúnmente con el maíz como endófito asintomático (Desjardins, 2006; Bezuidenhout *et al.*, 1998). En el campo, la infección de las mazorcas de maíz se realiza por esporas en el aire, siendo la principal vía de infección de *F. verticillioides*; además, también puede transmitirse a través de semillas infectadas que son asintomáticas (Kuldau y Yates 2000; Desjardins *et al.*, 2000; Munkvold y Desjardins, 1997).

Hoy en día la susceptibilidad de híbridos de maíz es mayor a la pudrición del tallo y mazorca, causada por *Fusarium verticillioides* (Desjardins *et al.*, 2005). El movimiento sistémico de *F. verticillioides* en semillas infectadas a raíces, tallos y espigas, se ha documentado en el laboratorio y en el campo, mediante el seguimiento de las cepas marcadas e inoculadas en planta (Oren 2003), y por la recuperación de los tejidos vegetales (Munkvold *et al.*, 1997; Desjardins *et al.*, 2002). Las plantas de maíz no sólo pueden ser infectadas por múltiples vías, sino también pueden estar coinfectadas con múltiples cepas genéticamente distintas de *Fusarium* (Kedera *et al.*, 1994). Además, las cepas fúngicas

pueden actuar como endófitos o como patógenos, en función de los contextos ambientales y genéticos que no son bien comprendidas (Miller, 1994; FAO 2003).

El principal hongo involucrado en la producción de fumonisina en México, es *F. moniliforme* (~75%); no obstante, existen diferencias geográficas en el tipo de cepas en diferentes regiones del país. En el Noroeste de México las cepas de hongos aisladas son en su mayoría, grandes productores de FB1 (Fumonisina B1), mientras que las cepas aisladas en la zona centro, principalmente en el Estado de México, son productoras de bajas cantidades de FB1 (Marasas, 1996, Miller, 1994).

Después de su descubrimiento tóxico, las fumonisinas B₁ (FB₁) y sus homólogos B₂ (PC₂) y B₃ (FB₃) que carecen de grupos hidroxilo en C₁₀ y C₅, respectivamente, también tienen efectos tóxicos para las plantas (Stockmann *et al.*, 2008; Desjardins *et al.*, 2005). Debido a que las fumonisinas tienen una estructura química similar a la cadena larga de los precursores de los esfingolípidos (Figura 1.1), cuyo metabolismo es el blanco de la acción tóxica de la fumonisina. El metabolismo de los esfingolípidos consta de dos etapas, la síntesis *de novo* a partir del complejo serinapalmitoil-CoA y el recambio de esfingolípidos que incluye la hidrólisis de esfingolípidos complejos. En ambas etapas interviene la enzima ceramida sintetasa, la cual es bloqueada por la acción de la fumonisina. Este bloqueo conlleva la inhibición en la síntesis de ceramida, el incremento de la esfinganina y la esfingosina, una mayor degradación de las bases esfingoides provenientes de la dieta y, finalmente, una reducción en la formación de esfingomielina (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010; Desjardins *et al.*, 2005; Jurgenson *et al.* 2002; Abbas *et al.*, 1994; Gilchrist *et al.*, 1992; Marasas, 1996).



Fumonisin B

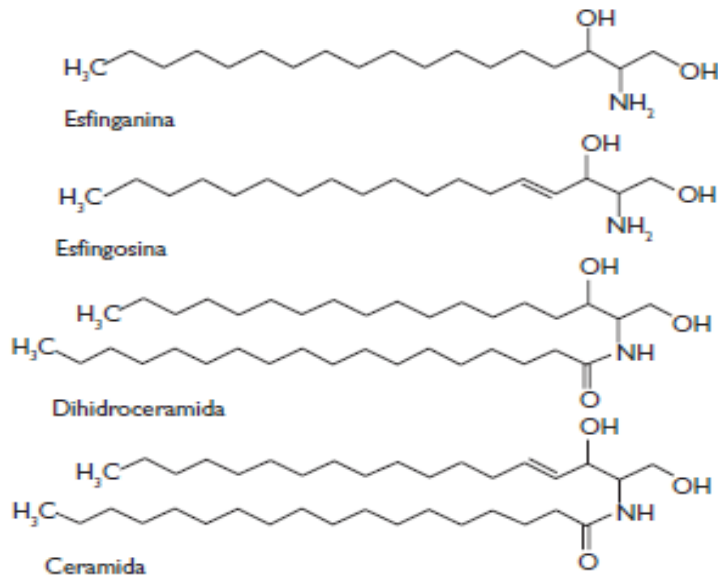


Figura 1.1. Estructura química de la fumonisina y de los esfingolípidos (Adaptado de Stockmann Juvala y Savolainen, 2008).

La temperatura y la humedad son los principales factores que afectan el crecimiento de *F. verticillioides* y la producción de micotoxinas (Cruz *et al.*, 2014) produciendo patrones característicos de respuesta en función de las especies de hongos. Las interacciones entre estos dos factores limita la capacidad de esta especie para crecer y producir FB1 (Jurado *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2013).

1.5 CONTROL MICROBIOLÓGICO: *TRICHODERMA* Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Las tendencias recientes de la microbiología del suelo sugieren que los inoculantes fúngicos como *Trichoderma* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tienen el potencial de mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Ferrigo *et al.*, 2014; Nzanzaa *et al.*, 2013), ya que la mayoría de las especies de plantas forman asociaciones benéficas con estos microorganismos (Smith y Read, 2008). El control biológico por cepas de *Trichoderma* y HMA es a veces impredecible debido a que los agentes de control biológico (ACB) son organismos cuyas actividades dependen principalmente de las diferentes condiciones ambientales que en ocasiones son impredecibles (Ferrigo *et al.*, 2014). La comprensión tanto de la diversidad genética de las cepas de *Trichoderma* y HMA y sus mecanismos de control biológico dará lugar a una mejor aplicación de las diferentes cepas como ACB. Estos mecanismos son complejos, y el control biológico es el resultado final de diferentes mecanismos que actúan de forma sinérgica para lograr el control de las enfermedades (Woo *et al.*, 2006). La importancia de la utilización de estos inoculantes radica en que estos hongos pueden contribuir en la adquisición de nutrientes, promover el crecimiento de las plantas, mejorar la calidad del suelo, etc. (Whipps, 2004; Cardoso y Kuyper, 2006; Rillig y Mummey, 2006; Van der Heijden *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2009; Nzanzaa *et al.*, 2013).

1.6 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

El origen de los HMA se remonta hace 460 millones de años (Redecker *et al.*, 2000) y forma simbiosis entre las raíces de un 80% de las especies de plantas terrestres existentes (Wang y Qui 2006). Los HMA son de importancia ecológica, ya que su simbiosis con la planta mejora la productividad, la resistencia al estrés y la asimilación de nutrientes. Estos

hongos son simbioses obligados; su ciclo de vida incluye el crecimiento y la proliferación dentro de la raíz y el suelo circundante (Hayek *et al.*, 2014; Feddermann *et al.*, 2010).

La colonización de HMA de las raíces implica una serie de eventos que están estrictamente regulados por ambos simbioses. El reconocimiento y la iniciación de colonización simbiótica de HMA se encuentra predeterminada genéticamente (Feddermann *et al.*, 2010). La simbiosis micorrízica inicia cuando las plantas secretan exudados como las estrigolactonas (hormonas vegetales) que estimulan la actividad metabólica del HMA, la germinación de esporas, la producción de micelio fino y altamente ramificado (López-Ráez *et al.*, 2008). Las hifas fúngicas ramificadas a su vez secretan señales difusibles para las raíces, lo que conduce a una inducción específica controlada de la simbiosis en las raíces que están en contacto con el hongo, incluyendo la expresión de genes relacionados con la simbiosis; posteriormente, en el proceso de formación del apresorio y el aparato pre-penetración, que permite al HMA entrar a la raíz a través de la epidermis y dentro de la raíz, las hifas crecen intercelularmente hasta que llegan a la corteza interior donde penetran las paredes celulares corticales y la hifa terminal se diferencia en arbusculos dentro de ciertas células corticales (Genre *et al.* 2005; Genre *et al.* 2008, Camarena-Gutiérrez, 2012). En ningún momento el hongo penetra la membrana plasmática, y ciertos HMA pueden desarrollar vesículas donde se almacenan lípidos. Para completar su ciclo de vida, el hongo sale de la raíz y seguido de un profuso crecimiento de las hifas externas, esporula en el suelo asegurando su continuidad (Genre *et al.*, 2008; Parniske, 2008; Camarena-Gutiérrez, 2012).

Los HMA aumentan la absorción de agua y nutrientes minerales para su hospedante especialmente el fósforo, mientras que a su vez reciben carbono fotosintético de la planta (Gianinazzi *et al.*, 2010). Además, aumentan la protección contra el estrés abiótico, e

inducen que la planta sea más tolerante a la infección por patógenos y parcialmente compensar el daño relacionado con la enfermedad. El efecto de biocontrol observado en el caso de HMA, se ha relacionado por estimular mayor absorción de fosfato y parece ser dependiente la disponibilidad de este nutrimento (Javot *et al.*, 2007), favoreciendo con ello el crecimiento del hospedante (Gamalero *et al.*, 2002; Berta *et al.*, 2005).

Otro efecto indirecto de los HMA sobre la supresión de enfermedad en planta está relacionado con el cambio de patrones de exudación por la raíz (Hodge, 2000; Vierheilig *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004). Los exudados de raíz pueden variar en cantidad y calidad en las plantas micorrizadas, reportándose diferencias en la exudación de aminoácidos (Harrier y Watson, 2004), flavonoides (Steinkellner *et al.*, 2007), compuestos fenólicos (McArthur y Knowles, 1992), y azúcares (Lioussanne *et al.*, 2008). Una vez que las raíces son colonizadas por HMA, las plantas son capaces de regular la colonización a través de la liberación de exudados. Se ha propuesto que las plantas pueden utilizar este mecanismo como una medida preventiva contra la colonización de HMA y al mismo tiempo como defensa contra patógenos (Vicedo *et al.*, 2009; Vierheilig *et al.*, 2008).

Los cambios en la composición de exudados micorrízicos conducen a alteraciones en la rizosfera microbiana, donde otros microorganismos benéficos pueden residir, y su actividad tiene un efecto directo o indirecto sobre la supresión de agentes causantes de enfermedad. Además, se ha demostrado que poblaciones de bacterias aerobias facultativas como *Pseudomonas*, *Streptomyces* y otros actinomicetos (Marschner y Baumann, 2003, Wamberg *et al.*, 2003 Harrier y Watson, 2004), también responden a los cambios en la exudación producidos por los HMA. Por ejemplo, las raíces de las plantas de tomate inoculadas con HMA aumentan la presencia de bacterias promotoras del crecimiento

vegetal como *P. fluorescens* (Sood, 2003), y estimulan la población de hongos *Trichoderma* spp. (Filion *et al.*, 1999).

1.7 TRICHODERMA

Las especies de *Trichoderma* son uno de los componentes importantes y comunes de la rizósfera del suelo, incluyendo la capa de humus del bosque, suelos agrícolas, praderas, desiertos de todas las zonas (incluyendo la tundra, Antártida y los trópicos) agua de lagos (Nawrocka y Małolepsza, 2013; Ibarra-Medina *et al.*, 2010, Woo *et al.*, 2006; Samuels, 1996; Dix y Webster, 1995), y se les conoce como agentes de control biológico efectivos (Nawrocka y Malolepsza, 2013). Debido a la gran cantidad de biomasa que desarrolla en el suelo, generan redes de micelio muy finas que facilitan la asimilación de minerales (Wainwright, 1992).

Trichoderma ha sido ampliamente utilizado como un agente de biocontrol debido a la competencia por nutrientes del suelo y por espacios (Elad, 1999), la producción de sustancias antibióticas (Vinale *et al.*, 2006), y la mejora en la resistencia a patógenos (Chandra Nayaka *et al.*, 2010; Yedidia *et al.*, 2003). *Trichoderma harzianum* es una cepa efectiva caracterizada por su capacidad de competir contra otros microorganismos fúngicos y la capacidad colonizar las raíces de plantas en diferentes tipos de suelo y pH (Harman y Björkman, 1998), así como promover el crecimiento de las plantas (Akladious y Abbas, 2014) y para estimular las respuestas de defensa sistémica en el maíz (Harman *et al.*, 2004a; Morris *et al.*, 1998). Estos hongos pueden utilizar una gran variedad de fuentes de nutrientes, además de ser resistentes a los productos químicos y toxinas naturales, y ser capaces de degradar eficazmente hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y plaguicidas (Argumedo-Delira *et al.*, 2012; Woo *et al.*, 2006).

Las especies de *Trichoderma* son prolíficas productoras de proteínas extracelulares, y son conocidas por su capacidad de producir enzimas que degradan celulosa y quitina, y por su capacidad de micoparasitismo y antagonismo hacia microorganismos patógenos (Nawrocka y Małolepsza, 2013). Varios autores mencionan los diferentes mecanismos de *Trichoderma* y que se relacionan con: a) la producción de metabolitos que generan antibiosis (Cook y Baker, 1983), b) fungistasis, lo que impide la germinación de esporas, y el crecimiento de patógenos, c) competencia por nutrientes y espacios en la rizósfera, d) acidificación del suelo, e) inducción a la resistencia al estimular los mecanismos de defensa vegetal, f) el micoparasitismo el cual implica el contacto físico y la síntesis de enzimas hidrolíticas, compuestos tóxicos y/o antibióticos que actúan sobre un patógeno, e g) incluso pueden promover el crecimiento y desarrollo de las plantas (biofertilización) (Ibarra-Medina *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2006; Benítez *et al.*, 2004; Harman, 2004; Elad, 1986).

En el caso del micoparasitismo, *T. harzianum* se caracteriza principalmente por secretar enzimas hidrolíticas tales como quitinasas, glucanasas y proteasas capaces de degradar la pared celular de los hongos fitopatógenos (Markovich y Kononova, 2003; Seidl *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2008). El proceso de micoparasitismo inicia con la producción de niveles bajos de enzimas degradantes de pared celular (por sus siglas en inglés, CWDEs) en un intento de localizar a su presa, y tras su detección, se induce el crecimiento direccional hacia la presa junto con una mayor producción de CWDEs (Olmedo *et al.*, 2014). *Trichoderma* entonces se adosa y se enrolla a su presa, formando apresorios para penetrar las hifas, que se degradan posteriormente a través de la producción de las enzimas hidrolíticas (Vosa *et al.*, 2014; Gruber y Seidl-Seiboth, 2012; Shores *et al.*, 2010; Rincón *et al.*, 2008). El potencial micoparasítico de *Trichoderma* se ha demostrado contra una amplia gama de patógenos de plantas, y esta capacidad parece ser generalizada

en este género (Markovich y Kononova, 2003; Seidl *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2008). Un ejemplo de ello, en una reciente investigación de más de 1,100 cepas de *Trichoderma*, donde se definen molecularmente 75 especies, reportando que todos los aislamientos fueron micoparásitos de *B. cinerea* (Druzhinina *et al.*, 2011).

Aunque el antagonismo de especies de *Trichoderma* sea basado principalmente en el micoparasitismo, también se ha reportado que causa la degradación de patógenos a través de la producción de compuestos antimicrobianos sin tener contacto físico entre los microorganismos, a este proceso se le denomina generalmente antibiosis (Vosa *et al.*, 2014).

Trichoderma spp. produce una amplia gama de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos, la producción de metabolitos secundarios depende de la cepa en cierta medida e incluye compuestos antimicrobianos volátiles y no volátiles pertenecientes de bajo peso molecular, compuestos no polares tales como pironas, butenolides, antraquinonas, tricotecenos y terpenoides, así como péptidos no ribosomales como peptaiboles (Vosa *et al.*, 2014; Reino *et al.*, 2008). Algunos compuestos actúan sinérgicamente en antagonismo junto con CWDEs (Vosa *et al.*, 2014). Por ejemplo los peptaiboles de *Trichoderma harzianum* tricolorzianina A1 y B1 con quitinasas y β -1,3-glucanasas tienen un efecto sinérgico en la inhibición de la germinación de esporas y la elongación de hifas de *B. cinerea*; de la misma manera la abundante producción de CWDE, provocada por la presencia de elicitores del patógeno, tiene el mismo efecto sobre este patógeno (Schirmbock *et al.*, 1994; Chugh y Wallace, 2001; Vinale *et al.*, 2008). Malmierca *et al.* (2012) indican que los tricotecenos producidos por *Trichoderma* causan la antibiosis de *B. cinerea*. Los peptaiboles de cadenas lineales afectan la permeabilidad de la membrana debido a su naturaleza anfipática que les permite

autoasociarse en los canales iónicos en las membranas, y posteriormente conducir a la muerte celular (Schirmbock *et al.*, 1994). Cheng *et al.* (2011) mostraron que la proteína extracelular I oxidasa secretada por *T. harzianum* ETS 323 tuvo una respuesta similar a la apoptosis, además de inducir la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno), la fragmentación del ADN y la despolarización de la membrana mitocondrial en hifas. En otro ejemplo, *T. harzianum* T39, produce proteasas que inhiben significativamente la actividad de enzimas hidrolíticas de *B. cinerea*, reduciendo con ello su patogenicidad (Kapat *et al.*, 1998; Elad y Kapat, 1999).

La competencia por los nutrientes o por los espacios y sitios de infección es un mecanismo potencial de control biológico que ocurre entre los microorganismos con mismos requerimientos fisiológicos en un determinado nicho ecológico donde podría haber limitación de recursos (Vosa *et al.*, 2014). La competencia por los sitios de infección, por lo general, ocurre dentro o fuera de las raíces. Así, la colonización intensa de la superficie de la raíz puede impedir el acceso del patógeno a sus sitios de infección preferidas; sin embargo, existe cierto debate acerca de este mecanismo para aquellos microorganismos no patógenos (Fravel *et al.*, 2003; Alabouvette *et al.*, 2009).

La aplicación de fungicidas químicos ha sido reemplazada por la aplicación de agentes de control biológico, debido a la aparición de cepas resistentes a fungicidas y las preocupaciones con respecto a los impactos en la salud y en el ambiente de estos productos químicos. Durante las últimas décadas, varios organismos con potencial de control biológico se han aislado, caracterizado y comercializado, y, por tanto, el control biológico de las enfermedades de las plantas ha recibido más atención (Shali *et al.*, 2010). Las especies de *Trichoderma* son consideradas como potenciales agentes de biocontrol y estimuladoras del crecimiento para muchas plantas (Verma *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2008;

Savazzini *et al.*, 2009). Como se ha indicado, la competencia con los patógenos, el parasitismo y la producción de compuestos antifúngicos son los mecanismos más importantes en la actividad de un agente de biocontrol (Verma *et al.*, 2007; Savazzini *et al.*, 2009). Más aun, las poblaciones de *Trichoderma* se pueden establecer con relativa facilidad en diferentes tipos de suelo y pueden persistir a niveles detectables por meses (Olmedo *et al.*, 2014). Además, *Trichoderma* así como otros agentes de control biológico, interactúan con la planta al generar metabolitos secundarios que influyen o modifican el metabolismo de la planta (Vinale *et al.*, 2008), actuando también como promotores de crecimiento, en un aumento de la productividad de la planta y de sus rendimientos (Harman *et al.*, 2004).

1.8 CONCLUSIÓN

Los microorganismos tienen un protagonismo destacado en el sistema suelo-planta, ya que desarrollan diversas actividades que afectan el desarrollo, nutrición y salud de la planta y benefician la calidad del suelo (Barrea y Olivares, 1998; Kennedy, 1998). Las acciones que resultan benéficas para el sistema suelo-planta pueden concretarse de la manera siguiente: a) fitoestimulantes: estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento por la producción de promotores de crecimiento, vitaminas y otras sustancias, b) biofertilizantes: incrementan el suministro o disponibilidad de los nutrientes por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos de los nutrimentos, tales como la fijación de N₂, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de nutrimentos integrados en compuestos orgánicos, c) mejoradores de agrosistemas: mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables, d) biorremediadores: eliminan productos xenobióticos tales como plaguicidas (herbicidas y fungicidas), e) mejoradores ecofisiológicos: incrementan la resistencia/tolerancia al estrés tanto biótico como abiótico,

agentes de control biológico de patógenos: desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio, entre los que destacan *Bacillus*, *Pseudomonas*, hongos micorrízicos arbusculares, y *Trichoderma*.

La biotecnología propone la incorporación de procesos naturales a las prácticas agrícolas convencionales como el aprovechamiento de los microorganismos capaces de ejercer efectos de control biológico, y evitar o reducir el uso de recursos no renovables o cuyo uso signifique riesgos al ambiente o al agricultor, uso del potencial biológico y genético de las especies microbianas vista de un incremento en la productividad, y en pro de una agricultura sostenible, tanto *Trichoderma* y HMA aplicados en combinación pueden representar una alternativa fiable para reducir el uso de fungicidas en ambientes agrícolas de México. Sin embargo, se requiere el desarrollo de tecnologías compatibles con microorganismos nativos de México que permita su adaptabilidad, además de que permitan su combinación ventajosa en condiciones agrícolas del campo mexicano.

1.9 LITERATURA CITADA

- Abbas H.K., T. Tanaka, S.O. Duke, J.K. Porter, E.M. Wray, L. Hodges, A.E. Sessions, E. Wang, A.H. Merrill Jr., R.T. Riley. Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.*, (1994), 106:1085-1093.
- Afolabi C.G., P.S. Ojiambo, E.J.A. Ekpo, A. Menkir, R. Bandyopadhyay. Novel sources of resistance to *Fusarium* stalk rot of maize in tropical Africa. *Plant Dis.*, (2008), 92:772–780.
- Agrios GN *Plant Pathology*. 4th ed. Academic Press. New York, USA. (2004), 635 pp.
- Alabouvette C., C. Olivain, Q. Migheli, C. Steinberg., Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.*, (2009), 184:529–544.

- Argumedo-Delira, R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Almaraz J. J., Peña-Cabriaes J. J., Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzopyrene, *J. Environ. Manage.* (2012) 95:291-299
- Bai Z., B. Jin, Y. Li, J. Chen, Z. Li, Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *J. Environ. Sci.*, (2008), 20: 353–358.
- Benítez T., A.M. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón, Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. microbiol.* (2004) 7:249-260.
- Berta G., S. Sampo, E. Gamalero, N. Massa, P. Lemanceau. Suppression of *Rhizoctonia* root-rot of tomato by *Glomus mosseae* BEG12 and *Pseudomonas fluorescens* A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis *Eur. J. Plant Pathol.*, (2005), 111:279–288.
- Bezuidenhout S.C., W.C.A. Gelderblom, C.P. Gorst-Allman, R.M. Horak, W.F.O. Marasas, G. Spiteller, et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chemical Communications* (1988), 743–745.
- Bullerman L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. *Adv. Environ. Medical Biol.*, (1996), 32:27–38.
- Camarena-Gutiérrez, G. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares, *Rev. Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, (2012), 18(3):409-421.
- Cardoso, I.M., Kuyper, T.W. 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116: 72–84.
- Chambers, K. R. 1987. Stalk rot of maize: Host-pathogen Interaction. *J. Phytopathology.* 118:103-108.
- Cheng C.H., C.A. Yang, S.Y. Liu, C.T. Lo, H.C. Huang, F.C. Liao, K.C. Peng. Cloning of a novel l-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 and bioactivity analysis of overexpressed l-amino acid oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, (2011), 59: 9142–9149.
- Chugh J.K., B.A. Wallace., Peptaibols: models for ion channels, *Biochem. Soc. Trans.*, (2001) 29:565–570.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.

- Cruz A., P. Marína, N. Maganb, M.T. González-Jaéna. Combined effects of benomyl and environmental factors on growth and expression of the fumonisin biosynthetic genes FUM1 and FUM19 by *Fusarium verticillioides*. *International J. Food Microbiol.* (2014) 191:17–23.
- Dalgaard T, Hutchings NJ and Porter JR (2003b) Agroecology, scaling and interdisciplinarity. *Agriculture Ecosystems and Environment* 100 39-51.
- De León, C. & Pandey, S. 1989. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. *Crop Sci.*, 29: 12-17.
- Desjardins A. E., R. D. Plattner, R. J. Stessman, S. P. McCormick, M. J. Millard., Identification and heritability of fumonisin insensitivity in *Zea mays*. *Phytochemistry*, (2005). 66 (20):2474-2480.
- Desjardins A.E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. (2006)
- Desjardins A.E., G.P. Munkvold, R.D. Plattner, R.H. Proctor. (2002) FUM1—a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol Plant–Microbe Interact*, 15:1157–1164
- Desjardins A.E., R.D. Plattner, T.R. Gordon. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycol. Res.*, (2000), 104:865-872.
- Dilkin P., P. Zorzete, C.A. Mallmann, J.D.F. Gomes, C.E. Utiyama, L.L. Oetting, et al. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets *Food and Chemical Toxicology*, (2003), 41:1345–1353T.S.
- Dix N.J. Webster J. *Fungal ecology*. Chapman and Hall, England 1995.
- Dodd, J. L. The role of plant stresses in development of corn stalk rots. *Plant Dis.* 1980, 64:533-537.
- Druzhinina I.S., V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev, C.P. Kubicek., *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success., *Nat. Rev. Microbiol.*, (2011), 9:749–759.
- Elad Y, A. Kapat., The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*., *Eur. J. Plant Pathol.*, (1999), 105: 177–189.

- Elad Y. Mechanisms of interaction between rhizosphere microorganisms and soilborne plant pathogens. In: Jensen V, Kjoller A, Sorensen LH (eds) Microbial communities in soil. Elsevier, London, 1986, pp 49–61
- Elad, Y., Kapat, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. (1999)105, 177–189.
- FAO, Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. 2003. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y1390S/y1390S00.pdf>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. El maíz blanco: un grano alimentario tradicional en los países en desarrollo. [Consultado el 1 de abril de 2014.] <ftp://ftp.fao.org/docrep/FAO/006/w2698s/w2698s00.pdf>
- Feddermann N., R. Finlay, T. Boller, M. Elfstrand, Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. Fungal Ecology, (2010) 3(1): 1–8.
- Ferreira-Castro F.L., M.R. Potenza, L.O. Rocha, B. Correa. Interaction between toxigenic fungi and weevils in corn grain samples, Food Control, (2014), 26(2):594–600.
- Ferrigo D., A. Raiola, R. Rasera, R. Causin. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. Crop Protection, (2014), 65:51–56.
- Filion M, St-Arnaud M, Fortin JA. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. New Phytol. (1999) 141: 525-533.
- Francis, R. G. and Burgess, L. W., Surveys of Fusaria and other Fungi associated with stalk rot of maize in Eastern Australia. Aust. J. Agric. Res. 1975. 26:801-
- Fravel D., C. Olivain, C. Alabouvette. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol. (2003), vol. 157: 493–502.
- Gamalero E., M.G. Martinotti, A. Trotta, P. Lemanceau, G. Berta. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions New Phytol., (2002), 155:293–300.

- Gatch E.W., G.P. Munkvold. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. *Plant Dis.*, (2002), 86:1156–1162
- Gatch, E.W. Munkvold, G.P. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. *Plant Dis.* (2002), 86:1156-1162.
- Genre A., M. Chabaud, A. Faccio, D.G. Barker, P. Bonfante. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell*, (2008), vol.20: 1407–1420.
- Genre A., M. Chabaud, T. Timmers, P. Bonfante, D.G. Barker, Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection, *Plant Cell*, (2005), 17: 3489–3499.
- Gianinazzi S., A. Gollotte, M.N. Binet, D. van Tuinen, D. Redecker, D. Wipf Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services *Mycorrhiza*, (2010), 20:519–530.
- Gianinazzi-Pearson V., A. Tahiri-Alaoui, J.F. Antoniw, S. Gianinazzi, E. Dumas. Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocyt Cell Res*, (1992), 8:177–185.
- Gianinazzi-Pearson V., E. Dumas-Gaudot, A. Gollotte, A. Tahhiri-Alaoui, S. Gianinazzi, Cellular and molecular defence-related root response to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, (1996), 133: 45–57.
- Gilchrist D.G., B. Ward, V. Moussato, C.J. Mirocha. Genetic and physiological response to fumonisin and AAL-toxin in intact tissue of a higher plant. *Mycopathologia*, (1992). vol. 117:57–64.
- Gruber S., V. Seidl-Seiboth., Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, (2012), 158:26–34.
- Harman G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet., M. Lorito. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews, Microbiology* (2004) 2:43-56.

- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* (2004), 2:43-56.
- Harrier L.A., C.A. Watson. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manag. Sci.*, (2004), 60:149–157.
- Hayek S., V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi, P. Franken. Elucidating mechanisms of mycorrhiza-induced resistance against *Thielaviopsis basicola* via targeted transcript analysis of *Petunia hybrida* genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2014), 88: 67–76.
- Hodge A. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiol. Ecol.*, (2000), 32: 91–96.
- http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/socio-demografico/SAM/2012/sam2012.pdf
- <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- IARC, International agency for research on cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements: A complete list Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, Vol 82Iarc Press, Lyon (2002) Accessed 05.11.14
<http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>
- Ibarra-Medina VA, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Lara-Hernández ME, Valdez-Carrasco J M. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Rev Mex Micol.* (2010), 31:53-63
- Javot H., N. Pumplin, M.J. Harrison. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles *Plant, Cell Environ.*, (2007), 30:310–322.
- Jones D.L, A. Hodge, Y. Kuzyakov. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.*, (2004), 163:459–480.
- Jurado M., P. Marín, N. Magan, M.T. González-Jaén. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, (2008) 74:2032–2036

- Jurgenson, J. E., K. A. Zeller, J. F. Leslie. (2002) Expanded Genetic Map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Appl Environ Microbiol.* Apr 68(4): 1972–1979.
- Kapat A., G. Zimand, Y. Elad. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (1998), 52:127–137.
- Kaya C, Ashraf M, Sonmez O, Aydemir S, Tuna AL, Cullu MA. The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Sci Hortic.* (2009), 121:1-6.
- Kedera C.J., J.F. Leslie, L.E. Claflin. Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks, *Phytopathology*, (1994), 84:603–607
- Kellerman, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, W.C.A. Gelderblom, M. Cawood, J.A.W. Coetzer. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, (1990), 57: 269–275.
- Kuldau, I.E. Yates G.A. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In C.W. Bacon, J.F. White (Eds.), *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York. . (2000) pp. 85–117.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E., Toussoun, T.A. *Fusarium spp.* from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology.* (1990). 80:343-350.
- Lioussanne L., M. Jolicoeur, M. St-Arnaud. Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biol. Biochem.*, (2008), 40:2217–2224.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* (2002). 108:597-609.
- López-Ráez J.A., T. Charnikhova, V. Gómez-Roldán, R. Matusova, W. Kohlen, R. De Vos, F. Verstappen, V. Puech-Pages, G. Bécard, P. Mulder, H.J. Bouwmeester. Tomato

- strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol.*, (2008), 178:863–874.
- Mallmann C.A., J.M. Santurio, P. Dilkin, Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B1, *Rev. Microbiol.* (1999), 30: 249–252.
- Malmierca M.G., R.E. Cardoza, N.J. Alexander, S.P. McCormick, R. Hermosa, E. Monte, S. Gutierrez. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Appl. Environ. Microbiol.* (2012), 78:4856–4868.
- Marasas W.F.O. Fumonisin: History, World-Wide Occurrence and Impact. L.S. Jackson, J.W. DeVries, L.B. Bullerman (Eds.), *Fumonisin in Food*, Plenum Press, New York *Adv. Exp. Med. Biol.* (1996), 392: 1-18.
- Marasas W.F.O., Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins*, (1995), 3:193–198.
- Marín P., N. Magan, C. Vázquez, M.T. González-Jaén. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. (2010) *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73:303–311.
- Markovich, N. A., G.L. Kononova. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: A review. *Applied Biochem Microbiol.* (2003).39-4: 341–351.
- Marschner P., K. Baumann. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. *Plant Soil*, (2003), 251: 279–289
- Martín, S., Albareda, X., Ramos, A.J., Sanchis, V. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grains. *J. Sci Food Agric.* (2001) 81: 1060-1068.
- Martínez, A. Deterioro fúngico de los alimentos e impacto económico de las micotoxinas. *Annal. Venezolanos de Nutrición* (1998)11: 37-47.

- McArthur D.A.J., N.R. Knowles. Resistance responses of potato to vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic phosphorus levels. *Plant Physiol.*, (1992), 100:341–351.
- Medina A., M. Schmidt-Heydt, D.L. Cárdenas-Chávez, R. Parra, R. Geisen, N. Magan. Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B1 and B2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *J. R. Soc. Interface*, (2013) 10:2013032.
- Melesio C.J., Preciado O.R., Terrón I.A., Vázquez C.G., Herrera M.P., Amaya G.C., Serna S.S. Potencial productivo, propiedades físicas y valor nutrimental de híbridos de maíz de alta calidad proteínica. *Agric. Téc. Méx.*. (2008).34 (2): 225-233.
- Miller, J.D. Conference Report: 6th International Working Conference on Stored-product Protection. *Australian Mycotoxin Newsletter* (1994), 5(2):1-8.
- Munkvold G.P., A.E. Desjardins. Fumonisin in maize – can we reduce their occurrence? *Plant Dis.*, (1997) 81: 556–565.
- Munkvold G.P., D.C. McGee, W.M. Carlton Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, (1997) 87: 209–217.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. (1997). 87:209-217.
- Muppa, S. Molecular detection of pathogenic *Fusarium* species in roots and stalks of maize plants with or without transgenic resistance to corn rootworm. Graduate Theses and Dissertations. (2009) Paper 10926. <http://lib.dr.iastate.edu/etd/10926>
- Nawrocka, J., U. Małolepsza Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Review Article Biological Control*, (2013),67(2):149-156
- Nelson P.E., A.E. Desjardins, R.D. Plattner, Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance, *Annual Review of Phytopathology*, (1993), 31: 233–252.
- Norred W.P., K.A. Voss. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Protection*, (1994), 57:522–527.
- Nzanzaa B., Maraisa D., Soundy P. Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. *Sci. Hort.* (2012), 144:55–59.

- Olmedo M. V., S. Casas-Flores. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture, in *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, (2014), Chapter 32:429-453.
- Oren L., S. Ezrati, D. Cohen, A. Sharon. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl Environ Microbiol*, (2003) 69:1695–1701.
- Osorio V., N. W. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake, *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* (2007) 60 (1):3621-3643.
- Parniske M., Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis, *Nature Reviews Microbiology*, (2008), 6: 763–775.
- Pittet A.. Natural occurrences of mycotoxins in food and feeds – an updated review. *Rev. Med. Vet.* (1998), 149:479–492.
- Redecker D., R. Kodner, L.E. Graham, Glomalean fungi from the Ordovician, *Science*, (2000), 289:1920–1921.
- Reino J.L., R.F. Guerrero, R. Hernandez-Galan, I.G. Collado. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*., *Phytochem. Rev.*, (2008), 7: 89–123.
- Renfro, B.L., Bhat, S. Role of wild hosts in downy mildew diseases. In D.M. Spencer, ed. *Downy mildew diseases*, New York, NY, USA, Academic Press.1981. p. 107-119.
- Rillig, M.C., Mummey, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171: 41-53.
- Rincón, A. M.; A. C. Codón; T. Benítez: Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol, Pallás, V.; C. Escobar; P. Rodríguez; J. F. Marcos (Editores). *Herramientas biotecnológicas en Fitopatología*, 2008. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- Samuels GJ. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res.* (1996), 100(8):923- 935.
- Savazzini F., C.M.O. Longa, I. Pertot, Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy *Soil Biol. Biochem.*, (2009), 41:1457–1465.

- Schirmbock M., M. Lorito, Y.L. Wang, C.K. Hayes, I. Arisanatac, F. Scala, G.E. Harman, C.P. Kubicek., Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi., *Appl. Environ. Microbiol* (1994) 60:4364–4370.
- Seidl V., I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek. A screening system for carbon sources enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). *Microbiology* (2006) 152(7):2003-2012.
- Shali A., S. Ghasemi, G. Ahmadian, G. Ranjbar, A. Dehestani, N. Khalesi, E. Motallebi, M. Vahed, *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*, *Phytoparasitica*, (2010), 38 141–147.
- Shephard G.S., L. Van Der Westhuizen, P.G. Thiel, W.C.A. Gelderblom, W.F.O. Marasas, D.J. Van Schalkwyk. Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. *Toxicon*, 34 (1996), pp. 527–534.
- Shoresh M., G.E. Harman, F. Mastouri Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents *Annu. Rev. Phytopathol.*, (2010) 48:21–43.
- Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press. 2008.
- Smith, D.R. White, D.G. Diseases of corn. In G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, Madison, WI, USA, American Society of Agronomy. 3rd ed., 1988. p. 687-766.
- Solano-Báez A. R., C. De León-García De Alba, G. Valdovinos-Ponce, H. V. Silva-Rojas, L Soto-Rojas. La pigmentación de *fusarium verticillioides* (sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. *Agron. Mesoam.* (2011), 22(2):297-307.
- Sood S.G.. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular–arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, (2003), 45:219–227.
- Steinkellner S., V. Lenzemo, I. Langer, P. Schweiger, T. Khaosaad, J.P. Toussaint, H. Vierheilig. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant–fungus interactions. *Molecules*, (2007), 12:1290–1306.

- Stockmann-Juvala H, Savolainen K.. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Hum Exp Toxicol.* (2008), 27(11):799-809.
- Tilman, D., K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor., S. Polasky. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* (2002). 418: 671-677
- Torres-Sánchez L., López-Carrillo L. Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud pública México*, (2010), 52(5):461-467.
- Van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* (2008),. 11: 296–310.
- Verma M., S.K. Brar, R.D. Tyagi, V. Sahai, D. Prévost, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli. Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity, *Enzyme Microb. Technol.*, (2007), 41:764–771,
- Vicedo B., V. Flors, M.D. Leyva, I. Finiti, Z. Kravchuk, M.D. Real, P. Garcia-Agustin, C. Gonzalez-Bosch. Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, (2009), 22:1455–1465.
- Vierheilig H., S. Lerat, Y. Piche. Systemic inhibition of arbuscular mycorrhiza development by root exudates of cucumber plants colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, (2003), 13:167–170.
- Vierheilig H., S. Steinkellner, T. Khaosaad, J.M. Garcia-Garrido. The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza*, Springer, Berlin, Heidelberg (2008), pp. 307–320.
- Vinale F., E.L. Ghisalberti, K. Sivasithamparam, R. Marra, A. Ritieni, R. Ferracane, S. Woo, M. Lorito., Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens., *Lett. Appl. Microbiol.*, (2009), 48:705–711.
- Vinale F., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, M.J. Barbetti, H. Li, S.L. Woo, M. Lorito, A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (2008), 72:80–86.

- Vosa C.M., Y. Yanga, B. De Conincka, B.P.A. Cammuea. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*. (2014) 74: 65–81.
- Wainwright M. 1992. The impact of fungi on environmental biogeochemistry. In: Carrol GC, Wicklow DT (eds) *The fungal community*. Dekker, New York, pp 601–618.
- Wamberg C., S. Christensen, I. Jakobsen, A.K. Muller, S.J. Sorensen. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*) *Soil Biol. Biochem.*, (2003), 35:1349–1357.
- Wang B., Y.L. Qui, Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants, *Mycorrhiza*, (2006), 16: 299–363.
- Wellman, F.L. *Tropical American plant disease (neotropical phytopathology problems)*. 1972. NJ, USA, The Scarecrow Press.
- Whipps, J.M. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot* (2004), 82: 1198–1227.
- Wilke A.L., C.R. Bronson, A. Tomas, G.P. Munkvold. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Dis.*, (2007) 91:1109–1115.
- Woo-Jin J., Ju-Hee Kuk, Kil-Yong Kim, Ki-Chul Jung, Ro-Dong Park, Purification and characterization of exo- β -d-glucosaminidase from *Aspergillus fumigatus* S-26 *Protein Expression and Purification*, (2006), 45(1): 125-131.

CAPÍTULO II

ANTAGONISMO *in vitro* DE CUATRO AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* A PATÓGENOS DE MAÍZ Y SU PRODUCCIÓN DE INDOLES TOTALES

RESUMEN

Fusarium es un grupo complejo de especies cosmopolita que habita suelo, rizosfera, restos vegetales, e incluye cepas patógenas y no patógenas, lo que los hace difícil de controlar. Este estudio seleccionó y caracterizó la actividad antagónica de cuatro aislamientos de *Trichoderma* hacia patógenos de maíz, y evaluó su capacidad para producir índoles totales como posible mecanismo promotor del crecimiento vegetal. En este bioensayo se utilizaron cuatro aislamientos de *Trichoderma* (*T. viride*1, *T. viride* 2, *T. virens* y *T. harzianum*) y cinco aislamientos patógenos (*Phytium*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium subglutinas* y *Fusarium verticilliodes*). Los resultados se muestran contrastantes, ya que la interacción entre cepas de *Trichoderma* y los aislamientos patógenos difiere en el mecanismo de inhibición. La mayoría de los confrontamientos de *Trichoderma* mostró inhibición hacia *Fusarium* por posible antibiosis. Los cuatro aislamientos de *Trichoderma* presentaron la capacidad de producción de índoles, siendo *T. viride* 2 la cepa con mayor producción de índoles con 55.0 µg mL⁻¹. Como conclusión, la competencia es un mecanismo clave para el biocontrol de patógenos en condiciones *in vitro* entre *Trichoderma* y especies como *Fusarium* sp.; además, las cepas de *Trichoderma* producen índoles como mecanismo para promover el crecimiento vegetal.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Fusarium*, antibiosis, ácido indol-acético

CHAPTER II

In vitro ANTAGONISM OF FOUR ISOLATES OF *Trichoderma* TOWARDS MAIZE PATHOGENS, AND TOTAL INDOLE PRODUCTION

ABSTRACT

Fusarium is a complex cosmopolite group that includes pathogenic and non-pathogenic species which inhabit soil, rhizosphere, plant residues, and are difficult to control. This study selected and characterized the antagonistic capability of four *Trichoderma* isolates towards maize pathogens, and evaluated their ability to produce total indole as possible mechanism of plant growth promotion. This bioassay utilized four isolates of *Trichoderma* (*T. viride* 1, *T. viride* 2, *T. virens* and *T. harzianum*), and five pathogen isolates (*Phytium*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium subglutinas* and *Fusarium verticillioides*). Results showed that the interaction between *Trichoderma* strains and the pathogens had variations in their mechanism of inhibition. Most of the confrontations resulted in antibiosis that caused growth inhibition of *Fusarium* by *Trichoderma*. The four *Trichoderma* isolates produced total indoles, and *T. viride* 2 was the isolated with the highest total indoles production (55.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As conclusion, fungal competition is a key mechanism that influences in the biocontrol of pathogens under *in vitro* conditions as shown between *Trichoderma* and *Fusarium* species; in addition, *Trichoderma* species produced indoles as a potential mechanism for promoting the plant growth.

Key words: *Trichoderma*, *Fusarium*, antibiosis, indol-acetic acid,

2.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por el suelo disminuyen significativamente la calidad y la cantidad de producción en plantas ornamentales, hortícolas y forestales. La mayoría de los agentes patógenos son hongos ubicuos polífagos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, así como especies de *Phytophthora* y *Pythium* (Álvarez *et al.*, 2007). Las condiciones ambientales, tales como alta humedad, tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, entre otros, a menudo promueven la aparición y diseminación de patógenos en el suelo; además, el manejo de la enfermedad a menudo se basa en la aplicación de fungicidas como fumigantes para el tratamiento de suelos, y para la prevención de enfermedades foliares y de tallo (Aleandri *et al.*, 2015). La creciente demanda mundial de alimentos, fibras y de bioenergía, requiere del uso eficiente de los recursos finitos, el cual representa un desafío clave para la sostenibilidad de la industria agrícola (Pereg *et al.*, 2015).

Es muy difícil determinar la eficacia de los bioinoculantes comerciales que se reivindican para promover la sanidad de la planta; muchos de microorganismos utilizados solos y en combinación, son requeridos para promover el rendimiento de los cultivos, pero en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos responsables de estos efectos benéficos (Owen *et al.*, 2015).

Las especies de *Trichoderma* colonizan las raíces de plantas, formando parte de la microbiota rizosférica, y que tiene efectos benéficos sobre la planta, influyendo en la protección contra enfermedades, en el crecimiento y en el rendimiento (Berg, 2009; Raaijmakers *et al.*, 2009; Berendsen *et al.*, 2012; Aleandri *et al.*, 2015). La importancia de la microbiota de la raíz en la sanidad vegetal se ve subrayada por evidencia experimental,

en la que las plantas controlan la composición de su microbiota a nivel de rizosfera (Hartmann *et al.*, 2009). El potencial de control de las especies de *Trichoderma* hacia los agentes causales de enfermedades transmitidas por el suelo, ha suscitado considerable interés en la investigación en las últimas décadas (Hermosa *et al.*, 2012). Algunas especies de *Trichoderma* aumentan el potencial de crecimiento de la planta, la absorción de nutrientes, la eficiencia del uso de fertilizantes, el porcentaje y la tasa de germinación de las semillas, además de estimular las defensas de las plantas (Shoresh *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012, Pereg *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la selección de agentes de control biológico debe considerar la eficacia hacia el patógeno junto con las condiciones en las que estos agentes expresen su potencial de control o inhibición. Otro aspecto a considerar es el impacto de la aplicación de una cepa antagonista sobre las comunidades microbianas nativas del suelo diferentes al microorganismo objetivo (Brimner y Boland, 2003; Cordier y Alabouvette, 2009). Este estudio se realizó para seleccionar y caracterizar la actividad antagónica de cuatro aislamientos de *Trichoderma* hacia patógenos de maíz, y evaluar su capacidad para producir índoles totales.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislamientos de *Trichoderma* se obtuvieron de la colección de hongos del Área de Microbiología de Suelos, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (Ibarra-Medina *et al.*, 2010): *T. virens* (CP-1), *T. viride*, (CP-4), *T. harzianum* (CP-38), y *T. viride* (CP-56). Los microorganismos patógenos se proporcionaron por el Dr. John Larsen (*Phytophthora* y *Fusarium oxysporum*), y por la Dra. Dolores Briones Reyes (*Gibberella moniliformis*, *Fusarium subglutinans*, y *Fusarium verticillioides*).

Cultivos duales

Cada uno de los microorganismos se sembraron y conservaron en cajas petri que contenían PDA (papa-dextrosa-agar). Las pruebas de confrontación se realizaron inoculando en cajas petri con PDA, un disco de agar (0.5 cm de diámetro) con micelio de cada uno de los patógenos, en uno de los extremos, y dejándolos crecer por 48 h a 28 °C ±1. Una vez obtenidos los patógenos establecidos se inocularon de lado opuesto un disco de agar (0.5 cm de diámetro) con micelio correspondiente a cada *Trichoderma* a evaluar. Las cajas con las confrontaciones fúngicas se incubaron durante 10 días a 28 °C ±1, y se evaluó el tipo de antagonismo presentado por cada aislamiento de *Trichoderma* (antibiosis, competencia y/o micoparasitismo) considerando como positivo o negativo para cada uno de los parámetros.

Diseño experimental

Se estableció un experimento factorial 5 x 5, contemplando cinco niveles de *Trichoderma* (Testigo, *T. virens*, *T. viride* 1, *T. harzianum* y *T. viride* 2) y seis niveles de inoculación de patógeno (testigo, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium subglutina*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium sp.*, *Phytium ultivo*). Se obtuvieron 16 combinaciones, y cada tratamiento consistió de tres repeticiones, teniendo un total de 48 unidades experimentales.

Microscopia de Ridell

Para observar las diferentes interacciones entre los antagonistas y los patógenos, se realizó la técnica de microcultivo de Ridell (Ibarra-Medina *et al.*, 2010). Con un sacabocados se cortaron en pequeñas porciones de PDA de un centímetro de diámetro, cada disco fue puesto sobre un portaobjetos, inoculando el patógeno y *Trichoderma* de lado opuesto. Una vez inoculados se colocó un cubreobjetos sobre el disco de PDA, y se colocaron sobre un tubo de vidrio en ángulo contenido en una caja petri estéril,

posteriormente, se agregó 10 mL de solución de glicerol al 10% para promover la humedad al sistema. Después de 4 días de incubación, a temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$), se retiró la solución de glicerol al 10 %, y se agregó una solución de formaldehído al 10% durante dos horas. Las preparaciones se montaron en lactofenol y PVL+Melzer (Ibarra-Medina *et al.*, 2010), lo que permitió conservar más tiempo las preparaciones para su evaluación y observación al microscopio. Las muestras se observaron en el microscopio de campo claro OLYMPUS BX51, tomando fotos digitales con una cámara Evolución VF, adaptada al microscopio.

Determinación de producción de índoles totales

La determinación de índoles se realizó colocando cinco rodajas de PDA+micelio del *Trichoderma* (0.5 cm diámetro) en medio líquido de Luria-Bertani (Anexo 1), y se incubaron por 48 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en agitación constante. Pasado el tiempo cada muestra se centrifugó por 15 minutos a 5000 rpm. Se tomaron 100 μL de reactivo de Salkowski (Anexo 2) donde la muestra se mantuvo en oscuridad por 30 min para su reacción. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 530 nm (Biotek, modelo synergy 2. Multi-mode microplate reader). Para determinar la concentración de índoles totales se utilizó la curva estándar (Figura 2.1).

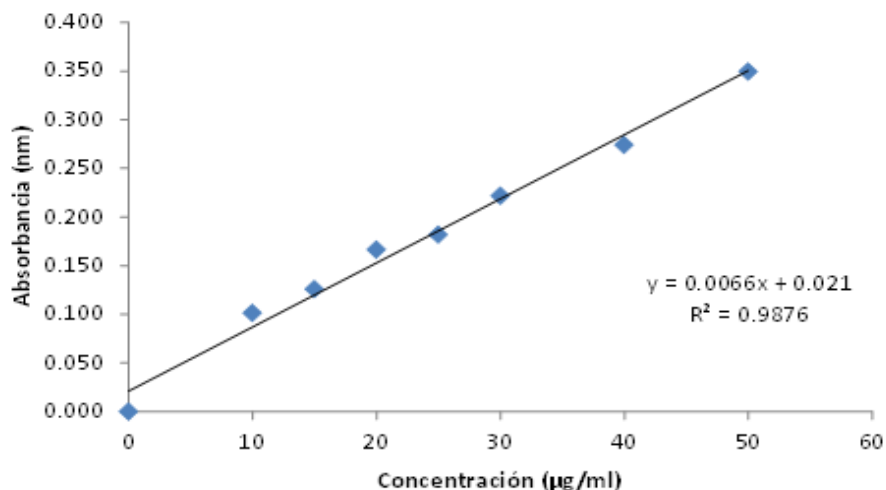


Figura 2.1 Curva estándar utilizadas para la determinación de índoles totales.

2.3 RESULTADOS

Las confrontaciones de cultivos duales de *Trichoderma* con los hongos patógenos mostraron que los aislamientos pertenecientes a *Fusarium* presentaron un proceso de inhibición en el crecimiento radial de *Trichoderma*, lo que no permitió la colonización de micelio de *Trichoderma* al 100% en los primeras 72 h. Tampoco se observó micoparasitismo de *Trichoderma* en los aislamientos de *Fusarium*. Este comportamiento puede ser categorizado por competencia por interferencia el cual sucede cuando un individuo interfiere directamente en la obtención de alimento, supervivencia, reproducción de otros por medio actos de agresión o de otro tipo, o cuando directamente impide su establecimiento en una porción del hábitat (Wicklów, 1981). Sin embargo, en algunos casos las confrontaciones como las de *T. virens* en combinación con *Fusarium* treparon las paredes de la caja Petri, colonizando de manera aérea.

Los aislamientos restantes de *Trichoderma* mostraron el avance del micelio de manera frontal logrando vencer la barrera antibiótica de los patógenos. Además, no se

presentó abundante esporulación o crecimiento algodonoso en algunas confrontaciones típicas de los antagonistas; esto pudiera ser por las secreciones de metabolitos por parte del micelio del patógeno que no dejó crecer completamente a los cuatro aislamientos de *Trichoderma* (Figura 2.2).

Los cuatro aislamientos de *Trichoderma*, una vez que traspasaron la barrera bioquímica de cepas de *Fusarium*, lograron crecer y esporular sobre su micelio (Figura 2.2).

Las confrontaciones de *Trichoderma* con algunos patógenos no presentaron abundante esporulación o crecimiento algodonoso durante el tiempo evaluado. Lo anterior puede deberse por la secreción de metabolitos por el micelio del patógeno que no dejó crecer completamente a *Trichoderma* (Figura 2.2).

Todos los aislamientos de *Trichoderma* presentaron micoparasitismo hacia *Phythium ultimum* (Figura 2.3). Los resultados obtenidos en las pruebas de microscopía de Ridell de *Fusarium subglutinans* en confrontación con los cuatro aislamientos de *Trichoderma* se observa que no presenta contacto físico de hifas entre los hongos, y que la principal forma de antagonismo es bioquímico (Figura 2.3).

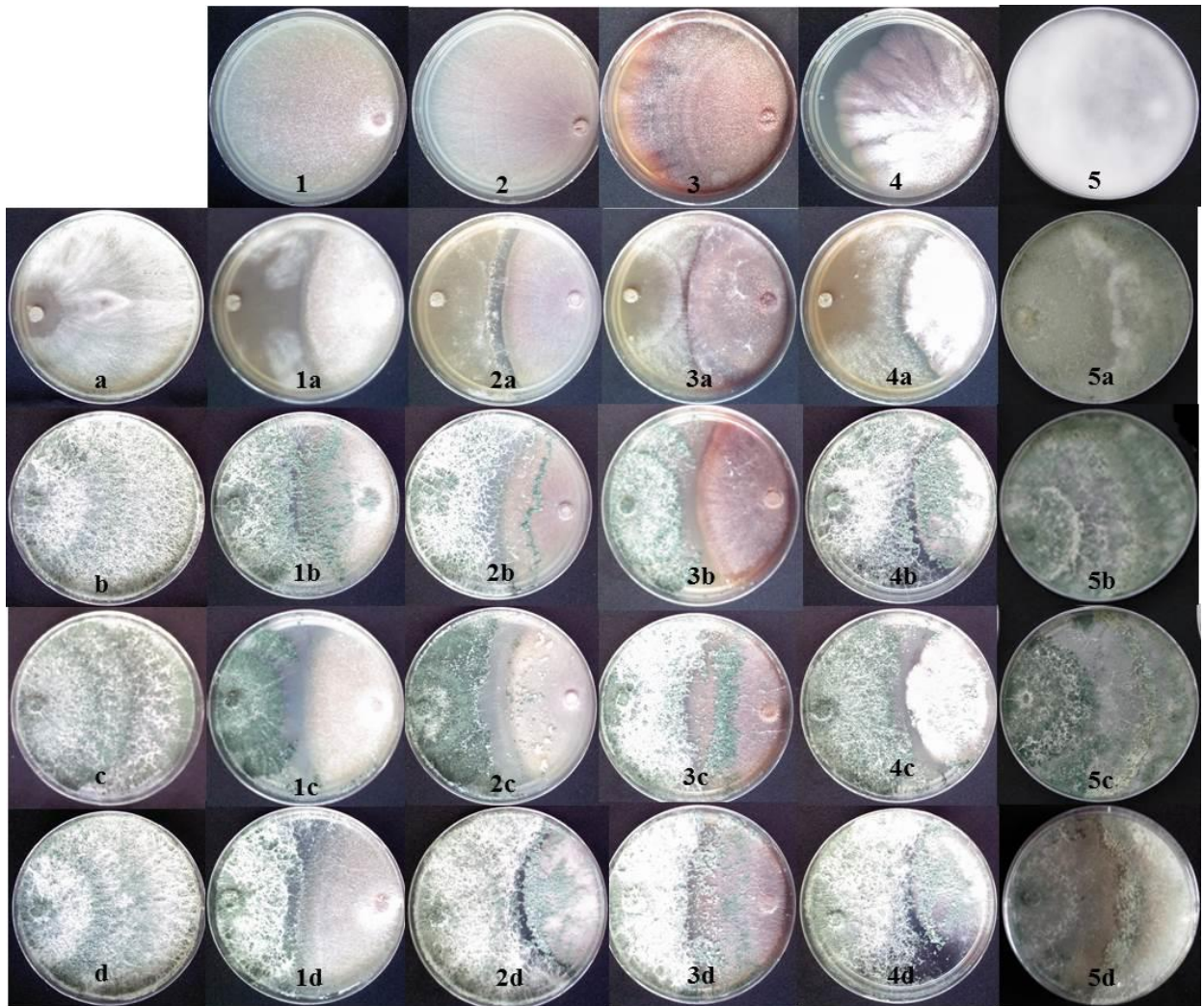


Figura 2.2. Evaluación de micoparasitismo en cultivos duales de cuatro aislamientos de *Trichoderma* (a: *T. virens*, b: *T. viride* 1, c: *T. harzianum*, d: *T. viride* 2) y cinco patógenos (1: *Gibberella moniliformis*, 2: *Fusarium subglutina*, 3: *Fusarium verticillioides*, 4: *Fusarium* sp., y 5: *Phytium ultimum*).

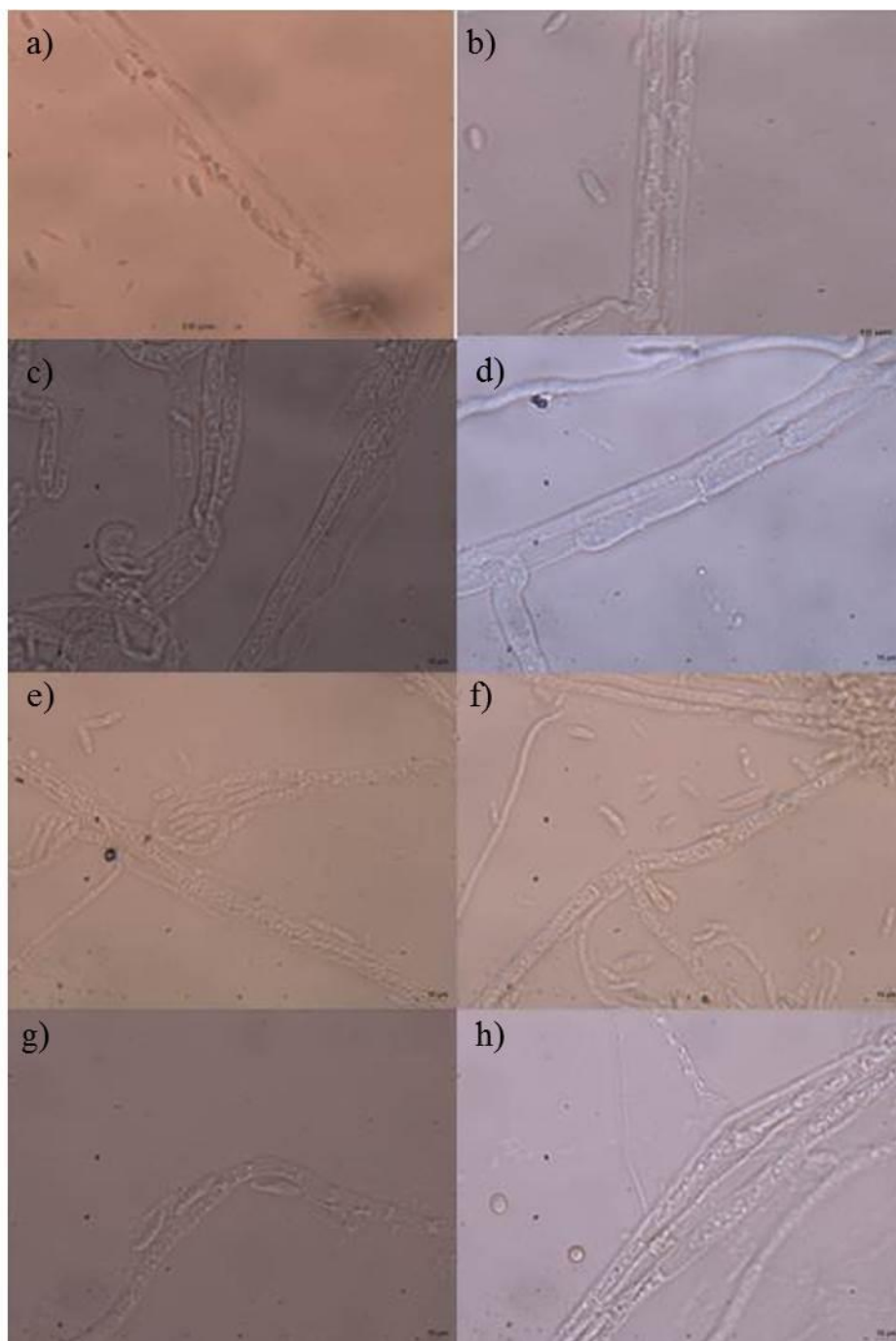


Figura 2.3. Microscopia de Ridell de *Fusarium subglutinans* y cuatro aislamientos de *Trichoderma*; Donde: a y b, *F. subglutinans* + *T. virens*., c y d, *F. subglutinans*+*T viride* 1., e y f, *F. subglutinans*+*T. harzianum*., g y h, *F. subglutinans*+*T. viride* 2. (Fotografías tomadas a 40X).

Producción de índoles totales. La producción de índoles totales por parte de los aislamientos de *Trichoderma*, demostró que *T. viride 2* fue la cepa que mayor producción de índoles con $55.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, y *T. viride 1* con $42.8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, la producción de índoles totales por parte de la bacteria *Pseudomonas tolaasii* presentó los valores más altos ($66.88 \mu\text{g mL}^{-1}$) en comparación con la de cualquier cepa de *Trichoderma* probada en este estudio (Figura 2.4).

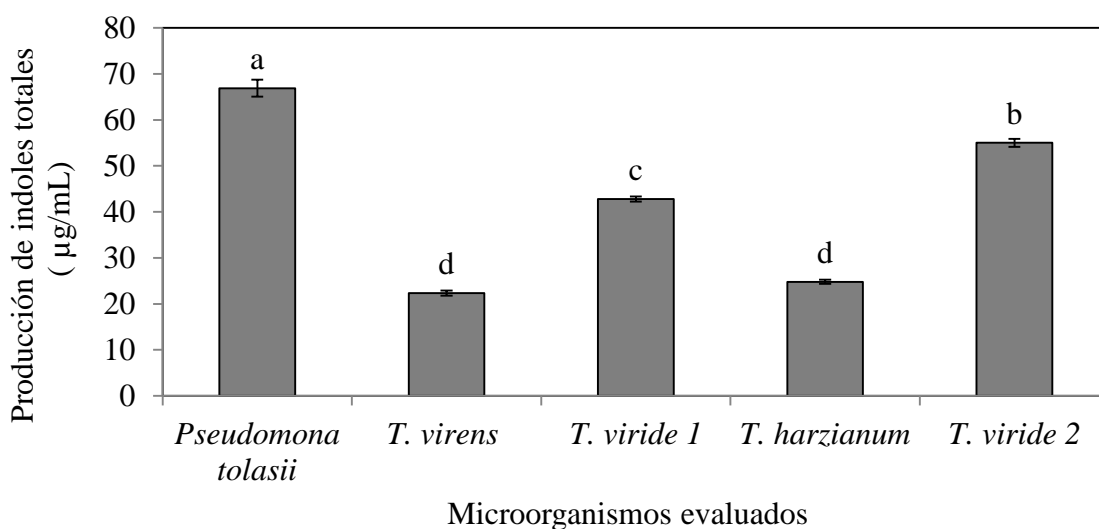


Figura 2.4. Producción de índoles totales de cuatro aislamientos de *Trichoderma* (*T. virens*, *T. viride 1*, *T. harzianum* y *T. viride 2*), en comparación de un aislamiento bacteriano productor de AIA (*Pseudomonas tolaasii*). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$ n=4)

2.4 DISCUSIÓN

Las variaciones que se encontraron en la inhibición del crecimiento del micelio que fueron causadas por las cepas antagónicas de *Trichoderma* sp., indican que entre estos aislamientos, hay diferencias fisiológicas. Estas variaciones pueden ser debidas a los mecanismos que están implicados en la actividad antagónica hacia cada uno de los diferentes patógenos (Aleandri *et al.*, 2015). Los mecanismos que utilizan las especies de *Trichoderma* que se relacionan con el control biológico son muchas y complejas, y su efecto varía con el tipo de *Trichoderma* y la especie de planta, y con el patógeno con el que están involucrados (Howell, 2003; Marzano *et al.*, 2013; Subhani *et al.*, 2013).

Phythium ultimum fue el hongo patógeno más sensible ante todos los aislamientos de *Trichoderma* evaluados, lo que confirma la sensibilidad de este patógeno a estos antagonistas (Harman *et al.*, 2004).

Los aislamientos patógenos ejercieron una inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma*, y que puede estar relacionado con la secreción de compuestos volátiles y no volátiles, indicando la coevolución de ambos grupos microbianos por subsistir uno del otro, teniéndose mecanismos implicados en la inhibición de *Trichoderma* por parte de *Fusarium* (Subhani *et al.*, 2013; Aleandri *et al.*, 2015). La competencia entre los microorganismos se produce cuando un factor vital, tales como nutrientes o espacios, está disponible en cantidad limitada; bajo estas condiciones limitantes, la producción de compuestos inhibidores capaces de detener o disminuir el crecimiento de otros microorganismos, confiere una ventaja ecológica sobre los competidores (Bolwerk *et al.*, 2003, Karlovsky, 2008). Esta forma particular de competencia agresiva, se ha referido como competencia por interferencia (Karlovsky, 2008). En este sentido, los metabolitos antifúngicos reportados para especies de *Fusarium* sp., pueden considerarse como armas químicas que utilizan para

mejorar la supervivencia y la prevalencia del patógeno sobre el agente de biocontrol. Los miembros de *Fusarium* son especies complejas y son conocidas para sintetizar una serie de compuestos biológicamente activos, algunos de estos metabolitos se han reconocido por tener un papel en la patogénesis de la planta y son considerados como fitotoxinas, o bien como micotoxinas potencialmente dañinas para los seres humanos y los animales; algunos otros metabolitos muestran una variedad de actividades biológicas, incluyendo la actividad antimicrobiana (Desjardins, 2006). En particular, eniatina (EN), beauvericina (BEA) y ácido fusárico (FA) son tres metabolitos de origen natural de especies de *Fusarium* (Desjardins, 2006; El-Hasan *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2008; Meca *et al.*, 2010; Wang y Xu, 2012).

El nivel de control de enfermedades causadas por *F. oxysporum* por cepas de biocontroladores como *Trichoderma* spp., se ha encontrado ser inadecuado o inconsistente, y se sabe que una cepa en particular de *Trichoderma* puede ser diferencialmente eficaz contra diferentes patógenos de las plantas es concebible que las diferencias en la eficacia de una cepa particular contra diferentes patógenos, lo anterior indicaría su potencial para expresar diferentes mecanismos de acción (Harman, 2000 y Howell, 2003),.

El control de enfermedades por *Trichoderma* se ha asociado con la producción de antibióticos, hay evidencia correlativa que la competencia puede jugar un papel importante en la interacción de *Trichoderma* contra *F. oxysporum* (Segarra *et al.*, 2010, Kima *et al.*, 2013). Por lo tanto, es concebible que el bajo nivel de biocontrol hacia *Fusarium* puede ser debido a la baja actividad competitiva de algunas especies de *Trichoderma* (Dubey *et al.*, 2007).

Las cepas de *Trichoderma* han presentado la capacidad para promover el crecimiento y rendimiento del cultivo, mediante el aumento de la absorción de nutrientes, o

bien por la producción de factores de crecimiento como al ácido indol-acético (AIA) (Harman, 2011; Shores *et al.*, 2010).

Este trabajo demostró que tanto *Pseudomonas tolaassi* y *T. viride* 2, producen mayores cantidades de índoles en medio de cultivo líquido. La importancia de la producción de AIA por parte de microorganismos como *Trichoderma*, radica en que se ha reportado el papel de AIA en la iniciación y crecimiento lateral de raíces adventicias, así como en el desarrollo de brotes, ya que influye en la división celular, la expansión y diferenciación celular de las plantas (Chowdappa *et al.*, 2013). Vessey (2003) menciona que la producción de AIA estimula la captación de nutrientes en el suelo, siendo una característica deseable en microorganismos de biocontrol.

2.5 CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren la importancia de la competencia de los microorganismos durante el control biológico, y en este caso bajo condiciones *in vitro*.

Por lo que se concluye que la actividad antagónica de las cuatro cepas de *Trichoderma* evaluadas, presentan diferentes niveles de antagonismo con respecto al patógeno confrontado, lo anterior indicaría su potencial para expresar diferentes mecanismos de acción.

Las cepas de *Trichoderma* además, de presentar antagonismo a los patógenos de maíz, proporcionan un estímulo de crecimiento por la producción de AIA.

2.6 LITERATURA CITADA

- Aleandri M. P., G. Chilosi, N. Bruni, A. Tomassini, A. M. Vettraino, A. Vannini. Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection*, (2015), 67:269–278.
- Álvarez L.A., A. Pérez-Sierra, J. Armengol, J. García-Jiménez. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates causing collar and root rot of lavender and rosemary in Spain. *J. Plant Pathol.*, 2007, Vol.89:251–254.
- Berg G.. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 84:11–18.
- Bolwerk A., A.L. Lagopodi, A.H. Wijfjes, G.E. Lamers, T.F. Chin-A-Woeng, B.J. Lugtenberg, G.V. Bloemberg, Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, (2003), 16:983–993.
- Brimner T.S., G.J. Boland, A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases, *Agric. Ecosyst. Environ.*, (2003), 100:3–16.
- Chowdappa P., S.P. Mohan Kumar, M. Jyothi Lakshmi, K.K. Upreti. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*, (2013), 65(1):109–117
- Cordier C., C. Alabouvette, Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non target soil micro-organisms, *Eur. J. Soil Biol.*, 2009, 45: 267–274.
- Desjardins A.E., *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology*. APS Press, St. Paul, MN, USA (2006).
- Dubey S.C., M. Suresh, B. Singh. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control*, (2007), 40:118–127.

- El-Hasan A., F. Walker, H. Buchenauer, *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. J. Phytopathol., (2008), 156:79–87
- Gravel V., H. Antoun, R.J. Tweddell, Growth stimulation and fruit yield improvement of green house tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA), Soil Biology & Biochemistry, (2007), 39: 1968–1977.
- Gwan K. T., G. R. Knudsen, Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. pisi, Applied Soil Ecology, (2013), 68:57-60
- Harman G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts, Nat. Rev. Microbiol., (2004), 2: 43–56
- Harman G.E., Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22, Plant Dis., (2000), 84:377–393
- Hartmann A., M. Schmid, D. Van Tuinen, G. Berg, Plant-driven selection of microbes, Plant Soil, (2009), 321: 235–257
- Hermosa R., A. Viterbo, I. Chet, E. Monte, Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes, Microbiology, (2012), 158:17–25.
- Howell C.R., Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts, Plant Dis., (2003), 87:4–10
- Ibarra-Medina VA, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Lara-Hernández ME, Valdez-Carrasco J M. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Rev Mex Mic. (2010), 31:53-63
- Karlovsky P., Secondary metabolites in soil ecology, P. Karlovsky (Ed.), Secondary Metabolites in Soil Ecology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany (2008), pp. 1–19.
- Kima T. G., G. R. Knudsen Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. pisi, Applied Soil Ecology, (2013), 68: 57–60.

- Marzano M., A. Gallo, C. Altomare, Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid, *Biological Control*, (2013), 67(3):397–408
- Meca G., J.M. Soriano, A. Gaspari, A. Ritieni, A. Moretti, J. Mañes, Antifungal effects of the bioactive compounds enniatins A, A1, B, B1, *Toxicon*, (2010), 56:480–485
- Owen D., A.P. Williams, G.W. Griffith, P.J.A. Withers, Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition, *App. Soil Ecol.*, (2015), 86: 41–54.
- Pereg L., M. McMillan, Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems, *Soil Biol. Biochem.*, (2015), 80:349–358.
- Raaijmakers J.M., T.C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette, Y. Moëgne-Loccoz, The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms, *Plant Soil*, (2009), 321: 341–361
- S.W. Son, H.Y. Kim, G.J. Choi, H.K. Lim, K.S. Jang, S.O. Lee, S. Lee, N.D. Sung, J.C. Kim, Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*, *J. Appl. Microbiol.*, (2008), 104:692–698
- Segarra G., E. Casanova, E. Avilés, I. Trillas, *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron, *Microb. Ecol.*, (2010), 59:141–149
- Shoresh M., G.E. Harman, F. Mastouri, Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents, *Annu. Rev. Phytopathol.*, (2010), 48:21–43.
- Subhani M. N., S. T. Sahi, , L. Ali, S. Hussain, J. Iqbal, N. Hussain, Management of Chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporium* f. sp. *ciceris* through antagonistic microorganisms. *Canadian Journal of Plant Protection*. (2013), 1(1): 1-6.
- Vessey J.K., Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil*, (2003), 255:571–586.
- Wang Q., L. Xu, Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, (2012), 17: 2367–2377.

Wicklow D.T., Interference competition, G.C. Carroll, D.T. Wicklow (Eds.), *The Fungal Community - Its Organization and Role in the Ecosystem* (Second Ed.), Marcel Dekker, New York, NY, USA (1992), pp. 265–274.

CAPÍTULO III

COMPATIBILIDAD DE *Glomus intraradices* CON CUATRO ESPECIES

DE *Trichoderma* EN PLANTAS DE MAÍZ

RESUMEN

Los hongos como *Trichoderma* y hongos micorrízicos arbusculares pueden favorecer la absorción de nutrientes y el crecimiento vegetal; sin embargo, su interacción y beneficio en las plantas han sido escasamente evaluados. La presente investigación evaluó la compatibilidad de *Glomus intraradices* (Gi) con cuatro cepas de *Trichoderma* y sus efectos en plantas de maíz en condiciones de invernadero durante 58 días. El peso seco total no mostró diferencias significativas por la inoculación de los microorganismos (3.8 a 4.2 g) en comparación con las plantas no inoculadas (4.0 g); sin embargo, las plantas inoculadas con *T.harzianum* mostraron mayor peso seco de follaje y área foliar. En contraste, el volumen radical fue significativamente menor en las plantas inoculadas con Gi en combinación con las cepas de *Trichoderma*, particularmente con *T.virens*, en comparación con el control. El contenido de P foliar, no mostró efectos significativos por los microorganismos; sin embargo, el contenido de N fue significativamente mayor en la combinación Gi+*T.virens*. Las plantas inoculadas con Gi+*T.harzianum* mostraron una colonización micorrízica de 75% y 1,817 UFC de *Trichoderma* x 10 g⁻¹ de suelo, valores que fueron mayores a las plantas inoculadas con ambos microorganismos de manera independiente. En contraste, las plantas Gi+*T.virens* y Gi+*T.viride* 1 presentaron menor colonización micorrízica (48 y 44 %, respectivamente), y menor UFC de *Trichoderma* (1.32 y 0.81 UFC 10 g⁻¹, respectivamente). Las especies de *Trichoderma* tienen efectos diferenciales en el crecimiento de plantas inoculadas con Gi. Los resultados sugieren que ambos microorganismos pueden ser inoculados conjuntamente, pero algunas combinaciones, pueden beneficiar directamente a las plantas de maíz en corto plazo.

Palabras clave: *maíz criollo, micorriza arbuscular, hongo filamentoso, interacciones microbianas*

CHAPER III

COMPATIBILITY BETWEEN *Glomus intraradices* AND FOUR *Trichoderma* STRAINS ON MAIZE PLANTS

ABSTRACT

Trichoderma and arbuscular mycorrhizal fungi favor nutrient uptake and plant growth, but their interactive effects on plant benefits have scarcely studied. Thus, the present research evaluated the compatibility of *Glomus intraradices* (Gi) with four *Trichoderma* strains on the growth of maize plants under greenhouse conditions, during 58 days. Total dry weight did not show significant differences due to the inoculation of both microorganisms (3.8 to 4.2 g) when compared to control plants (4.0 g); nevertheless, plants with *T. harzianum* had high leaf dry weight and leaf area. In contrast, root volume was significantly low in plants inoculated with Gi when combined with *Trichoderma* strains, particularly with *T. virens*, with respect to the control. Leaf P-content did not show significant effects due to the microorganisms; however, the N-content was significantly high in plants with Gi+*T. virens*. Plants with Gi+*T. harzianum* had 75% of mycorrhizal colonization, and 1,817 UFC of *Trichoderma* x 10 g⁻¹ of soil, these values were higher than those obtained in plants with the single inoculation of each microorganism. In contrast, plants with Gi+*T. virens* and Gi+*T. viride* 1 had the lowest mycorrhizal colonization (48 and 44 %, respectively) and *Trichoderma* population (1.32 and 0.81 UFC 10 g⁻¹, respectively). *Trichoderma* strains had differential effects on plant growth when inoculated with Gi. Results suggest that both microorganisms may be jointly inoculated, both some combinations may result on short term beneficial effects on the growth of maize plants.

Key words: *criollo maize, arbuscular mycorrhiza, filamentous fungus, microbial interactions*

3.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz es fundamental para la alimentación en México, cuya producción en 2013 fue de 35'325,272.75 ton (SIAP, 2014). Sin embargo, esta producción es afectada por múltiples factores, destacando la incidencia y severidad de plagas y enfermedades (FAO 2014; Phillips, 2014; Briggs, 2009), cuyo control se fundamenta en la aplicación de métodos químicos que impactan en costos económicos y ambientales (Dalgaard *et al.*, 2003; Tilman *et al.*, 2002). La biotecnología propone la aplicación de alternativas naturales como parte de prácticas agrícolas convencionales, tales como la inoculación de microorganismos capaces de ejercer efectos de control biológico de plagas y enfermedades (Martínez-Medina *et al.*, 2011; Arriola *et al.*, 2000; Benbrook, 1991).

Las tendencias recientes de la microbiología del suelo sugieren que los inoculantes fúngicos como *Trichoderma* y como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tienen el potencial para mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Nzanzaa *et al.*, 2012; Martínez-Medina *et al.*, 2011), ya que estos microorganismos forman asociaciones benéficas con la mayoría de las plantas (Smith y Read, 2008). La importancia de estos dos tipos de hongos se fundamenta por favorecer la absorción y asimilación de nutrientes, y por promover el crecimiento vegetal, además de contribuir como agentes de control biológico, y mejorar la calidad biológica del suelo (Nzanzaa *et al.*, 2012; Egberongbe *et al.*, 2012; Martínez-Medina *et al.*, 2011; Kaya *et al.*, 2009; Van der Heijden *et al.*, 2008; Cardoso y Kuyper, 2006; Rillig y Mummey, 2006; Whipps, 2004).

Algunos estudios indican que la compatibilidad de HMA y *Trichoderma* muestra variaciones en función de las condiciones de cultivo, además de que los aislamientos

fúngicos tienen dificultades para establecerse en la raíz, lo que representa variaciones en su efectividad biológica (Egberongbe *et al.*, 2012). Ambos microorganismos representan una alternativa biotecnológica para reducir la aplicación de insumos químicos en los sistemas agrícolas, a la vez de promover el crecimiento y la producción de plantas de interés agrícola. Sin embargo, se requiere la selección de microorganismos compatibles para favorecer su adaptabilidad y efectividad biológica.

Por lo anterior, el presente trabajo evaluó los efectos a corto plazo, de cuatro cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. virens* y dos cepas de *T. viride*) en el establecimiento de HMA (*Glomus intraradices*) en plantas de maíz, para probar la hipótesis de que las especies de *Trichoderma* son compatibles con *Glomus intraradices* de tal forma que se pueden inocular de manera conjunta para favorecer el crecimiento y nutrición de maíz.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas se obtuvieron por la técnica de cebo, a partir de diversos suelos agrícolas, previa selección por su capacidad micoparasítica hacia cepas de *Sclerotinia* sp. y *Fusarium* sp. (Ibarra-Medina *et al.*, 2010). La cepa de *Glomus intraradices* (Gi) se proporcionó por el Corporativo de Desarrollo Sustentable S.A. de C.V. de Morelia, Michoacán.

El material de maíz correspondió al híbrido NB9 de la empresa NOVASEM[®], grano semicristalino blanco, que presenta características de ciclo intermedio (125-130 días a madurez y 180-185 días a cosecha de grano). Las semillas de maíz se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos en agitación constante, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, y se secaron en papel absorbente estéril hasta su utilización.

Como macetas se prepararon tubetes forestales con una capacidad de 300 mL aproximadamente, utilizando como sustrato suelo agrícola (San Bernardino, Texcoco; Estado de México) arena de río lavada, en proporción (1:1 v/v). El sustrato se esterilizó durante cinco horas, por tres días consecutivos, a 120 °C. El sustrato presentó la siguiente composición química: nitrógeno total 0.11%, nitrógeno orgánico 0.10%, fósforo 75 mg kg⁻¹, potasio 33 meq/100 g, 2.1% de materia orgánica, y pH 7.6.

En cada maceta se colocó una semilla de maíz, y en los tratamientos correspondientes se agregaron 2 mL de inóculo (espora-raíz) de Gi (2000 esporas aproximadamente), para garantizar la simbiosis con la raíz de las plántulas de maíz. Diez días después se inocularon las cepas de *Trichoderma* en las plantas correspondientes, utilizando una solución de esporas de 1.5x10⁶ mL⁻¹. Cada solución de esporas de *Trichoderma* se realizó a partir de cultivos de ocho días de crecimiento a temperatura ambiente en medio papa dextrosa agar (PDA). Se realizó un raspado con un portaobjetos estéril con 5 mL de agua estéril, sobre la superficie de la caja Petri para obtener el micelio con esporas del hongo, los cuales se colocaron en agitación y en con tela de gasa estéril para separar el micelio de las esporas. La suspensión de las esporas (inóculo) se evaluó siguiendo la técnica de dilución serial y conteo en placa (Madigan *et al.*, 2003).

Las macetas se mantuvieron en invernadero con temperaturas promedio de 28 a 30°C, con humedad relativa del 30 al 40% durante el día, con riegos con agua destilada estéril cada dos días.

Cosecha y valuación de variables

A partir de seis repeticiones de cada tratamiento, se determinó el contenido de clorofila medido a través de unidades SPAD (MCL502 Minolta SPAD 502 modelo estándar) en tres edades diferentes de las plantas (20, 45 y 48 días después de la siembra),

considerando una hoja madura (cuando la lígula se encuentra liberada), en la que se tomaron lecturas en la parte más ancha de la hoja. A los 58 días, y a partir de seis repeticiones por tratamiento, se midió la actividad fotosintética (CIRAS-2 Portable photosynthesis system) en la cuarta hoja madura de las plantas.

Las plantas se cosecharon a los 58 días después de la siembra, y se determinó el área foliar (LI-3100C Area Meter, USA) de las hojas maduras de cada unidad experimental de cada tratamiento. Las hojas se colocaron en una prensa y se conservaron en refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) hasta el momento de su análisis. La longitud de raíz se determinó con una regla graduada (mm) considerando la base del tallo hasta el punto de crecimiento de la raíz, y el volumen radical (cm^3) se determinó mediante volumen desplazado en probeta de 100 mL.

Para la determinación de peso seco se colocaron follaje y raíz por separado, en bolsas de papel perforadas, en un horno (FELISA, modelo 242-A) por 72 h a $70^{\circ}\text{C} \pm 1$, y se pesaron en balanza analítica (Sartorius, modelo analytic AC 210 S). La parte aérea se utilizó para la determinación de nitrógeno (N) y fósforo (P).

La colonización micorrízica se evaluó con la técnica de tinción de azul tripano³⁵. La preparación de laminillas se realizó colocando 50 fragmentos de raíz de 1 cm de longitud aproximadamente, preparando dos réplicas por muestra, las preparaciones se observaron en un microscopio de luz a 40X. El porcentaje de colonización se calculó de acuerdo a la frecuencia de segmentos colonizados con respecto al total de segmentos evaluados (Bierman and Linderman, 1981).

La población total de *Trichoderma* (unidades formadoras de colonias -UFC-) en suelo se evaluó siguiendo la técnica de diluciones seriadas de suelo y conteo en placa (Madigan *et al.*, 2003). Para esto se consideró tres muestras por tratamiento ($n=3$). De las diluciones preparadas, se tomó 0.1 mL, y se dispersó uniformemente sobre medio de

cultivo PDA+Rosa de bengala, en cajas de Petri. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Los datos obtenidos se transformaron en logaritmos base 10 para realizar su análisis estadístico respectivo.

Para el contenido de nitrógeno (N) y fósforo (P), se utilizó el follaje de las plantas de maíz previamente secado, el cual se maceró en mortero de porcelana. La determinación de N y P se realizó mediante protocolos estandarizados en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados, basado en Jones *et al.* (1991).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un experimento factorial con dos niveles de inoculación de *Glomus intraradices* (Gi) (con y sin micorriza) y cinco niveles de *Trichoderma* (control, *T. viride* 1, *T. harzianum*, *T. virens*, y *T. viride* 2). Se obtuvieron diez tratamientos, y cada tratamiento consistió de ocho repeticiones, teniendo un total de 80 unidades experimentales distribuidas en un diseño experimental completamente al azar. Los datos se analizaron mediante el programa SAS para Windows 9.0, realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha = 0.05$).

3.3 RESULTADOS

La biomasa total de plantas con y sin Gi no mostró diferencias significativas (Figura 3.1A). La biomasa seca de follaje mostró diferencias significativas por efecto de la inoculación de *T. virens* y *T. harzianum* con respecto al control y con las interacciones con Gi; el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 3.1B). La biomasa radical no mostró diferencias significativas en los tratamientos con y sin Gi (Figura 3.2A).

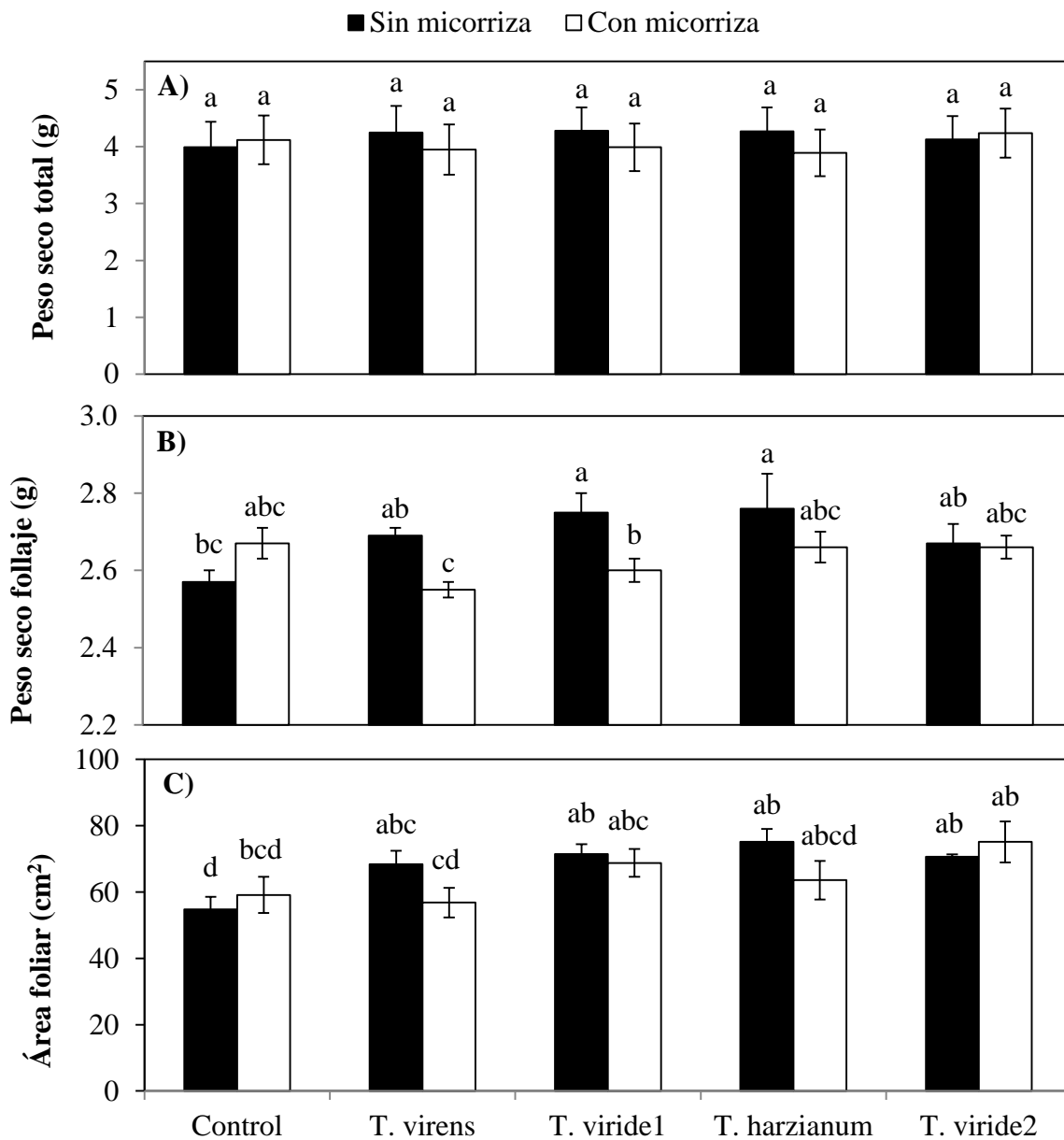


Figura 3.1. Peso seco total (A), Peso seco de follaje (B), y área foliar (C) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza) y cuatro especies de *Trichoderma*: *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* (1 y 2), *Trichoderma harzianum*. A los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=5.

El volumen radical mostró diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con *Gi+T. virens* con los tratamientos inoculados con *T. virens*; el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 3.2B).

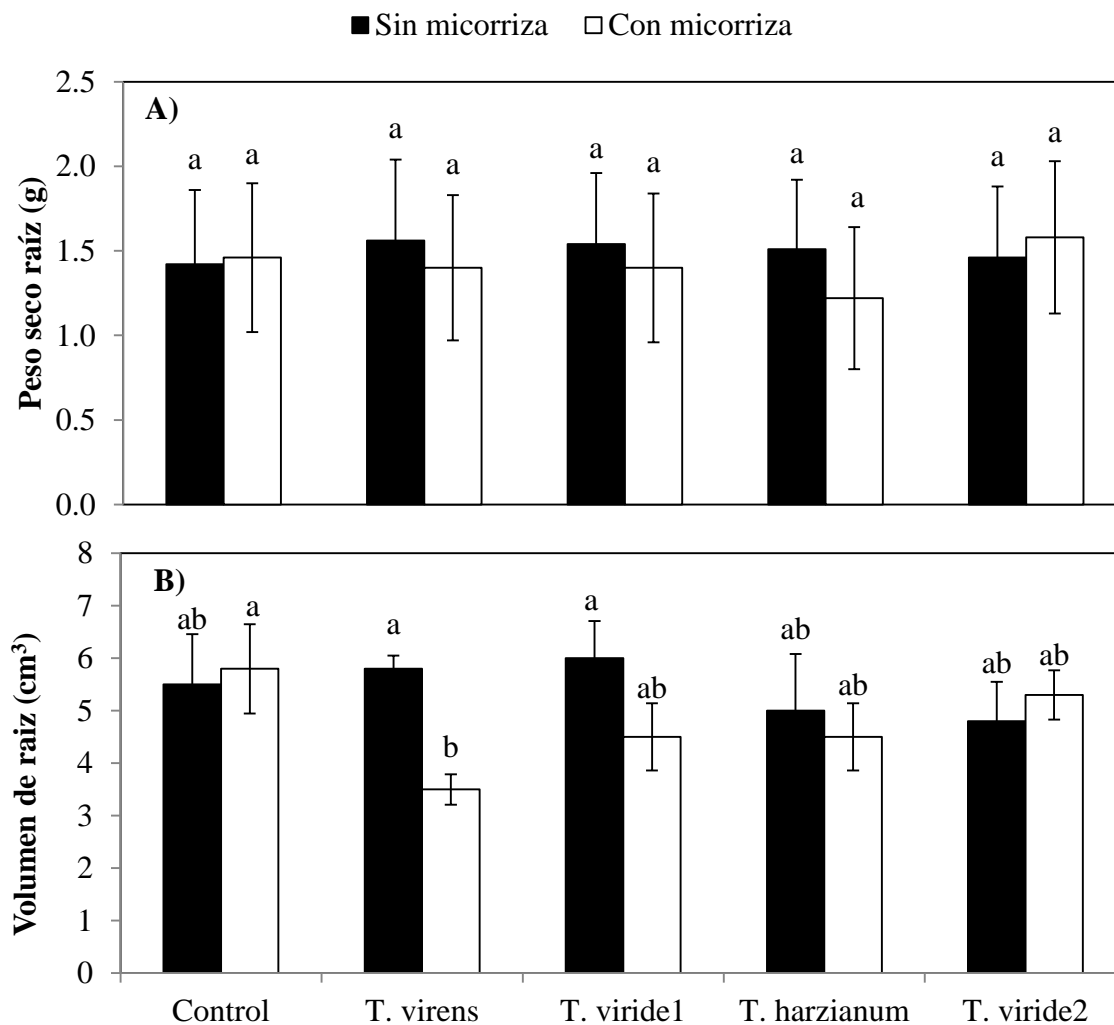


Figura 3.2. Peso seco de raíz (A) y volumen radical (B) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza) y cuatro especies de *Trichoderma*: *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* (1 y 2), *Trichoderma harzianum*. A los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=5.

El área foliar no mostró diferencias significativas en los tratamientos con y sin Gi, los cuales presentaron diferencias con respecto al testigo (Figura 3.1C). El contenido de clorofila medida en unidades SPAD, en plantas con y sin Gi a los 20 días después de la siembra no mostró diferencias significativas; sin embargo, a los 45 y 58 días, se observó una disminución significativa de las unidades SPAD en las plantas sin Gi (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Unidades SPAD medidas en tres fechas de muestreo, y fotosíntesis de plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices* (Gi) y cuatro especies de *Trichoderma*, a los 58 días después de la siembra.

Inoculación de Gi	Inoculación de <i>Trichoderma</i>	Unidades SPAD (días)			Tasa fotosintética ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
		20	45	58	
Sin micorriza	Control	35.0 ab	28.1 ab	25.7 a	9.1 a
	<i>T. virens</i>	36.8 a	19.8 e	20.5 cd	4.6 c
	<i>T. viride</i> 1	34.6 ab	22.2 de	19.6 d	6.0 bc
	<i>T. harzianum</i>	31.3 b	24.2 cd	21.3 bcd	7.5 abc
	<i>T. viride</i> 2	34.9 ab	25.9 abc	22.4 abcd	7.2 abc
Con micorriza	Control	36.3 ab	25.0 bcd	23.5 abc	6.6 bc
	<i>T. virens</i>	34.7 ab	29.4 a	24.6 ab	10.0 a
	<i>T. viride</i> 1	30.9 b	26.8 abc	23.3 abc	7.0 abc
	<i>T. harzianum</i>	35.9 ab	29.3 a	22.0 bcd	5.0 c
	<i>T. viride</i> 2	34.9 ab	27.8 abc	23.2 abc	6.6 cb
Fuente de variación					
Gi		NS	0.01	0.01	NS
<i>Trichoderma</i>		NS	NS	NS	NS
Gi x <i>Trichoderma</i>		0.05	0.05	0.05	0.05

NS=No significativo. Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

La tasa fotosintética de plantas con y sin Gi, después de los 58 días de la siembra mostró diferencias significativas; las plantas con *T. virens*, *T. viride* 1, Gi, y las

interacciones de Gi+*T. harzianum*, Gi+*T. viride* 2, la tasa fotosintética disminuyó en comparación al testigo (Cuadro 3.1). La tasa fotosintética mostrada de las plantas inoculadas solo con *T. harzianum*, *T. viride* 2, y la interacción Gi+*T. virens*, no mostró diferencias en comparación al tratamiento testigo (Cuadro 3.1).

El contenido de fósforo en follaje de las plantas con Gi o con *T. viride* 1 fue significativamente mayor con respecto al tratamiento testigo y a la interacción Gi+*T. virens*, aunque no mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 3.3A). El contenido de nitrógeno en las plantas con y sin Gi mostró diferencias estadísticas significativas; el tratamiento con Gi+*T. virens* obtuvo el mayor contenido de nitrógeno en comparación al tratamiento con *T. virens* (Figura 3.3B).

El porcentaje de colonización micorrízica presentó diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) con los tratamientos inoculados con *Trichoderma*; la interacción Gi+*T. viride* 1 presentó el menor porcentaje de colonización (44.0%), mientras que la interacción de Gi+*T. harzianum* mostró el mayor porcentaje de colonización micorrízica (75.0%) con respecto a las plantas con Gi (73.0%) (Figura 3.4A).

El número de UFC de *Trichoderma* g⁻¹ en suelo, fue mayor en la mayoría de los tratamientos inoculados con Gi. La interacción de Gi+*T. harzianum* presentó el mayor número de UFC (1.8 Log₁₀) con respecto al resto de interacciones y su control (1.4 Log₁₀). La interacción de Gi+*T. viride* 1 presentó mayor número de UFC (0.6 Log₁₀) con respecto a su correspondiente tratamiento sin Gi (0.4 Log₁₀); sin embargo, presentó menor número de UFC con respecto al resto de los tratamientos (Figura 3.4B).

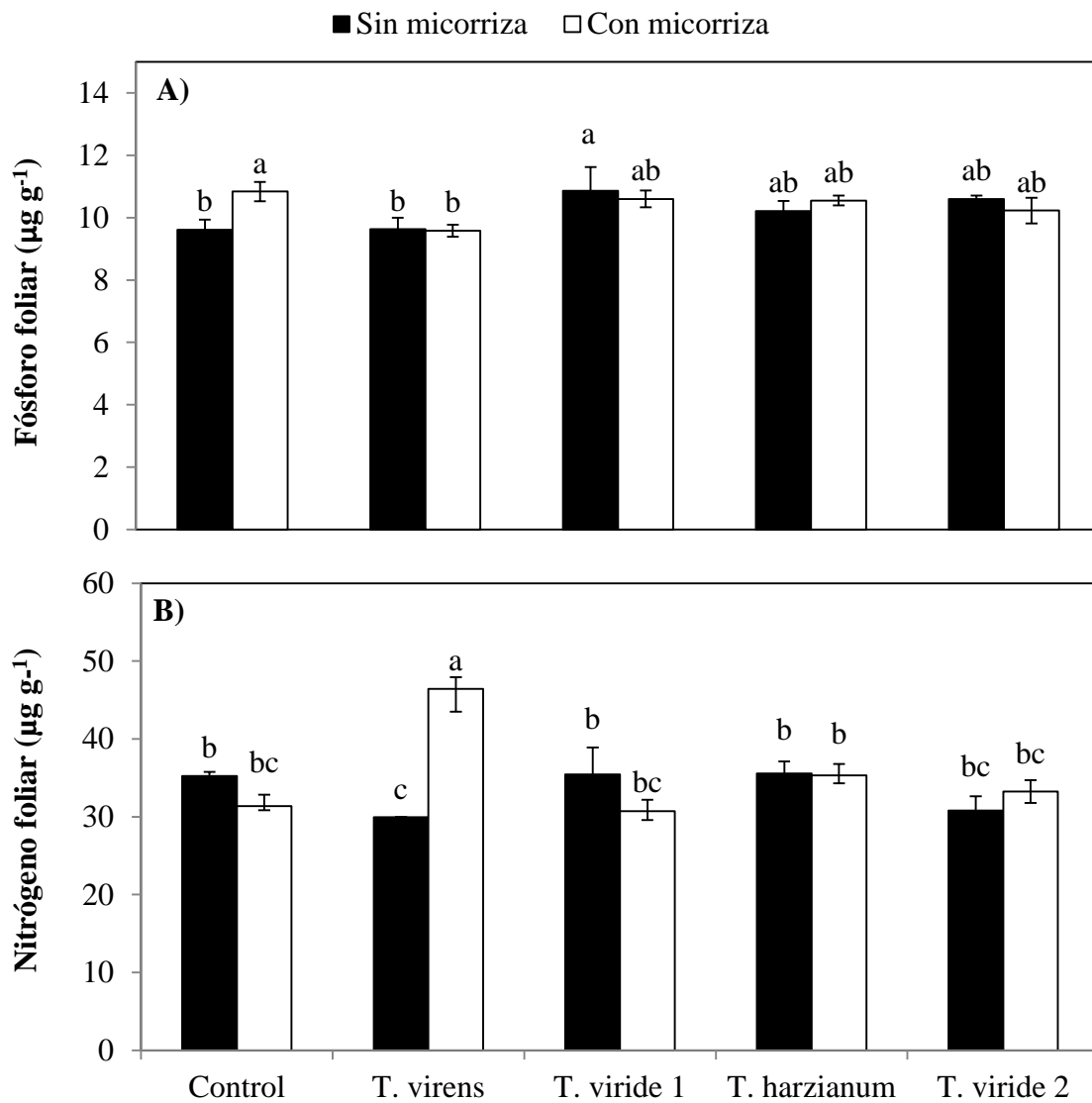


Figura 3.3. Contenido foliar de fósforo (A) y nitrógeno (B) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza) y cuatro especies de *Trichoderma*: *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* (1 y 2), *Trichoderma harzianum*. A los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=4.

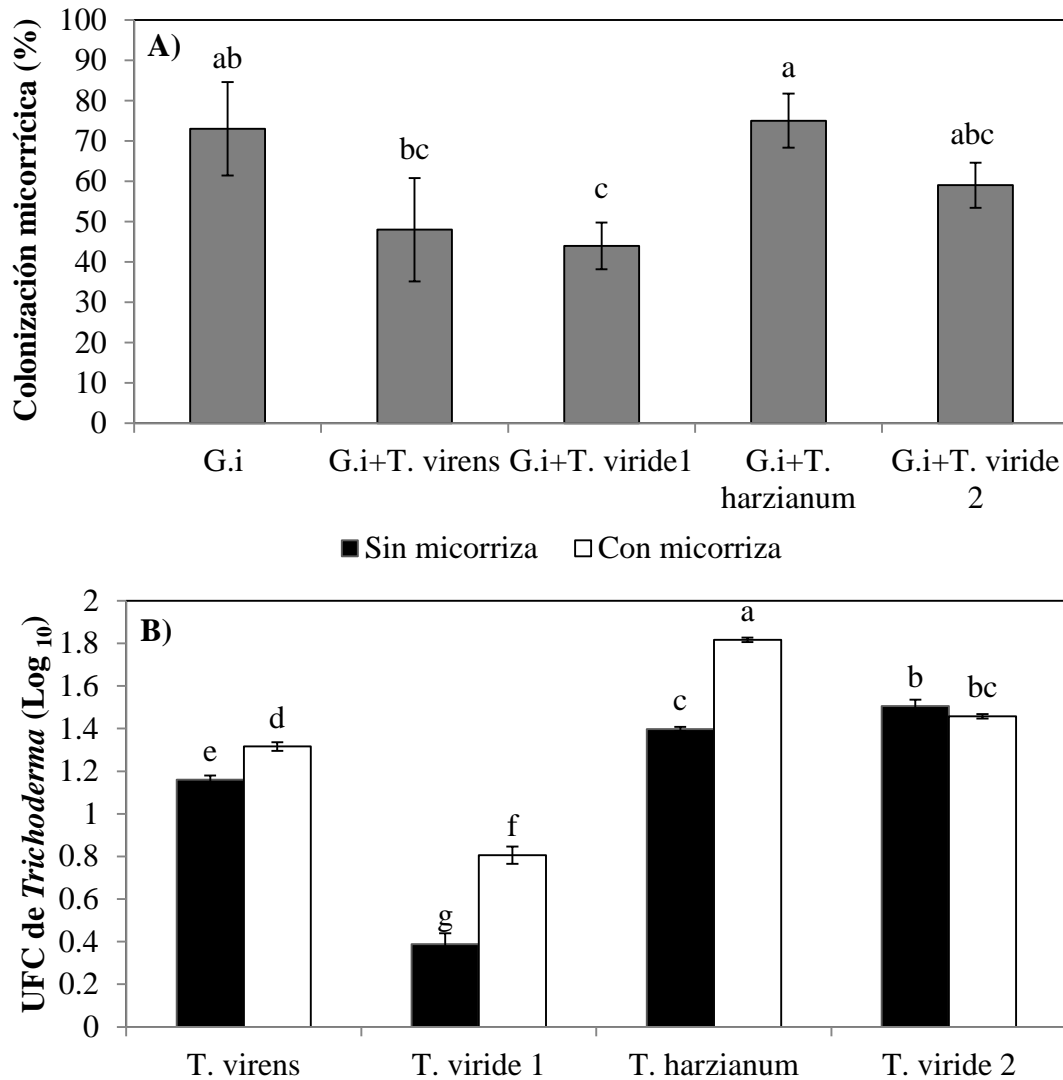


Figura 3.4. Colonización micorrízica (A) en presencia de *Trichoderma* en plántulas de maíz, y unidades formadoras de colonias (B) de cuatro cepas de *Trichoderma* (*Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* cepas 1 y 2, *Trichoderma harzianum*) en la rizosfera de plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza), a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=4.

3.4 DISCUSIÓN

Los HMA favorecen el crecimiento vegetal mediante el mejoramiento en la captación de nutrientes (Sennoi *et al.*, 2013; Linderman, 2000; Boonlue *et al.*, 2012). En contraste, *T. harzianum* puede ser considerado como un hongo promotor del crecimiento vegetal o puede influir en la colonización micorrízica (Dubsky *et al.*, 2002; Harman 2006). En el presente trabajo, la inoculación combinada de Gi con *Trichoderma* no produjo incrementos en la materia seca total de las plantas; sin embargo, estimuló el área foliar y la materia seca foliar en comparación con el testigo con y sin micorriza. La mayor materia seca foliar se obtuvo con la inoculación de *T. viride* 1 o de *T. harzianum* en ausencia de Gi; en contraste, las plantas inoculadas con Gi+*T. virens* produjeron la menor materia seca de raíz. Estos resultados difieren con aquellos obtenidos con la doble inoculación de *G. mosseae* y *T. harzianum* con la que se incrementó la materia seca de las plantas inoculadas con estos dos microorganismos (Chandanea *et al.*, 2009; Martínez-Medina *et al.* 2009). Lo anterior denota la importancia de inocular microorganismos que sean compatibles entre sí, tanto entre HMA (Chandanea *et al.*, 2009), como para especies de *Trichoderma* con los HMA (Martínez *et al.*, 2004; Green *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 1996), como se reporta en este trabajo donde se demuestra que las interacciones de *Trichoderma* con Gi muestran efectos diferenciales en las plantas.

La eficiente asimilación de P asegura a la planta que se desarrolle satisfactoriamente ya que es un elemento esencial para el metabolismo de las plantas debido a que es un componente de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos que componen las membranas celulares, ATP y ADP moléculas y compuestos intermedios de la respiración y la fotosíntesis (Fuentes *et al.*, 2006). En el presente estudio, las plantas inoculadas con especies de *T. viride* 1 y Gi promovieron mejor contenido de este elemento, en cambio las

plantas inoculadas con *T. virens*+Gi mostraron contenidos de P menores pero estadísticamente similar al resto de los tratamientos Usualmente la inoculación de HMA resulta en mejor asimilación y contenido de P por las plantas (Smith y Read, 2008; Solís-Domínguez *et al.*, 2011). Los resultados de este trabajo no mostraron este típico beneficio, lo cual puede estar relacionado al igual como con el comportamiento del crecimiento de las plantas, con la alta disponibilidad de P en el sustrato utilizado (75 mg kg^{-1}), de tal forma que las plantas estaban en suficiencia de este elemento por lo que la simbiosis micorrízica no causó un efecto positivo en el crecimiento o nutrición fosfatada del maíz, misma que es una planta micotrófica facultativa. Por otra parte, aun cuando varias investigaciones indican que la inoculación de *Trichoderma* correlaciona con mayor disponibilidad de fósforo y con el crecimiento de la planta (Martinez-Medina *et al.*, 2011, Harman 2006), el contenido de P no presentó diferencias marcadas entre los tratamientos de estas cepas fúngicas con y sin Gi. Independientemente de Gi, la inoculación de *T. virens* presentó el menor contenido de P con respecto a las otras tres cepas fúngicas.

La interacción de Gi+*T. virens* tuvo un efecto sinérgico en el contenido de N foliar en comparación con su correspondiente tratamiento sin Gi, en que se obtuvo el menor contenido de N. Este efecto es contrario al reportado por Martínez-Medina *et al.* (2011) en cuyas plantas inoculadas con *T. harzianum*+*G. constrictum* mostraron menor contenido de N, en comparación con las plantas inoculadas con ambos hongos por separado; sin embargo, *T. harzianum*+*G. mosseae* produjo incrementos en el contenido de N. Lo anterior denota que la compatibilidad de cepas de ambos hongos es determinante para favorecer la nutrición nitrogenada en las plantas (Egberongbe *et al.*, 2010; Sarabia *et al.*, 2010; Arriola *et al.*, 2000), ya que los microorganismos del suelo juegan un papel importante en la

transformación y aprovechamiento de los nutrientes por las plantas además de que favorecen la fertilidad del suelo (Adesemoye y Kloepper 2009).

La colonización micorrízica en las plantas con Gi fue del 73%, la cual fue disminuida en presencia de *T. virens* o de *T. viride* 1; en contraste, *T. harzianum* y *T. viride* 2 no mostraron efectos negativos en la colonización micorrízica, efectos que han sido reportados en otras investigaciones (De Jaeger *et al.*, 2011; Arriola *et al.*, 2000; McAllister *et al.*, 1994). En el caso particular de *T. harzianum*, se han reportado interacciones positivas con *G. intraradices* (Green *et al.*, 1999), pero este HMA redujo la población de *T. harzianum*. Estos resultados difieren con los obtenidos en la presente investigación, ya que la interacción de Gi+*T. harzianum* mostró no sólo el mayor porcentaje de colonización micorrízica sino también el mayor número de UFC de *Trichoderma*. En contraste, la interacción de Gi+*T. viride* 1, redujo el porcentaje de colonización micorrízica y estimuló las UFC de *Trichoderma* en comparación con su respectivo tratamiento sin Gi. Así, *T. koningii* parece afectar la formación de HMA de una manera muy diferente (McAllister *et al.*, 1994), lo que podría explicar en parte, las diferencias en la colonización micorrízica en las plantas inoculadas con las cuatro especies de *Trichoderma*

Como parte de los mecanismos de acción de especies de *Trichoderma*, estos hongos pueden afectar el porcentaje de germinación de las esporas de HMA, y de manera contraria, Gi puede también influir en la disminución de la población de *Trichoderma* tal y como se muestra con *T. virens*, *T. viride* 1 y *T. harzianum*. Así mismo, la reducción del porcentaje de germinación de esporas por efecto de antagonismo de *Trichoderma* se puede relacionar con la liberación de sustancias solubles en el medio y compuestos volátiles que pueden afectar directamente a las estructuras de HMA (Sosa *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2004; Harman 2004 Fracchia *et al.*, 1998 Mcallister *et al.*, 1994). Por otra parte, *T. harzianum*

aumentó el porcentaje de colonización de *G. claroideum* en *Eucalyptus globulus* favoreciendo la absorción de nutrientes (Arriagada *et al.*, 2009). Además, Martínez-Medina *et al.* (2010) afirman que la colonización micorrízica en la combinación de Gi+*Trichoderma* fue mayor a la observada en las plantas inoculadas únicamente con el HMA; así mismo no observaron diferencias significativas en UFC de *T. harzianum* en combinación con *G. intraradices*.

La presencia de algunas especies de *Trichoderma* puede afectar el establecimiento de HMA en la raíz; a la vez los HMA pueden influir en la población de hongos filamentosos. Algunas investigaciones confirman la existencia de efectos sinérgicos de *Trichoderma* en el crecimiento vegetal y en la colonización micorrízica (Arriagada *et al.*, 2004; Arriagada *et al.*, 2007; Arriagada *et al.*, 2009). Lo anterior puede explicar el beneficio que se observó de *T. harzianum*, *T. viride* 1 y 2, *T. virens* en la materia seca y área foliar de las plantas, y en algunas veces, sus efectos fueron mayores con respecto a sus interacciones con el HMA.

Los HMA son un componente biológico en la mayoría de los agroecosistemas, en los cuales pueden proporcionar varios beneficios a las comunidades vegetales, además de regular la población microbiana en la rizósfera directa o indirectamente a través de cambios en los patrones de exudados radicales o de su propio micelio (Mar Vázquez *et al.*, 2000). A este proceso biológico, se le ha llamado “efecto de micorrizósfera” (Linderman 1992), por el que la colonización de HMA puede aumentar, disminuir o no afectar, la proliferación de ciertos grupos microbianos microbianas. En esta investigación, estos efectos micorrizosféricos pueden relacionarse con las interacciones de Gi con las cuatro especies de *Trichoderma*, en las que la presencia del HMA estimuló el número de UFC de *T. viride* 1, *T. virens* y *T. harzianum* en la rizósfera de las plantas. Martínez-Medina *et al.*³⁰ observaron

que la cantidad de UFC de *T. harzianum* no mostró diferencias significativas en presencia o no de HMA; sin embargo, Martínez-Medina *et al.* (2009) y Chandaniea *et al.* (2009) reportaron un antagonismo de los HMA en la población de *T. harzianum*, aunque la presencia de *T. harzianum* estimuló el porcentaje de colonización de *G. mosseae* (Chandaniea *et al.* (2009). En la presente investigación, Gi estimuló las UFC de tres especies de *Trichoderma*, pero *T. viride*, y *T. virens* 1 y 2, disminuyeron el porcentaje de colonización.

Aunque la colonización de HMA influyó en la población de *Trichoderma*, posiblemente por su influencia para estimular ciertas comunidades microbianas en el suelo (Mar Vázquez *et al.*, 2000; Martínez-Medina *et al.*, 2010; Martínez-Medina *et al.*, 2009), no se puede descartar que el aumento de las poblaciones de *Trichoderma* se deba también en parte, a su capacidad de competir por espacio y por nutrientes (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004, Green *et al.*, 1999).

Mc Allister *et al.* (1994) afirman que el efecto negativo de los HMA en la población de *Trichoderma* puede estar relacionado con el tiempo en que se inocula el hongo micorrízico. Así, al inocular dos semanas antes el HMA favorece su establecimiento en el sistema radical mostrando mayor competencia por espacio y nutrientes, afectando de esta forma la población de *Trichoderma*. En esta investigación, el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular en las plantas de maíz se hizo diez antes de inocular a las especies de *Trichoderma*, lo cual propició que el sistema radical estuviera colonizado por el HMA, causando que las especies de *Trichoderma* tuvieran menos sitios de infección. Sin embargo, es necesario investigar las interacciones de estos dos tipos de hongos en etapas tempranas de colonización y sus consecuencias en las plantas hospedantes. McAllister *et al.* (1994) indican que al inocular *Trichoderma* o *G. mosseae* al mismo tiempo, el peso seco de

las plantas disminuyo significativamente. Sin embargo, De Jaeguer *et al.* (2011) demostraron cierto sinergismo entre HMA y *Trichoderma* aplicado en alginato de calcio que liberó lentamente a este hongo, dando tiempo para que se formara la simbiosis micorrízica. Con lo anterior se evitan relaciones de competencia entre ambos microorganismos.

3.5 LITERATURA CITADA

Adesemoye, AO. Kloepper, JW. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2009, 85:1-12

Arriagada C, Aranda E, Sampedro I, García-Romera I, Ocampo JA. Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globulus*. *Bioresource Technol.* 2009, 100(24):6250-6257.

Arriagada C, Herrera MA, García-Romera I, Ocampo JA. Tolerance to Cd of soybean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Symbiosis.* 2004, 36:285-301

Arriagada CA, Herrera MA, Borie F, Ocampo JA. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the aluminum resistance of *Eucalyptus globulus*. *Water Air Soil Pollut*, 2007, 182:383-394.

Arriola LL, Hausbeck MK, Rogers J, Safir GR. The Effect of *Trichoderma harzianum* and Arbuscular Mycorrhizae on *Fusarium* Root Rot in Asparagus. *Horttchnology.* 2000, 10:141-144.

Benbrook CM. Introduction. In: Board on Agriculture, Sustainable agriculture research and education in the field workshop proceedings. Board on Agriculture National

- Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press. Washington, DC, U.S.A. 1991, Pp. 1-10.
- Biermann B, G. Linderman G, Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization, *New Phytol*, 1981, 87:63-67.
- Boonlue S, Surapat W, Pukahuta C, Suwanarit P, Suwanarit A, Morinaga T. Diversity and efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from organic chili (*Capsicum frutescens*) farms. *Mycoscience*, 2012, 53:10-16.
- Briggs J., Green Revolution. In: International Encyclopedia of Human Geography, Elsevier Inc. 2009, Pp 634-638.
- Cardoso IM, Kuyper TW. Mycorrhizas and tropical soil fertility *Agric Ecosyst Environ*. 2006, 116: 72-84.
- Chandanie WA, Kubota M, Hyakumachi M. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth-promoting fungi and their significance for enhancing plant growth and suppressing damping-off of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *App Soil Ecol*, 2009, 41:336-341
- Dalgaard T, Hutchings NJ, Porter JR. Agroecology, scaling and interdisciplinarity. *Agric Ecosyst Environ*. 2003, 100:39-51.
- De Jaeger N, de la Provincia IE, Rouhier H, Declerck S. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp within alginate beads: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. *J Appl Microbiol*. 2011, 111:125-135.
- Dubsky M, Sramek F, Vosatka M. Inoculation of cyclamen (*Cyclamen persicum*) and poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) with arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum*. *Rostlinná Výroba*, 2002, 48:63-68

- Egberongbe HO, Akintokun AK, Babalola OO, Bancole MO. The effect of *Glomus mosseae* and *Trichoderma harzianum* on proximate analysis of soybean (*Glycine max* (L) Merrill) seed grown in sterilized and unsterilized soil. J Agric Extension Rural Dev. 2010, 2:54-58.
- Egberongbe HO, Sobowale AA, Llusanya OA, Feyisola RT. The influence of *Glomus mosseae* and *Trichoderma harzianum* on Phytohormone production in soybeans (*Glycine max* L. Merr) planted in sterilized and unsterilized soil. Am J Exp Agric, 2012, 2: 516-524.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. El maíz blanco: un grano alimentario tradicional en los países en desarrollo. [Consultado el 1 de abril de 2014.] <ftp://ftp.fao.org/docrep/FAO/006/w2698s/w2698s00.pdf>
- Fracchia S, Mujica MT, Garcia-Romera I, Garcia-Garrillo JM, Martin J, Ocampo J, Godeas A. Interaction between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. Plant Soil. 1998, 200:131-137.
- Fuentes B, Bolan N, Naidu R, Mora ML. Phosphorus in organic waste-soil systems r. C. Suelo Nutr. Veg. 2006, 6:64-83.
- Green H, Larsen J, Olsson PA, Jensen DF, Jakobsen I. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. Appl Environ Microbiol. 1999, 65:1428-1434.
- Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 2006, 96:190-194
- Harman, GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2004, 2:34-56.

- Ibarra-Medina VA, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Lara-Hernández ME, Valdez-Carrasco J M. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Rev Mex Mic.* 2010, 31:53-63.
- Jones JB, Wolf JrB, Mills HA. *Plant Analysis Handbook. A Practical Sampling, Preparation, Analysis, and Interpretation Guide.* Micro-Macro Publ., Athens, GA. 1991.
- Kaya C, Ashraf M, Sonmez O, Aydemir S, Tuna AL, Cullu MA. The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Sci Hortic.* 2009, 121:1-6.
- Linderman RG. Effects of mycorrhizal fungi on plant tolerance to diseases, In Y. Kapulnik, D.D. Douds Jr. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2000, p. 345-365.
- Linderman, R.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: GJ. Bethlenfalvai and R.G. Linderman (Eds), *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture,* Am. Soc. Agron. Special Publication 54, American Society of Agronomy, Madison, 1992, pp. 45-70
- Madigan M, Martinko J, Parker J. *Brock biología de los microorganismos.* (10 Ed). Madrid: Pearson Prentice Hall. 2003.
- Martínez A, Obertello M, Pardo A, Ocampo JA, Godeas A. Interaction between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*, 2004, 14:79-84.
- Martínez-Medina A, Pascual JA, Pérez-Alfocea F, Albacete A, Roldán A. *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption by *Fusarium oxysporum* infection in melon. *Plant Pathology*, 2010, 100: 682-688.

- Martínez-Medina A, Pascual JA, Lloret E, Roldán A. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on *Fusarium* wilt in melon plants grown in seedlings nurseries. *J Sci Food Agric*. 2009, 89:1843-1850.
- Martínez-Medina A, Roldán A, Albacete A, Pascual JA. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry*, 2011, 72:223-229.
- McAllister CB, Garcia-Romera I, Godeas A, Ocampo JA. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: Effects of plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biol Biochem*, 1994, 26:1363–1367.
- Nzanzaa B., D. Maraisa, P. Soundy, Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. *Sci Hort*, 2012, 144:55-59.
- Phillips JM, Hayman, DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc*. 1970, 55:158-161.
- Phillips RL, Green Revolution: Past, Present, and Future. In: Van-Alfen N. K. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, Elsevier Inc., 2014, p. 529-538.
- Rillig MC, Mummey DL. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol*. 2006; 171: 41-53.
- Rousseau A, Benhamou N, Chet I, Piche Y. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 1996, 86:434-443.

- Sainz RH, Echeverría HE. Relationship between readings of chlorophyll meter (Minolta SPAD 502) at different crop corn stages and grain yield. Rev. Fac. Agron., La Plata 1998, 103:37-44.
- Sarabia O, Madrigal RP, Martínez MT, Carreón A. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas, 2010, 12:65-71
- Sennoi R, Singkham N, Jogloy S, Boonlue S, Saksirirat W, Kesmala T, Patanothai A. Biological control of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). J Crop Prot. 2013, 54:148-153.
- SIAP, Servicio de información agropecuaria y pesquera, ciclo de cultivo 2013. Consultado el 20 de agosto de 2014. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbiosis. Cambridge, UK: Academic Press. 2008.
- Solís-Domínguez FA, Valentín-Vargas A, Chorover J, Maier RM. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. Sci Total Environ. 2011, 409(6):1009-1016.
- Sosa RT, Sánchez N J, Morales GE, Cruz CF. Arbuscular mycorrhizae-*Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) Interaction and Effects on *Brachiaria decumbens* (Poaceae)'s Growth. Acta Biológica Colombiana, 2006, 11:43-54.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature. 2002, 418: 671-677.

- Van der Heijden, MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett.* 2008, 11: 296-310.
- Vázquez MM, César S, Azcón R, Barea JM. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl Soil Ecol.* 2000, 15:261-272.
- Whipps, JM. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot.* 2004, 82: 1198-1227.

CAPÍTULO IV

Trichoderma Y MICORRIZA ARBUSCULAR Y SU INTERACCIÓN CON PLANTAS DE MAÍZ INOCULADAS CON *Fusarium verticillioides*

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar las interacciones entre hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) y el hongo *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium verticillioides* inoculados en plantas de maíz, además de evaluar sus efecto en el crecimiento y nutrición de las plantas. La inoculación de *G. intraradices* en combinación con *Trichoderma* y en presencia de *F. verticillioides*, no afectó significativamente el crecimiento y el estado nutricional de la planta en comparación al resto de los tratamientos. La combinación de *T. harzianum* con *G. intraradices* generó plantas con poca área foliar (132.5 cm²), raíz abundante (6.3 cm³), y peso seco (3.1 g) y contenido de fósforo (30.7 mg kg⁻¹) superior o igual al testigo. La presencia de *G. intraradices* estimuló la población de *F. verticillioides* con valores de 1.5 X10⁵ UFC g⁻¹ en comparación al testigo 0.2 X10⁵ UFC g⁻¹, aunque sin presentar signos y síntomas de enfermedad en las plantas. La inoculación de *Trichoderma* permitió obtener plantas más altas (39.9 cm), además de ser eficiente en el control de *F. verticillioides*. La presencia de *F. verticillioides* en plantas de maíz no afectó la acumulación de fósforo en el follaje (33.0 mg kg⁻¹), ya que contenido de este elemento fue similar en los tratamientos *T. harzianum* + *F. verticillioides* (32.1 mg kg⁻¹), *T. harzianum* + *G. intraradices* (30.7 mg kg⁻¹) en comparación con el testigo (33.7 mg kg⁻¹).

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, *Glomus intraradices*, *Fusarium verticillioides*, fósforo, *Zea mays*.

CHAPTER IV

INTERACTION OF *Trichoderma* AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAE ON MAIZE PLANTS INOCULATED WITH *Fusarium verticillioides*

ABSTRACT

This work evaluated the interaction between an arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Trichoderma harzianum* for improving the growth and nutrition, and for controlling the negative effects of *Fusarium verticillioides* on maize plants. The combined inoculation of *G. intraradices* and *Trichoderma* in the presence of *F. verticillioides* did not exert significant effects on the growth and nutritional status of plants when compared to the remaining treatments. Nevertheless, the sole combination of *T. harzianum* and *G. intraradices* resulted on plants with low leaf area (132.5 cm²) and root volume (6.3 cm³), as well as dry weight (3.1 g) and phosphorus content (30.7 mg kg⁻¹) higher of equal to the control. The presence of *G. intraradices* stimulated the population of *F. verticillioides* by reaching values of 1.5 X10⁵ UFCg⁻¹ when compared to the control with 0.2 X10⁵ UFC g⁻¹, but without showing signs or symptoms of the fungal disease. The inoculation of *Trichoderma* produced the tallest plants (39.9 cm), and showed a good control against *F. verticillioides*. However, the presence of *F. verticillioides* resulted in increased accumulation of phosphorus (33.0 mg kg⁻¹) which was similar to those treatments inoculated with *T. harzianum* + *F. verticilioides* (32.1 mg kg⁻¹), *T. harzianum* + *G. intraradices* (30.7 mg kg⁻¹) or with the control (33.7 mg kg⁻¹).

Key words: *Trichoderma harzianum*, *Glomus intraradices*, *Fusarium verticillioides*, phosphorus, *Zea mays*.

4.1 INTRODUCCIÓN

Fusarium verticillioides (teleomorfo *Gibberella moniliformis*) es el principal agente causal de la pudrición de mazorca y del grano de maíz (*Zea mays* L.) en todo el mundo, que provoca la disminución del rendimiento, calidad, y el valor de los granos, lo que se traduce en pérdidas económicas (Ferrigo *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2010). Además, *Fusarium verticillioides* es una especie altamente tóxica debido a que produce una amplia gama de micotoxinas, como diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, zearalenona, fumonisinas, fusarina C, beauvericina, moniliformina, y fusaproliferin (Venturini *et al.*, 2013; Covarellia *et al.*, 2012). Estas toxinas están catalogadas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1993) como compuestos carcinógenos del Grupo 2B (Cruz *et al.*, 2014; Venturini *et al.*, 2013, Pereira *et al.*, 2010) debido a que estas toxinas muestran una actividad de promoción de cáncer mediante la interrupción de metabolismo de los esfingolípidos a través de la inhibición de la enzima ceramida sintasa (Lanubilea *et al.*, 2012). La contaminación de maíz por micotoxinas es un problema mundial no sólo para la salud humana sino también para la salud animal (Ferrigo *et al.*, 2014, Cruz *et al.*, 2014).

Los patrones de localización y de la transmisión de *F. verticillioides* dentro de la planta de maíz han sido objeto de investigaciones, indicando que este patógeno se presenta en áreas de todo el mundo donde se cultiva el maíz; además se ha descrito que *F. verticillioides* se presenta en todo el mundo en las áreas donde se cultiva maíz, siendo una de las principales preocupaciones de que *F. verticillioides* pueda ser un endófito transmitido por semilla o infectar a la planta en diferentes etapas de desarrollo sin inducir los síntomas visibles de la enfermedad tales como la presencia de roya, y la pudrición de la raíz, del tallo y de la mazorca (Venturini *et al.*, 2013; Domijan *et al.*, 2011). A pesar de

biotecnologías dirigidas a la generación de híbridos tolerantes y/o resistentes, el cultivo de maíz sigue siendo susceptible a la infección y a la contaminación por especies *Fusarium* y de sus micotoxinas. La dificultad de control se debe a que esta especie fúngica se difunde verticalmente en las plantas, y también puede ocurrir la difusión horizontal entre plantas a través de heridas debido al ataque de insectos, esporas aéreas y otras partes de la planta lesionadas, también través del suelo por insectos rizófagos o lesiones por labores agrícolas (Pereira *et al.*, 2010).

Las estrategias de control destinadas a reducir la infección por fitopatógenos de cultivos, han sido ampliamente basado en el uso de fungicidas químicos (Pereira *et al.*, 2010; Kanampiu *et al.*, 2002). Sin embargo, la aplicación de altas dosis de éstos puede resultar en contaminación ambiental, en el deterioro de la salud humana, y en el aumento de la resistencia de los hongos (Sennoi *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2010; Ibarra-Medina *et al.*, 2010). El control biológico de patógenos ha sido investigado por su potencial para proporcionar un medio más viable y sostenible, en el que se utilizan microorganismos fúngicos como *Trichoderma*. Esta especie fúngica ha sido ampliamente utilizada como un agente de biocontrol efectivo, debido a la competencia por nutrientes del suelo o por espacios, por la producción de sustancias antibióticas, y por la capacidad de colonizar las raíces de plantas en diferentes tipos de suelo y pH, además, por promover el crecimiento de las plantas y estimular las respuestas de defensa sistémica en el maíz ISR (resistencia sistémica inducida) (Elad, 1996; Su y Yun, 2014; Bailey *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2006; Ferrigo *et al.*, 2014A; Bailey *et al.*, 2008; Harman y Björkman, 1998; Nawrocka *et al.*, 2013; Fontenelle *et al.*, 2011; Chandra Nayaka *et al.*, 2010; Harman *et al.*, 2004; Yedidia *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 1998; Akladios y Abbas, 2014; Fontenelle *et al.*, 2011).

Los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) juegan un papel crítico en el ecosistema agrícola, la colonización de raíces de las plantas por HMA favorece la absorción y la movilización de nutrientes del suelo que no es accesible al sistema radicular de la planta, y por consecuencia promueve el crecimiento de ésta, además presenta actividad de control biológico en la planta colonizada por competencia (Mohandas *et al.*, 2013; Sennoi *et al.*, 2013; Bonfante *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2008; Muhibuddin, 2008); Estos hongos incrementan diversas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo secundario y el sistema antioxidante bajo condiciones de estrés (Chen *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2014).

El género *Trichoderma* comprende especies de hongos altamente valorados por su actividad micoparasítica contra diversos patógenos de cultivos importantes. En los últimos años se ha sugerido como estrategia, la mezcla de varias cepas benéficas en consorcios como antagonistas potenciales y como promotores de crecimiento en plantas (Srivastava *et al.*, 2010, Jain *et al.*, 2012, Su y Jing, 2014, Aleandri *et al.*, 2015 Sennoi *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la combinación de *Trichoderma harzianum* y *Glomus intraradices* en el control de *Fusarium verticillioides* en plantas de maíz y evaluar sus efectos en el crecimiento de plantas de maíz.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas se obtuvieron por la técnica de cebo, a partir de diversos suelos agrícolas, previa selección por su capacidad micoparasítica hacia cepas de *Sclerotinia* sp. y *Fusarium* sp. (Ibarra-Medina *et al.*, 2010), la *Fusarium verticillioides* se proporcionó por la Dr. Ma. Dolores Briones Reyes. La cepa de *Glomus intraradices* (Gi) se

proporcionó por el Corporativo de Desarrollo Sustentable S.A. de C.V. de Morelia, Michoacán.

El material de maíz se proporcionó por el Dr. José Agapito Pecina, material del Subtrópico de Valles altos de Tamaulipas, grano blanco, que presenta características de ciclo intermedio (125-130 días a madurez y 180-185 días a cosecha de grano), floración masculina a 88 días, y floración femenina 90 días después de la siembra.

Las semillas de maíz se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos en agitación constante, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, y se secaron en papel absorbente estéril hasta su utilización.

Como macetas se prepararon vasos de unicel con capacidad de 500 mL aproximadamente, utilizando como sustrato suelo agrícola (San Bernardino, Texcoco; Estado de México) arena de río lavada, en proporción 1:1 v/v. El sustrato se esterilizó durante 5 h, por tres días consecutivos, a 120 °C. El sustrato presentó la siguiente composición química: nitrógeno total 0.11%, nitrógeno orgánico 0.10 %, fósforo total 75 mg kg⁻¹, potasio 33 meq/100 g, 2.1 % de materia orgánica, y 7.6 de pH.

En cada maceta se colocó una semilla de maíz, y en los tratamientos correspondientes se agregaron 2 mL de inóculo (espora-raíz) de *Glomus intraradices* (2000 esporas por mL⁻¹ aproximadamente), para garantizar la simbiosis con la raíz de las plántulas de maíz. Diez días después se inocularon las cepas de *Trichoderma* y *F. verticillioides* en las plantas correspondientes, utilizando una solución de esporas de 1.5x10⁶ mL⁻¹ por cada cepa. Cada solución de esporas de *Trichoderma* y *F. verticillioides* se realizó a partir de cultivos fúngicos de ocho y 10 días de crecimiento a temperatura ambiente (28±2 °C) en medio papa dextrosa agar (PDA). Una vez obtenido los cultivos puros se realizó un raspado con un portaobjetos estéril adicionando 5 mL de agua estéril, sobre la superficie de la caja

Petri para obtener el micelio con esporas de *T. harzianum* y conidios de *F. verticillioide*, los cuales se colocaron en agitación para separar micelio de esporas y conidios, durante cinco minutos. La separación del micelio de la solución de esporas se realizó colocando en un embudo una gasa estéril para separar el micelio de las esporas. La suspensión de las esporas (inóculo) se evaluó siguiendo la técnica de diluciones y conteo en placa (Madigan, 2003).

Las plantas se mantuvieron en invernadero con temperaturas promedio de 28 a 30 °C, con humedad relativa del 30 al 40% durante el día, con riegos con agua destilada estéril cada dos días, para mantenerlas a capacidad de campo.

EVALUACIÓN DE VARIABLES

Tasa fotosintética y Unidades SPAD. La actividad fotosintética se midió a los 58 días después de la siembra de maíz (CIRAS-2 Portable photosynthesis system) utilizando la cuarta hoja madura (cuando la lígula se encuentra liberada) de las plantas (n=6). Se determinó el contenido de clorofila medido a través de índice de verdor representado por unidades SPAD (MCL502 Minolta SPAD 502 modelo estándar) considerando también la cuarta hoja madura, en la que se tomaron lecturas en la parte más ancha de la hoja.

Parámetros de crecimiento de las plantas. Las plantas se cosecharon y se determinó el área foliar (LI-3100C Area Meter, USA) de las hojas maduras de cada unidad experimental por cada tratamiento. Las hojas se colocaron en una prensa botánica y se conservaron en refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) hasta el momento de su análisis foliar. Además, el volumen radical (cm^3) se determinó mediante volumen desplazado en probeta de 100 mL. La determinación de peso seco total, el material vegetal se colocó en bolsas de papel perforadas, a 72 h a $70^{\circ}\text{C} \pm 1$ (FELISA, modelo 242-A) y se pesaron en balanza analítica (Sartorius, modelo analytic AC 210 S).

Contenido nutrimental en hojas. Para la determinación del contenido de nitrógeno (N) y fósforo (P), se utilizó el follaje de las plantas de maíz previamente secado, el cual se maceró en mortero de porcelana. La determinación de N y P se realizó mediante protocolos estandarizados en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados, basado en Jones y Mills (1991).

Colonización micorrízica. La colonización micorrízica se evaluó con la técnica de tinción de azul tripano (Phillips y Hayman 1970). La preparación de muestras de raíz se realizó utilizando el 50% de raíz obtenida de la cosecha, una vez teñidas las raíces se procedió a realizar el montaje de fragmentos de raíz en laminillas colocando 25 fragmentos de raíz de 1 cm de longitud aproximadamente, preparando dos réplicas por muestra. Las preparaciones se observaron en un microscopio de luz a 40X. El porcentaje de colonización se calculó de acuerdo a la frecuencia de segmentos colonizados con respecto al total de segmentos evaluados (Biermann y Linderman, 1981).

Población de microorganismos fúngicos. La población total de *T. harzianum* y de *F. verticillioides* (unidades formadoras de colonias -UFC-) en suelo rizosférico se evaluó siguiendo la técnica de dilución seriada de suelo y conteo en placa (Madigan, 2003), y se consideraron tres muestras por tratamiento (n=3). De las diluciones preparadas (dilución 3 y 4), se tomó 0.1 mL, y se dispersó uniformemente sobre medio de cultivo PDA+Rosa de bengala, en cajas de Petri. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se estableció un experimento factorial 4 x 2, contemplando cuatro niveles de microbianos (testigo, *G. intraradices*, *T. harzianum* y la combinación de ambos hongos benéficos) y dos niveles de inoculación de patógeno (con y sin *F. verticillioides*). Se obtuvieron ocho tratamientos, y cada tratamiento consistió de seis repeticiones, teniendo un total de 48 unidades experimentales distribuidas en un

diseño completamente al azar. Los datos se analizaron mediante el programa SAS para Windows 9.0, realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha = 0.05$).

4.3. RESULTADOS

Fotosíntesis y unidades SPAD. Los resultados obtenidos para el parámetro de fotosíntesis, ningún tratamiento mostro diferencias significativas; sin embargo, en la figura 4.1A muestra diferencias dentro de los tratamientos, esto es, que las plantas inoculadas con *T. harzianum* en presencia o no del HMA (11.36 y 13.36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), contienen una concentración superior a las que se encuentran inoculadas con el patógeno (10.93 y 9.61 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De manera contraria, al tratamiento de plantas con HMA (10.71 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el valor del contenido de fotosíntesis es menor al tratamiento de HMA + *F. verticillioides* (12.05 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Solamente el tratamiento donde las plantas de maíz inoculadas con *T. harzianum* y *G. intraradices* presentó el valor más alto (13.36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entre y dentro de los tratamientos con y sin patógeno.

Los resultados de verdor medido en unidades SPAD (Figura 4.1B) no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamiento, pero si se muestra una tendencia diferencial dentro de los tratamiento con y sin patógeno, esto es, son más verdes las plantas testigo (34.85 SPAD) que las plantas en presencia de *F. verticillioides* (27.18 SPAD). Así mismo la presencia de *G. intraradices* con y sin *F. verticilliodies* no favoreció la concentración de clorofila, en comparación al testigo; de la misma manera los tratamientos de *G. intraradices* + *T. harzianum* (31.85 SPAD), y *G. intraradices* + *T. harzianum* + *F. verticillioide* (26.61 SPAD).

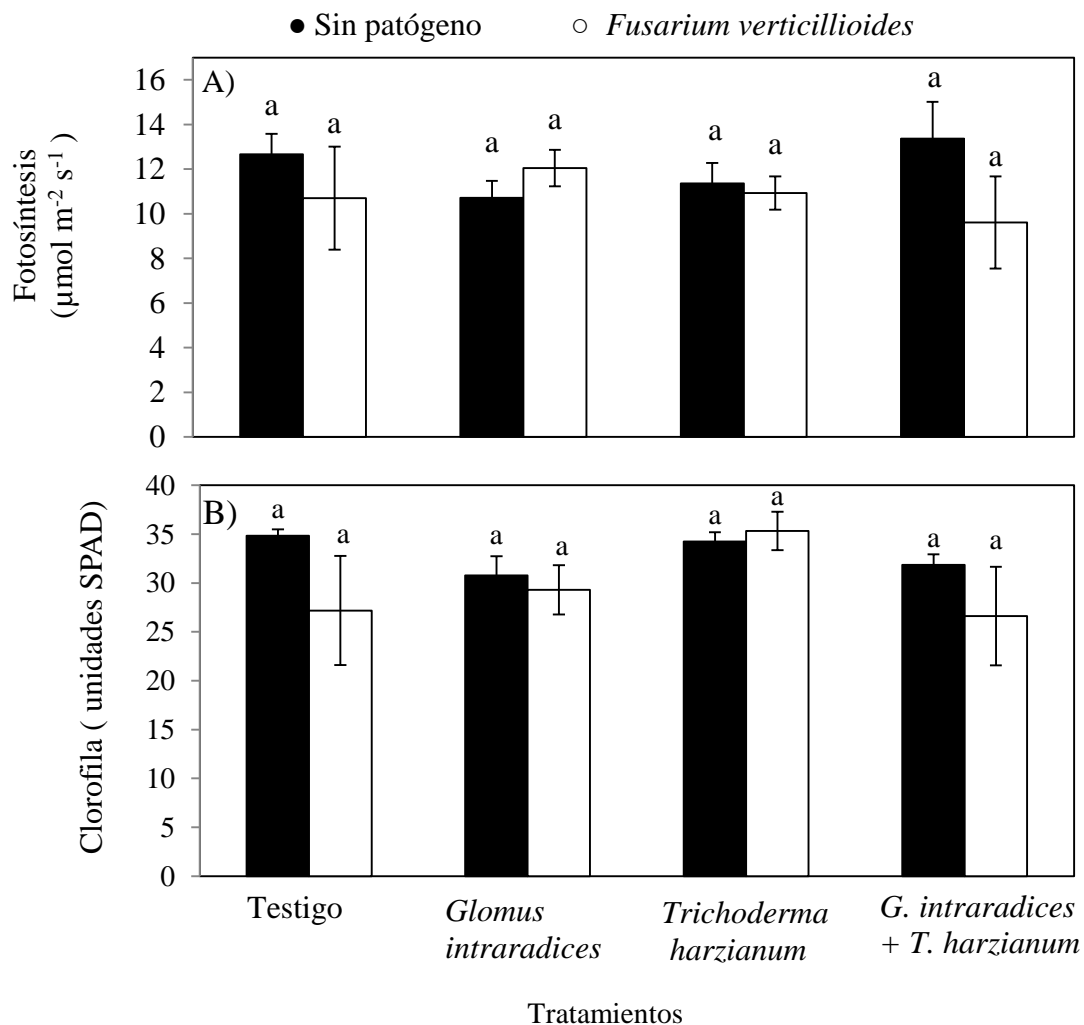


Figura 4.1. A) Fotosíntesis y B) Clorofila (índice de verdor en unidades SPAD) en plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* en presencia de *F. verticillioides* (patógeno), a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=6.

La altura de plantas mostró diferencias significativas entre tratamientos. La figura 4.2A muestra que el mejor tratamiento fue donde se inoculó solamente con *T. harzianum* (39.95 cm), en comparación al testigo (30.28 cm) y a plantas solo con *F. verticillioides*

(26.55 cm). Además, la figura 4.2.A muestra que la presencia de *G. intraradices* + *F. verticillioides* (39.53 cm) produjo mayor altura que las plantas sin patógeno (34.03 cm); sin embargo, estos valores disminuyen en el tratamiento con la combinación de *T. harzianum* + *G. intraradices* sin patógeno 37.78 y con patógeno 34.66 cm, respectivamente.

Las plantas inoculadas con *F. verticillioides* o con *T. harzianum* + *F. verticillioides* presentaron los valores más altos en área foliar (228.92 y 229.62 cm², respectivamente), mientras que el tratamiento con *G. intraradices* + *T. harzianum* presentó el menor valor en área foliar con 132.47 cm². El resto de tratamientos no presentaron diferencias estadísticas significativas (Figura 4.2B).

Los resultados en volumen de raíz mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 4.2C), donde las plantas inoculadas con *F. verticillioides* (3.5 cm³) presentó menor volumen de raíz en comparación con el tratamiento testigo (5.83 cm³) (Figura 4.2C). Esto indica que la presencia de *Fusarium* tiene un efecto negativo en el crecimiento de la raíz. Los tratamientos en los que se inoculó *G. intraradices* + *T. harzianum* (6.33 cm³) presentaron mayor volumen radical en comparación al tratamiento con *F. verticillioides* (4.66 cm³), pero no mostraron diferencias significativas en comparación al testigo. Las plantas inoculadas con *G. intraradices* presentaron menor volumen de raíz (3.5 cm³) en comparación al tratamiento con *G. intraradices* + *F. verticillioides* el cual presentó un volumen radical de 5.8 cm³, el mismo comportamiento se presentó en el tratamiento con *T. harzianum* (4.5 cm³) y *T. harzianum* + *F. verticillioides* (6.0 cm³).

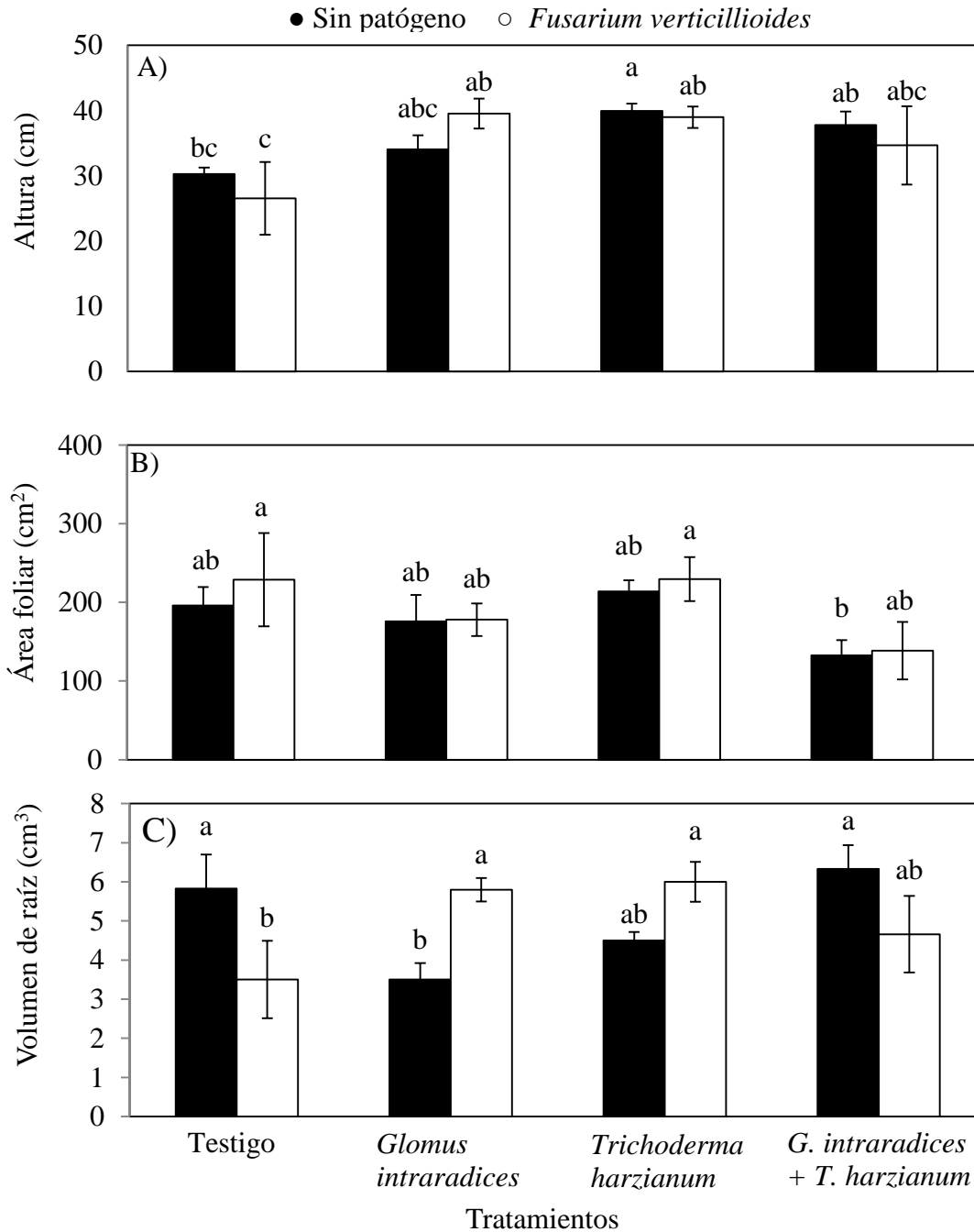


Figura 4.2 Altura (A), área foliar (B), volumen de raíz (C) de plantas inoculadas con *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

El volumen radical en plantas inoculadas con HMA y *Trichoderma* no presentaron diferencias significativas, pero sí numéricas (3.5 y 4.5 cm³, respectivamente); sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento solo con *G. intraradices* (3.5 cm³) en comparación con su interacción con *T. harzianum* sin patógeno (6.33 cm³), pero no mostró diferencias en los tratamientos con presencia de *Fusarium* (*G. intraradices* + *F. verticillioides* 5.8 cm³, *G. intraradices* + *T. harzianum* + *F. verticillioides* 4.66 cm³).

El contenido de materia seca total en plantas de maíz se muestra en la Figura 4.3, donde se observa que no hay diferencias significativas en plantas inoculadas con o sin *F. verticillioides*. De la misma manera, no se obtuvieron diferencias estadísticas entre los tratamientos inoculados con *G. intraradices* con y sin *Fusarium* (2.89 y 3.04 g), ni entre los tratamientos con *Trichoderma* con y sin *Fusarium* (3.08 y 2.97 g), y en la inoculación combinada de *Glomus* con *Trichoderma* con y sin *Fusarium* (2.52 y 3.15 g). Sin embargo, los tratamientos mencionados mostraron diferencias estadísticas con el tratamiento donde solo se inoculó *F. verticillioides*, siendo este tratamiento el de menor contenido de materia seca total (2.27 g). No se observó efecto sinérgico de la combinación de HMA y *Trichoderma* en el contenido de materia seca total.

El contenido de nitrógeno en el follaje se observa en la Figura 4.4A, en donde el factor inoculación de patógeno (*F. verticillioides*) no mostró diferencias estadísticas significativas entre las plantas sin inocular e inoculadas con *Fusarium*. De igual manera los tratamientos de HMA y de *Trichoderma* con y sin patógeno no mostraron diferencias estadísticas. Sin embargo, el tratamiento de *Trichoderma* + *F. verticillioides* (1.72 % N) y el tratamiento con *G. intraradices* + *T. harzianum* (1.67 % N) mostraron diferencias significativas en comparación al testigo sin *Fusarium* (2.02 % N) cuyos valores de concentración de nitrógeno foliar fueron los más bajos.

La concentración de fósforo en plantas inoculadas con *F. verticillioides* (33.03 mg kg⁻¹) no mostró diferencias significativas en comparación al testigo (33.68 mg kg⁻¹), de la misma manera el factor *G. intraradices* (20.02 mg kg⁻¹) no tuvo diferencias significativas en comparación a su combinación con *F. verticillioides* (27.55) y con respecto a las plantas testigo. Las plantas inoculadas con *T. harzianum* (22.98 mg kg⁻¹) presentaron diferencias significativas en comparación al tratamiento con *T. harzianum* + *F. verticillioides* (32.13 mg kg⁻¹) y con el testigo (33.68 mg kg⁻¹), o con el tratamiento solo con *Fusarium* (33.03 mg kg⁻¹). La inoculación con *T. harzianim* + *F. verticillioides* estimuló la concentración de P en el follaje en comparación con las plantas inoculadas solo con *Trichoderma*; de manera contraria, se observa una diferencia significativa cuando se inocula *T. harzianum* + *G. intraradices* + *F. verticillioides* (22.84 mg kg⁻¹) en comparación al tratamiento sin *Fusarium* (30.71 mg kg⁻¹). Además la combinación de los tres microorganismos mostró diferencias significativas al tener valores inferiores en comparación al testigo y a los tratamientos individuales de cada uno de los factores (Figura 4.4B).

La colonización micorrízica en plantas con y sin patógeno no presentó diferencias significativas, esto es, la presencia del patógeno no intervino en el establecimiento de HMA en la raíz de las plantas de maíz. Sin embargo, se muestra un aumento en la colonización en el tratamiento de *G. intraradices* en combinación con *Trichoderma*, y con *F. verticillioides* sin presentar diferencias significativas en comparación de los tratamientos de inoculación individual de estos microorganismos (Figura 4.5).

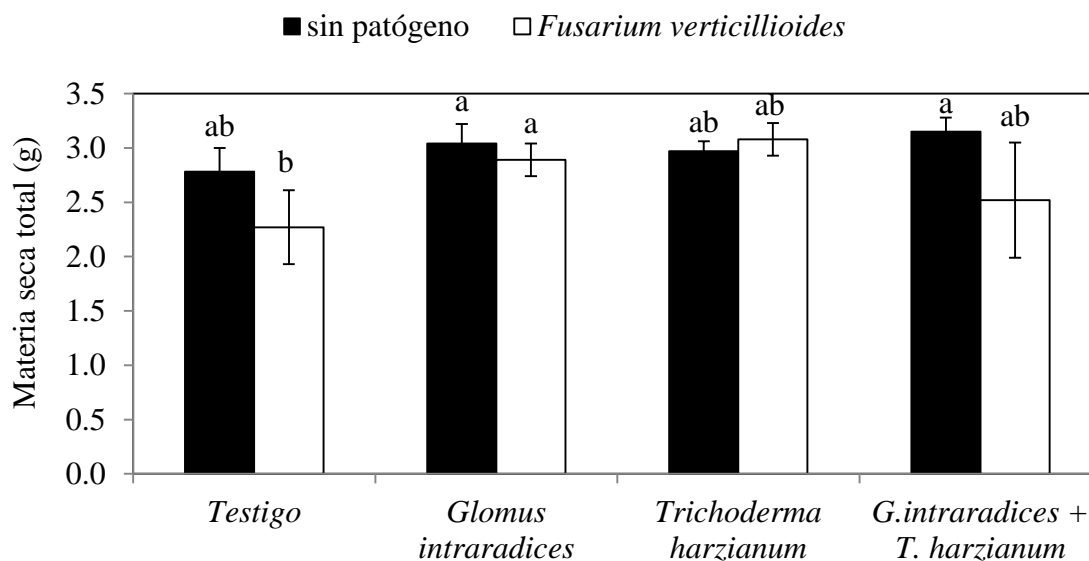


Figura 4.3 Materia seca total de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza), *Trichoderma harzianum* y *F. verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

El contenido de UFC de *Trichoderma* muestra diferencias altamente significativas ($21.38 \cdot 10^5$ UFC/ g^{-1} / 10^5 UFC/ g^{-1}) en comparación del tratamiento en combinación de *F. verticillioides* ($0.5 \cdot 10^5$ UFC/ g^{-1}), lo que nos permite observar la competencia por espacio por parte de *Fusarium*, sin embargo no se muestra diferencias significativas en los tratamientos de *G. intraradices + T. harzianum* en presencia o ausencia de *F. verticillioides* (2 y $1.9 \cdot 10^5$ UFC/ g^{-1} respectivamente), pero tuvo una diferencia estadística muy marcada en comparación al testigo.

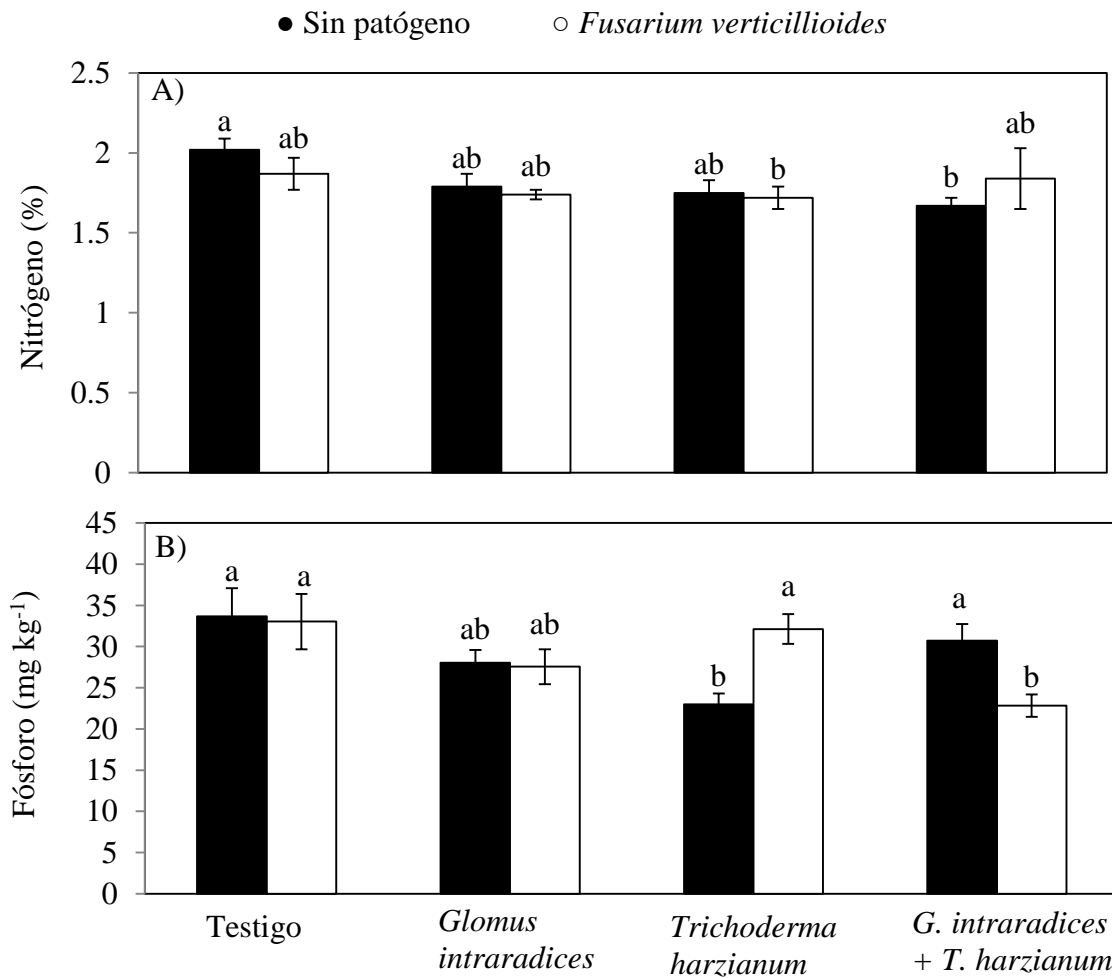


Figura 4.4. Contenido de nitrógeno y fósforo en follaje de plantas inoculadas con *Glomus intraradices* (micorriza), *Trichoderma harzianum* y *F. verticillioides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$), n=6).

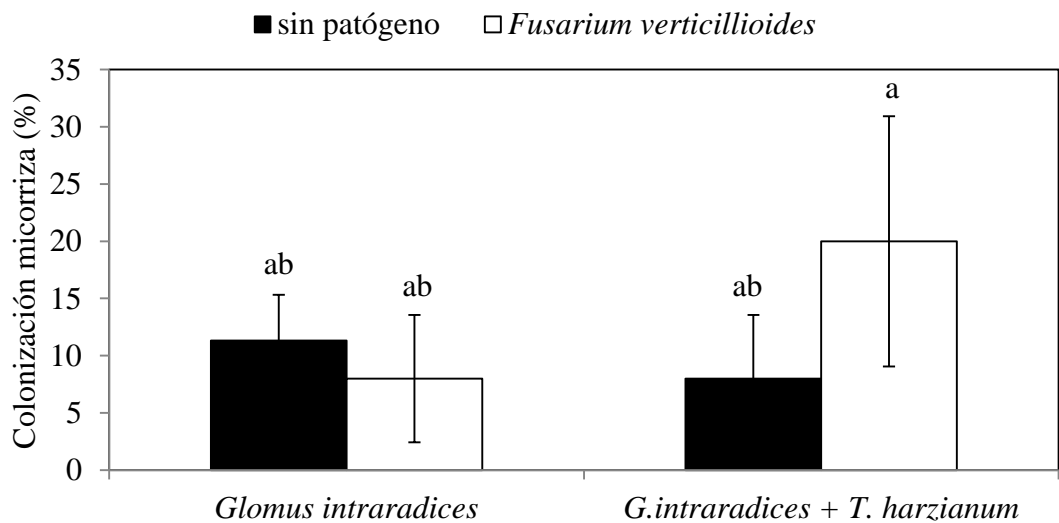


Figura 4.5. Porcentaje de colonización micorrízica de *Glomus intraradices* en plantas de maíz inoculadas con *Trichoderma harzianum* y *F. verticilloides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=3.

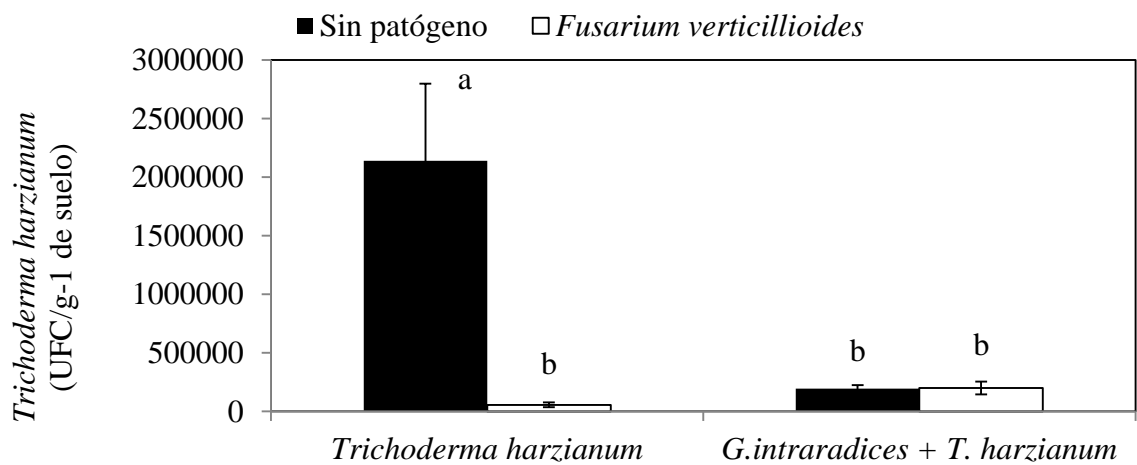


Figura 4.6. Unidades formadoras de colonias de *Trichoderma harzianum* en suelo rizosférico de plantas de maíz inoculadas con *Glomus intraradices* y *F. verticilloides*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=3.

En la figura 4.7, se observa que la población de *F. verticillioides* se ve estimulada con la presencia de *Glomus intraradices* (1.5×10^5 UFC/g⁻¹), esto al presentar una población superior en comparación con el testigo (0.2×10^5 UFC/g⁻¹). La población de *F. verticillioides*, se mantiene en concentraciones bajas en presencia de *Trichoderma* + *G. intraradices*, probablemente por la presencia de HMA, sin embargo *F. verticillioides*, al inocularse solo con *T. harzianum* no compete en espacio y su población en las muestras evaluadas es nula. Cabe señalar que se observa una población considerable de *Fusarium* en el tratamiento únicamente inoculado con HMA, esto por la probable contaminación interna de la semilla.

Las plantas en las que sólo se inoculó *Fusarium verticillioides* mostraron sintomatología de daño únicamente en la raíz principal (Figura 4.8B); el resto de los tratamientos inoculados con el patógeno no presentaron daños visuales en raíz o follaje.

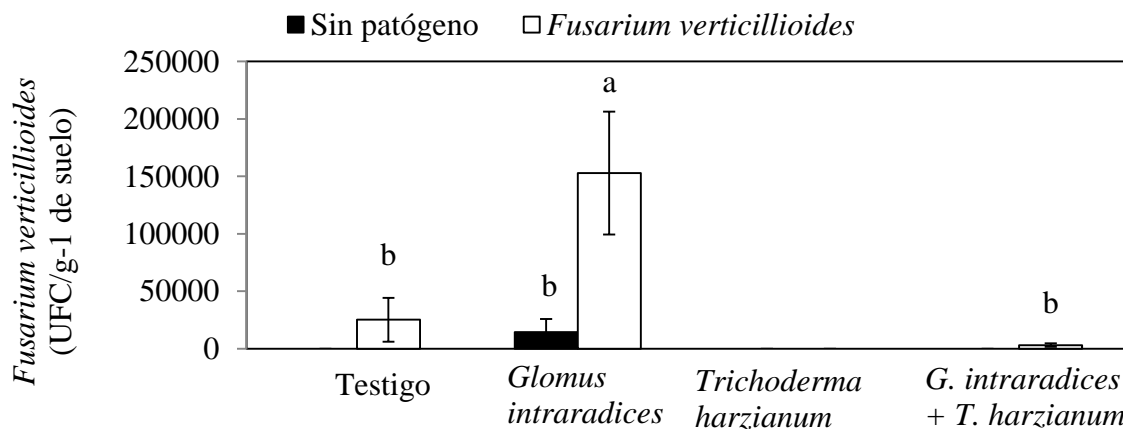


Figura 4.7. Unidades formadoras de colonias de *Fusarium verticillioides* en suelo rizosférico de plantas de maíz inoculadas con *Trichoderma harzianum* y *Glomus intraradices*, a los 58 días después de la siembra. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$) n=3

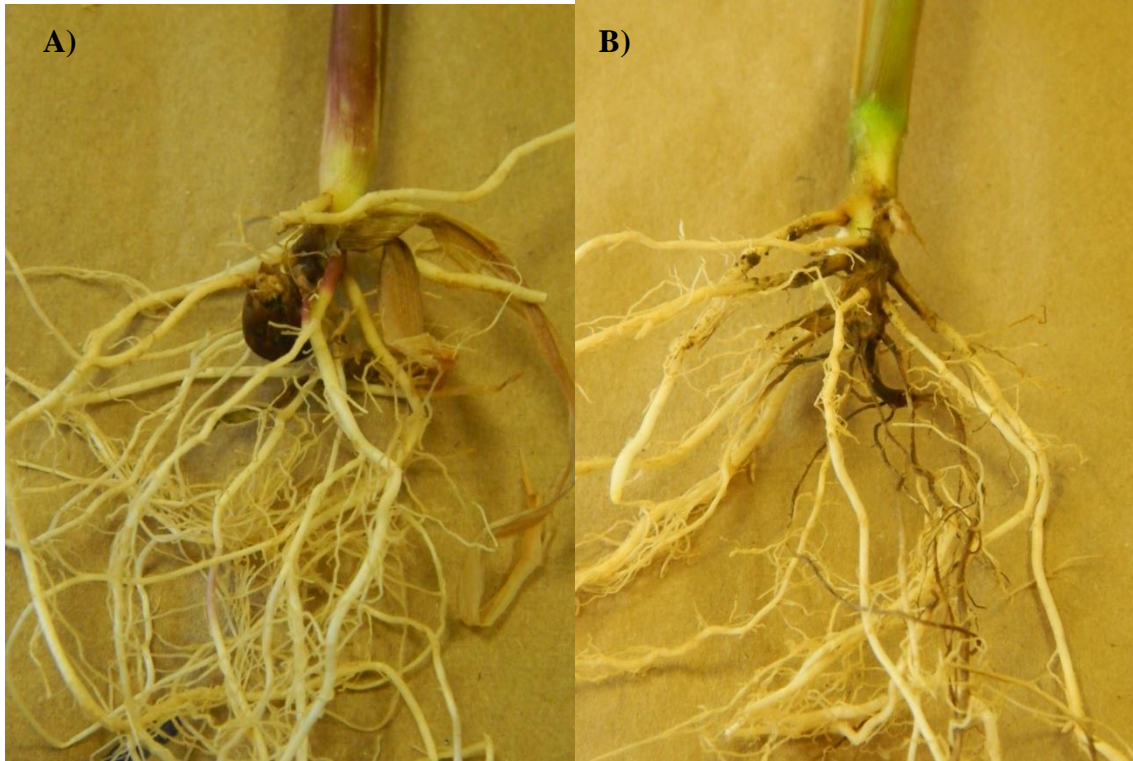


Figura 4.8. Apreciación visual de: A) raíz de plantas de maíz del tratamiento testigo, y B) raíz dañada por *Fusarium verticillioides*.

4.4 DISCUSIÓN

Las plantas mantienen una interacción compleja con sus poblaciones rizosféricas, la cual es crucial para la asimilación de nutrientes, el desarrollo y la activación de los mecanismos de defensa; estas asociaciones mutuamente beneficiosas son posibles porque las plantas y los microorganismos pueden comunicarse entre sí a través de diversos mecanismos de señalización. Sin embargo, la inoculación combinada de los microorganismos en este estudio parece constituir una mejora en el desarrollo de las plantas de maíz, con respecto a la aplicación de un solo grupo microbiano, más la combinación del consorcio de microorganismos beneficiosos no mostró efectos sinérgicos en la presencia de

Fusarium. Oyekanmi *et al.* (2007) indicaron que puede ocurrir incompatibilidad entre microorganismos, provocando que los organismos utilizados para el control biológico sean menos eficaces que la aplicación de una sola especie. Sin embargo, los resultados obtenidos son contrastantes, y dependerá de los microorganismos aplicados en consorcio; en algunos casos se han reportado menores incidencias de enfermedad sin producir efectos fisiológicos de la planta (Somani y Arora, 2010; Singh y Singh, 2012), mientras que en otras situaciones se han observado reducciones en la incidencia de la enfermedad y por ende, las plantas son más vigorosas (Martínez-Medina *et al.*, 2004; Su y Jing, 2014). Sennoi *et al.* (2013) describen que la combinación de *T. harzianum* y *G. clarum* en cultivo de alcachofa controlaron la enfermedad de pudrición de tallo por *Sclerotium rolfsii*; Srivastava *et al.* (2010) también reportaron que la combinación de *T. harzianum* y *G. intraradices* fue más eficaz contra fusariosis vascular en cultivo de tomate. Sin embargo, en el presente trabajo, la sinergia de ambos microorganismos en la supresión de *F. verticillioides* en maíz se mantuvo en umbrales no dañinos para la planta.

En el presente estudio *T. harzianum* fue eficaz como agente de control biológico y como promotor de crecimiento, en comparación de *G. intraradices* cuya inoculación estimuló la propagación de *F. verticillioides* pero sin provocar la enfermedad. Estos resultados corroboran lo expuesto por Ferrigo *et al.* (2014 y 2014a) donde demostraron que en condiciones de invernadero y en campo la aplicación de aislamientos de *Trichoderma* evita o reduce la infección de *F. verticillioides*, cuando las semillas de maíz fueron tratadas con *T. harzianum*, lo que disminuyó significativamente la colonización del patógeno en 32 y 85 % (promedio de tres años). Las condiciones ambientales heterogéneas podrían haber influido en el sistema de interacción entre la planta y antagonista, además del patógeno, lo que contribuye a la variabilidad observada en el transcurso de las pruebas de campo

(Ferrigo *et al.*, 2014). Las condiciones climáticas pueden modular la severidad de *F. verticillioides* y su colonización, así como la colonización de *T. harzianum* en raíces del maíz y su desempeño como antagonista. La inconsistencia en el uso de microorganismos benéficos aplicados en consorcios potencialmente pueden afectar o estimular su propia diseminación, este fenómeno es inevitable entre especies microbianas benéficas (*Trichoderma* y HMA) que en ocasiones no distinguen entre cepas patógenas y no patógenas.

Nzanza *et al.* (2012) describen que la combinación de *T. harzianum* y HMA tienen influencias insignificantes sobre el rendimiento de tomate, al obtener un ligero aumento en el porcentaje de fruta extra-grande, sugiriendo que estos inoculantes fúngicos probablemente tienen efecto biofertilizante en tomate; sin embargo, esto no coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Los tratamientos con *T. harzianum* en combinación con *G. intraradices* redujeron el contenido de N en comparación con el testigo y los tratamientos con las inoculaciones individuales. Mismo efecto se presentó cuando se inoculó *T. harzianum* + *G. intraradices* + *F. verticillioides*, cuya combinación obtuvo la menor concentración de P en follaje que los tratamientos de microorganismos individuales y que el testigo.

Los resultados obtenidos en la absorción efectiva de P en la planta maíz a partir del HMA, no muestran la capacidad potencial de los HMA para mejorar la asimilación de P por las plantas; es posible pensar que al no tener un alto grado de colonización o una alta proporción de estructuras intraradicales (Feddermann *et al.*, 2008, Jansa *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos no concuerdan con Smith *et al.* (2004) quienes demostraron que utilizando tres especies de plantas en combinación con tres especies de HMA encontrando que cada combinación provocó una respuesta única en crecimiento de la

planta y la adquisición de fósforo. Sin embargo, en el cultivo de maíz la simbiosis micorrízica proporciona hasta 60% del requerimiento total de P (Nurlaeny *et al.*, 1996). Las especies de HMA que colonizan las raíces de maíz exhiben una fuerte especificidad hacia el hospedero (Gosling *et al.*, 2013). Las variedades criollas e híbridos difieren en términos de porcentaje de colonización (An *et al.*, 2010) y la capacidad de absorción de P (Ortas y Akpinar, 2011, Tchameni *et al.*, 2009). Además, las diferentes especies de HMA exhiben diversidad funcional en términos de la colonización y el crecimiento del maíz (Hao *et al.*, 2008; Klironomos y Hart, 2002; Tian *et al.*, 2013) lo que podría dar lugar a diferencias en la planta para la captación de P. Lo anterior puede explicar el bajo porcentaje de colonización y asimilación de P obtenidos en este trabajo.

4.5 CONCLUSIONES

Las interacciones microbianas pueden ser beneficiosas, perjudiciales o neutrales, y pueden influir significativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas por lo que se concluye, que se debe hacer una evaluación cuidadosa de aislamientos compatibles para mitigar alguna limitación y garantizar la exitosa utilización de *Trichoderma* y HMA.

La presencia de *Fusarium* en plantas de maíz no redujo parámetros agronómicos y nutrimentales en presencia o no de *Glomus intraradices* o de *Trichoderma*. La presencia de *Glomus intraradices* en la rizosfera de plantas de maíz estimuló la presencia de *Fusarium verticillioides*, sin presentar signos o síntomas de enfermedad en raíz, tallo o follaje. Más aun, la presencia de *Glomus intraradices* en combinación con *F. verticillioides* produjo mayor materia seca de las plantas.

Trichoderma estimuló la altura de las plantas de maíz e inhibió la presencia de *Fusarium verticillioide*. La interacción *Trichoderma* + *G. intraradices* favoreció la

obtención de plantas más vigorosas con mayor volumen radical y contenido de materia seca total, y con mejor estado nutricional de fósforo.

La interacción de *G. intraradices* y *T. harzianum* mejoró algunas características agronómicas de plantas de maíz, pero solo en ausencia de *F. verticillioides*.

4.6 LITERATURA CITADA

- Akladios S.A., S.M. Abbas, Application of *Trichoderma harzianum* T22 as a biofertilizer potential in maize growth, *J. Plant Nutr.*, (2014), 37:30–49.
- Aleandri M. P., G. Chilosi, , N. Bruni, A. Tomassini, A. M. Vettrano, A. Vannini, Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection*, (2015), 67: 269–278.
- An G.H., S. Kobayashi, H. Enoki, K. Sonobe, M. Muraki, T. Karasawa, T. Ezawa, How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms, *Plant Soil*, (2010), 327:441–453
- Bailey B.A., H. Bae, M.D. Strem, J. Crozier, S.E. Thomas, G.J. Samuels, B.T. Vinyar, K.A. Holmes. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 2008, 46(1):24–35.
- Biermann, B., Linderman, R.G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. *New Phytologist*. (1981), 87: 63–67
- Bonfante P., I.A. Anca. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2009, 63:363–383.
- Chandra Nayaka S., SR Niranjana, AC Uday Shankar, S. Niranjana Raj, MS Reddy, HS Prakash, CN Mortensen. Biopriming semillas con nueva cepa de *Trichoderma harzianum* para el control de toxigénicas *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en el maíz. *Arch. Phytopathol. PFL*, 2010, 43:264-282.

- Chen S., P. Hawighorst, J. Sun, A. Polle. Salt tolerance in *Populus*: Significance of stress signaling networks, mycorrhization, and soil amendments for cellular and whole-plant nutrition, *Environ. Exp. Bot.* (2014), 107(14): 113–124.
- Chen S., Wenjuan J., Airong L., Shaojie Z., Dilin L., Fenghua W., Xiaomin L., Chaoxing H. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress. *Scientia Horticulturae.* (2013), 160:222–229.
- Covarellia L., S. Stifanoa, G. Beccaria, L. Raggib, V. M. T. Lattanzioc, E. Albertinib. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiol.* (2012), 31(1):17–24.
- Cruz A., P. Marína, N. Maganb, M.T. González-Jaéna. Combined effects of benomyl and environmental factors on growth and expression of the fumonisin biosynthetic genes FUM1 and FUM19 by *Fusarium verticillioides*. *International J. of Food Microbiol.* (2014), 191:17–23.
- Domijan A.M., S. Kovac, A.Y. Abramov. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis—Implication to mechanism of cell toxicity Original, *The Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2011), 43 (6):897-904.
- Elad Y, A. Kapat., The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*., *Eur. J. Plant Pathol.*, (1999), vol. 105: 177–189.
- Feddermann N., R. Finlay, T. Boller, M. Elfstrand, Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecol.*, (2010) 3(1): 1–8.
- Ferrigo D., A. Raiola, E. Piccolo, C. Scopel, R. Causin. *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides* *J. Plant Pathol.*, (2014a), 96:133-142.
- Ferrigo D., A. Raiola, R. Rasera, R. Causin, *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions, *Crop Protection*, (2014) 65:51-56.

- Fontenelle A.D.B., S.D. Guzzo, C.M.M. Lucon, R. Harakava. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*. (2011), 30(11):1492–1500.
- Gosling P., A. Mead, M. Proctor, J.P. Hammond, G.D. Bending, Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient, *New Phytol.*, (2013), 198:546–556.
- Harman, G.E., T. Björkman. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: G.E. Harman and C. P. Kubicek (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol .2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis: London. pp. 229-266.
- Harman, GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2004, 2:34-56.
- Ibarra-Medina V. A., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, M. E. Lara-Hernández, J. M. Valdez-Carrasco Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Rev Mex Mic*. 2010, 31:53-63
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1993, pp 397-444, 445-466, 467-488.
- Jain A., S. Singh, B.K. Sarma, H.B. Singh, Microbial consortium–mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*, *J. Appl. Microbiol.*, (2012), 112:537–550.
- Jansa J., F.A. Smith, S.E. Smith, Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?, *New Phytologist*, 177 (2008), pp. 779–789.
- Jones, J.B. Jr. 2001. *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. Ch 3: p191-239.
- Klironomos J.N., M.M. Hart, Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum, *Mycorrhiza*, (2002), 12:181–184.

- Lanubile A., J. Bernardia, P. Battilanib, A. Logriecoc, A. Maroccoa. Resistant and susceptible maize genotypes activate different transcriptional responses against *Fusarium verticillioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* (2012), 77(1):52–59.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. *Brock biología de los microorganismos*. (10 Ed). Madrid: Pearson Prentice Hall. 2003.
- Martinez-Medina A., M. Obertello, A. Pardo, J.A. Ocampo, A. Godeas, Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*, *Mycorrhiza*, (2004), 14:79–84.
- Mohandas S., S. Poovarasam, P. Panneerselvam, B. Saritha, K.K. Upreti, Ranveer Kamal, T. Sita. Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes. *Scientia Horticulturae*. (2013), 150:371–376.
- Morris S.W., B. Vernooij, S. Titatarn, M. Starrett, S. Thomas, C.C. Wiltse, R.A. Frederiksen, A. Bhandhufalck, S. Hulbert, S. Uknes, Induced resistance responses in maize, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11 (1998), pp. 643–658
- Muhibuddin A. Kajian hubungan populasi *Glomus fasciculatum* dengan factor lingkungan Agrivita, (2008), 30(1):84–89.
- Nawrocka J., U. Małolepsza Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*. 2013, 67(1):149–156.
- Nurlaeny N, Marschner H, George E. Effects of liming and mycorrhizal colonization on soil phosphate depletion and phosphate uptake by maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) grown in two tropical acid soils. *Plant Soil*. (1996), 181: 275-285.
- Nzanza B., D. Marais, P. Soundy. Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. *Scientia Horticulturae*, (2012), 144: 55–5.
- Ortas I., C. Akpınar, Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production, *J. Plant Nutr.*, (2011), 34:970–987
- Oyekanmi E.O., D.L. Coyne, O.E. Fagade, O. Osonubi. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium*

- japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Protection*, (2007), 26 (7):1006–1012.
- Parsons M.W., G.P. Munkvold. Effects of planting date and environmental factors on fusarium ear rot symptoms and fumonisin B1 accumulation in maize grown in six North American locations, *Plant Pathol.*, (2012), 61: 1130-1142.
- Pereira P., A. Nescia, C. Castillo, M. Etcheverrya. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. *Biological Control*, (2010), 53(3):258–266.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* (1970) 55: 158-161
- Sennoi R., N. Singkham, S. Jogloy, S. Boonlue, W. Saksirirat, T. Kesmala, A. Patanothai, Biological control of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *Crop Protection*, (2013), 54:148-153.
- Singh S.P., H.B. Singh, Effect of consortium of *Trichoderma harzianum* isolates on growth attributes and *Sclerotinia sclerotiorum* rot of brinjal, *Veg. Sci.*, (2012), 39(2):144–148.
- Smith S.E., F.A. Smith, I. Jakobsen, Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake, *New Phytologist*, 162 (2004), pp. 511–524.
- Somani A.K., R.K. Arora, Field efficacy of *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* in consortium for control of *Rhizoctonia solani* causing black scurf disease of potato, *Indian Phytopathol.*, (2010), 63(1):23–25.
- Sousa C.S., A.C.F. Soares, M.S. Garrido. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, (2008), 65:50–55.
- Srivastava R., A. Khalid, U.S. Singh, A.K. Sharma, Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against

- Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici for the management of tomato wilt, *Biol. Control*, (2010), 53(1):24–31.
- Su Y. A., Ting, Jing Y. C. Chitinase and β -1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Available online 28 October 2014.
- Tchameni S.N., L. Nana-Wakam, M. Jemo, R. Fokom, C. Thé, D. Nwaga, Variation in growth and P uptake of maize cultivars colonized by arbuscular mycorrhizas on acid soil of Southern Cameroon, *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, (2009), 5:480–488.
- Tian H., R.A. Drijber, X. Li, D.N. Miller, B.J. Wienhold, Arbuscular mycorrhizal fungi differ in their ability to regulate the expression of phosphate transporters in maize (*Zea mays* L.), *Mycorrhiza*, (2013), 23:507–514.
- Venturini G., G. Assante, S. L. Toffolatti, A. Vercesi. Pathogenicity variation in *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in northern Italy. *Mycoscience*, (2013), 54(4):285–290.
- Yedidia M. Shores, Z. Kerem, N. Benhamou, Y. Kapulnik, I. Chet. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.*, (2003), 69:7343-7353.
- Zhao R., Wei Guo, Na Bi, Jiangyuan Guo, Lixin Wang, Ji Zhao, Jun Zhang, Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress, *Applied Soil Ecology*, (2015), 88:41–49.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

La importancia que tienen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente, destacando que aquellos microorganismos utilizados como inoculantes tienen un papel relevante en la agricultura. El desarrollo y uso de inoculantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial de los fertilizantes y plaguicidas agrícolas. Los microorganismos tienen un protagonismo destacado en el sistema suelo-planta, ya que desarrollan diversas actividades que afectan el crecimiento, la nutrición y la salud de la planta, además de beneficiar la calidad del suelo. El éxito o fracaso del uso de inoculantes microbianos radica es la variabilidad que presentan los microorganismos en las diferentes especies vegetales y en sus ambientes (tipo de suelo y presencia de poblaciones microbiana nativas).

Algunas especies microbianas tienen potencial biológico y genético para incrementar la productividad, y favorecer una agricultura sostenible. Tanto *Trichoderma* como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pueden representar una alternativa factible para reducir el uso de fungicidas en ambientes agrícolas de México.

La presente investigación muestra resultados contrastantes, ya que la interacción entre cepas de *Trichoderma* y los hongos fitopatógenos difiere con base en el mecanismo de inhibición. La mayoría de las confrontaciones mostró inhibición inicial de *Trichoderma* por *Fusarium* por posible antibiosis, pero posteriormente, *Trichoderma* mostró relaciones micoparasíticas. Lo anterior, permite establecer que la competencia es un mecanismo clave para el biocontrol de patógenos en condiciones *in vitro* entre *Trichoderma* y *Fusarium*;

además, las cepas de *Trichoderma* producen índoles como posible mecanismo para promover el crecimiento vegetal.

Las especies de *Trichoderma* tienen efectos diferenciales en el crecimiento de las plantas inoculadas con *Glomus intraradices*. Los resultados sugieren que ambos microorganismos pueden ser inoculados conjuntamente, pero algunas combinaciones, pueden beneficiar directamente a las plantas de maíz en corto plazo. Así mismo, la inoculación de *Fusarium* no redujo los parámetros agronómicos y nutrimentales de las plantas de maíz, en presencia o no de *G. intraradices* o de *Trichoderma*. No obstante, la presencia de *G. intraradices* estimuló la presencia de *Fusarium verticillioides* en la rizosfera de las plantas, pero no se observaron signos evidentes de la enfermedad en raíz, tallo o follaje. Paradójicamente, la combinación de *G. intraradices* con *F. verticillioides* produjo mayor materia seca en las plantas.

Con base en lo anterior, se concluye que se acepta parcialmente la hipótesis, ya que la combinación de *Glomus intraradices* y *Trichoderma*, presenta efectos positivos en los parámetros agronómicos evaluados en las plantas de maíz, pero la combinación de ambos microorganismos no tiene la capacidad antagónica hacia *Fusarium verticillioides* en la rizosfera en condiciones de invernadero, cuya presencia no produjo daños significativos en las plantas.

ANEXO 1

Medio líquido Luria-Bertani (Bric *et al.*, 1991) para determinación de producción de Ácido indol-ácetico (AIA).

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Triptófano	1 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL
Observaciones	
Ajustar pH a 7	

ANEXO 2

Reactivo Salkowski para revelar la producción de AIA

Reactivo	Cantidad
Ácido perclórico	35 mL
FeCl ₃ 0.5 M	2 mL
Agua destilada	63 mL

En 63 mL de agua destilada agregar 35 mL de ácido perclórico, luego agregar 2 mL de FeCl₃ 0.5 M. almacenar en frasco ámbar.