



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CONIDIAS A
NIVEL BIORREACTOR DE *Trichoderma virens* TVK1”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
DIANA ARTEMISA MORENO YÉPES

ASESOR DE TESIS:
D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

CO-ASESOR DE TESIS:
D.C. LEOBARDO SERRANO CARREÓN

OCTUBRE DEL 2012



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CONTENIDO

1 ABREVIATURAS	6
2 RESUMEN	7
3 ABSTRACT	8
4 INTRODUCCIÓN	9
4.1 Control biológico	9
4.2 Papel antagónico de <i>Trichoderma spp.</i> en el control biológico	10
4.3 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma sp.</i> en el control biológico	11
4.4 Importancia de las esporas en la comercialización de <i>Trichoderma sp</i>	12
4.5 Producción de <i>Trichoderma sp.</i> en diversos medios de cultivo	14
4.6 Ventajas del empleo de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 en el control biológico	16
5 JUSTIFICACIÓN	18
6 HIPÓTESIS	19
7 OBJETIVOS	20
7.1 Objetivo general	20
7.2 Objetivos particulares	20
8 MATERIALES Y MÉTODOS	21
8.1 Microorganismos	21
8.2 Medios de cultivo	21
8.3 Cultivo y propagación de las cepas de <i>Trichoderma</i>	23
8.4 Preparación del inóculo	24
8.5 Determinación de la concentración de conidias	24
8.6 Cinética de crecimiento en cultivo sumergido	25

8.7	Determinación del consumo de glucosa durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido	26
8.8	Determinación de la producción de biomasa durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido	26
8.9	Determinación de la viabilidad de conidias durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido	27
	9 RESULTADOS	29
9.1	Efecto de la concentración de NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno sobre el crecimiento, conidiación y viabilidad de <i>Trichoderma virens</i> TVK1	29
9.2	Efecto del uso del medio MTH (Medio <i>Trichoderma harzianum</i>) sobre el crecimiento, conidiación y viabilidad de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 y <i>Trichoderma virens</i> 29.8	33
	10 DISCUSIÓN	37
	11 CONCLUSIONES	43
	12 BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.2.1	Ventajas del uso de <i>Trichoderma spp.</i> como agente de biocontrol	11
Tabla 8.2.1	Esquema para la preparación del medio VMG sin NH ₄ NO ₃	22
Tabla 8.2.2	Esquema para preparar la solución de elementos traza	22
Tabla 8.2.3	Esquema para preparar MTH	23
Tabla 9.1	Concentración de conidias vivas de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 obtenidas en los medios NH12.5 y NH25	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.4.1	Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma sp</i>	13
Figura 4.4.2	Presentación comercial de conidias de <i>Trichoderma</i> (1000g)	14
Figura 8.5	Esquema de los cuadrantes de la Cámara de Neubauer	24
Figura 9.1.1	Documentación fotográfica de la producción de conidias en cultivo sumergido de <i>Trichoderma virens</i> TVK1	30
Figura 9.1.2	Documentación micrográfica de la formación de conidias en cultivo sumergido de la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1	30
Figura 9.1.3	Evaluación de la producción de biomasa y consumo de glucosa de la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1 por efecto de la concentración de NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno	31
Figura 9.1.4	Evaluación de la producción de conidias de la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1 por efecto de la concentración de NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno	32
Figura 9.1.5	Evaluación de la viabilidad de la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1 por efecto de la concentración de NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno	32
Figura 9.2.1	Documentación fotográfica de la producción de conidias en cultivo sumergido en el MTH de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 y <i>T. virens</i> 29.8	34
Figura 9.2.2	Documentación micrográfica de la formación de conidias en cultivo sumergido en el MTH de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 y <i>T. virens</i> 29.8	34
Figura 9.2.3	Evaluación de la producción de biomasa y consumo de glucosa de las cepas <i>Trichoderma virens</i> TVK1 y <i>Trichoderma virens</i> 29.8 por efecto del medio de cultivo MTH	35

Figura 9.2.4	Evaluación de la producción de conidias de las cepas <i>Trichoderma virens</i> TVK1 y <i>Trichoderma virens</i> 29.8 por el efecto del medio de cultivo MTH	36
Figura 9.2.5	Evaluación de la viabilidad de las cepas <i>Trichoderma virens</i> TVK1 y <i>T. virens</i> 29.8 por efecto del medio de cultivo MTH	36

1 ABREVIATURAS

°C	Centígrados
μL	Microlitros
C	Carbono
cm²	Centímetros cuadrados
esp	Esporas
g	Gramos
h	Horas
L	Litros
MAPK	Mitogen activated protein kinasa
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Militros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTH	Medio <i>Trichoderma harzianum</i>
N	Nitrógeno
NH 12.5	Medio Vogel Cloruro de amonio 12.5 mM
NH 25	Medio Vogel Cloruro de amonio 25 mM
P/V	Peso sobre Volumen
PDA	Agar Papa Dextrosa
rpm	Revoluciones por minuto
TDO	Tensión de Oxígeno Disuelto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VMG	Medio Vogel más Glucosa
vvm	Volumen <i>de aire</i> /Volumen <i>de líquido</i> · minuto

2 RESUMEN

“CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CONIDIAS A NIVEL BIORREACTOR DE *Trichoderma virens* TVK1”

D.A. Moreno Yépes, C. Cortés Penagos, L. Serrano Carreón.

El hongo del género *Trichoderma* tiene la propiedad de ser un controlador biológico sobre fitopatógenos presentes en suelos agrícolas, siendo el micoparasitismo su principal mecanismo de acción. Las conidias (forma de reproducción asexual) producidas por dicho género son el propágulo que presenta mayor resistencia ante adversidades ambientales y nutricionales, de ahí su importancia comercial. De modo tal que el uso de biorreactores permite producir conidias de forma masiva en cultivo sumergido, bajo condiciones controladas y en menor tiempo. Particularmente la cepa *Trichoderma virens* TVK1, la cual proviene de la delección del gen *tvk1* (que codifica para una MAPK) de la cepa silvestre *T. virens* 29.8, tiene la capacidad de producir mayor cantidad de enzimas líticas y presentar producción de conidias en cultivo sumergido, característica atípica de su parental. Por lo cual es importante conocer que los factores nutricionales están involucrados con el crecimiento y reproducción de los hongos, por ello se estudió el efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno (NH_4Cl) sobre la producción de conidias en cultivo sumergido a nivel biorreactor de la cepa *T. virens* TVK1. De tal forma que al aumentar en un 50% la concentración de NH_4Cl , también la producción de conidias se duplico, con una producción máxima de 1.20×10^8 esp/mL con una viabilidad final del 67.6%.

El MTH es un medio de cultivo formulado para la producción de conidias de *T.harzianum*. Considerando lo anterior se estudió el comportamiento de *T.virens* TVK1 y de *T.virens* 29.8 en dicho medio; al analizar la concentración de conidias se obtuvo 1.3×10^8 esp/mL (con pigmentación verde oscuro) y 2.1×10^8 esp/mL (pigmentación café-amarillo) respectivamente, indicando que la mutación afecta de manera cualitativa y no cuantitativa en la producción de conidias.

3 ABSTRACT

“CHARACTERIZATION OF CONIDIAL PRODUCTION BY *Trichoderma virens* TVK1 UNDER BIOREACTOR CONDITIONS”

D.A. Moreno Yépes, C. Cortés Penagos, L. Serrano Carreón.

Fungi of the genus *Trichoderma* has the property of being a biological control agent over phytopathogenic fungal species present in agricultural soils, mycoparasitism has been the principal mechanism of action. Conidias (asexual form) produced by this genus are the propagule that has greater resistance to environmental and nutritional adversity, for this reason has commercial importance. The use of bioreactors to produce massively conidia in submerged culture under controlled conditions and in less time has been extensively used. Particularly strain *Trichoderma virens* TVK1, which comes from the gene deletion *tvk1* (encoding a MAPK), has the ability to produce more lytic enzymes and production of conidia present in submerged culture, compared to its parental feature. Therefore it is important to know which nutritional factors are involved with growth and reproduction of fungi, therefore studied the effect of the concentration of the nitrogen source (NH_4Cl) on the production of conidia in submerged culture at bioreactor level. Increase of 50% in the concentration of NH_4Cl causes duplication in the amount of conidia, with a maximum concentration of 1.20×10^8 spore/mL with a final viability of 67.6%.

MTH is a formulated growth medium for the production of *T. harzianum* condias. Considering this behavior it was studied the influence of this media in the physiology of *T. virens* TVK1 and *T. virens* 29.8. The concentration of conidia obtained was 1.3×10^8 spore/mL (dark green pigmented) and 2.1×10^8 spores /mL (brown pigmentation -yellowish) respectively, indicating that the mutation affects qualitative and not quantitative at production of conidia.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 CONTROL BIOLÓGICO

El uso generalizado de herbicidas, insecticidas y fungicidas ha aumentado los riesgos y ha dado como resultado en perjuicios directos e indirectos para la salud humana, la vida silvestre y los ecosistemas. En la última década, el número de casos de intoxicación por plaguicidas en México ha crecido considerablemente (Piña & Ávila Forcada, 2005).

El control de plagas utilizando productos químicos se complica día a día por las desventajas que estos presentan en cuestión de salud pública, cada vez más consumidores demandan productos libres de agentes contaminantes y que sean alimentos orgánicos, por lo que el control biológico es considerado una gran alternativa para combatir problemas de plagas. Se entiende por control biológico “La reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural a través de la manipulación del ambiente del hospedero o de antagonistas del agente patógeno que se quiere controlar” (Baker & Cook, 1974).

Existen microorganismos capaces de ser controladores biológicos, entre los cuales podemos mencionar a los hongos y a las bacterias los cuales presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* también hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Vega, 2001). En el desarrollo del control biológico, los hongos entomopatógenos son los primeros agentes biológicos en ser utilizados como control de plagas. (Rodríguez, Gerding, & France, 2006)

Diversas plantas de importancia agrícola como la papa, el tomate, el café, algodón, repollo, plátano, chile, arroz, ajonjolí, caña de azúcar y otros, son amenazadas constantemente por diversas plagas; lo cual es un grave problema económico y alimenticio. Los insectos como plaga también son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por los hongos entomopatógenos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de estos hongos. Entre los más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*,

Zoophthora, Erynia, Eryniopsis, Akanthomyces,, Hirsutela, Hymenostilbe, Paecilomyces y Verticillium (Monzón, 2001).

4.2 PAPEL ANTAGÓNICO DE *Trichoderma spp.* EN EL CONTROL BIOLÓGICO

El género *Trichoderma* fue identificado en 1871 y ha sido ampliamente estudiado; es un hongo anaerobio facultativo microscópico, que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Dicho género está integrado por más de 30 especies ampliamente distribuidas en el mundo, en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos, principalmente en aquellos que son atacados por otros hongos. El desarrollo de *Trichoderma sp* se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente. De tal forma que su uso en el control biológico ha permitido una reducción en la aplicación de fungicidas químicos y por lo tanto un control más eficiente en patógenos causantes de enfermedades (Cruzat & Ionannldls, 2008). En la *Tabla 4.2.1* se mencionan las principales ventajas que se presentan al emplear a *Trichoderma spp* como controlador biológico sobre suelos agrícolas.

Especies de *Trichoderma* son frecuentemente componentes dominantes en la microflora del suelo en hábitats muy variados. Esto se puede atribuir a la diversa capacidad metabólica de las especies de *Trichoderma* y su natural competencia agresiva (Gams & Bissett, 1998).

La clasificación taxonómica ubica a *Trichoderma* dentro del Reino Fungi, División Mycota, Subdivisión Eumycota, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae y Género: *Trichoderma*. (Villegas, 2008). Las especies de *Trichoderma* tienen una gran actividad antagonista sobre patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* y *Fusarium oxisporum*, causantes de enfermedades importantes en cultivo de rábano, clavel, crisantemo, frijol, café, haba, tomate, y cítricos entre otros (Infante y col., 2009).

Tabla 4.2.1 Ventajas del uso de *Trichoderma spp* como agente de biocontrol.

Es un agente natural, no agresivo con plantas o suelos.
Aumenta la capacidad de crecimiento de la planta y le confiere mayor resistencia a condiciones de estrés (mayor desarrollo radicular).
Carece de toxicidad sobre las partes comestibles de los cultivos, asimismo aminora el daño al medio ambiente por la ausencia de químicos persistentes en el suelo.
Se aplica fácilmente mediante formulación líquida o sólida, pulverizándolo sobre el terreno o sobre la planta; no requiere de equipamiento especial para su aplicación.
Compatible con otros fungicidas, como el azufre.
Bajo costo, comparado con productos alternativos (extractos vegetales).
Compatible con inoculantes de leguminosas; es posible aplicarlo a semillas que han sufrido un tratamiento fungicida químico.
Por ser un habitante natural del suelo, su registro comercial suele ser más fácil que el de un producto químico.
El control biológico por <i>Trichoderma sp.</i> presenta ventajas como: especificidad, permanencia en el tiempo e inocuidad para el ser humano y el medio ambiente, ya que se realiza con organismos presentes naturalmente en los ecosistemas del país.
A diferencia del control biológico con insectos depredadores o parásitos, las formulaciones con microorganismos controladores son de más fácil aplicación.

(Cruzat & Ionannldls, 2008)

4.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma sp.* EN EL CONTROL BIOLÓGICO

Existen diferentes factores para promover la actividad de control biológico de *Trichoderma* hacia los fitopatógenos, entre los cuales se encuentran: la inactivación de las enzimas del patógeno, la competencia por el espacio y nutrientes, antibiosis, y el micoparasitismo (Benitez, Limón, & Codón, 2004). Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Haram y col., 1996; Zimand y col., 1996).

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Vega, 2001).

Se ha propuesto que el micoparasitismo es el factor antagónico principal de *Trichoderma sp.* el cual se define como como la utilización del patógeno como alimento por su antagonista estando implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, β 1,3-glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Vega, 2001).

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

La competencia como mecanismo de acción en el control biológico puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia (Vega, 2001).

En cambio, la antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. (Infante y col., 2009). La antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Vero & Mondino, 1999).

4.4 IMPORTANCIA DE LAS ESPORAS EN LA COMERCIALIZACIÓN DE *Trichoderma sp*

La especie *Trichoderma sp.* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (conidias) (Papavizas, 1985). Las esporas se caracterizan por tener una pared exterior gruesa, la cual se constituye a su vez por tres capas, endospora, epispora y perispora, que tienen

la función de proteger el interior de la espora. La gran diferencia entre las hifas y las clamidosporas es que la pared celular de estas es más delgada y no se divide en capas. La espora al tener una pared celular gruesa tiene la capacidad de aislarse del medio ambiente y de esta forma la oportunidad de sobrevivir a condiciones adversas, y cuando llegue el tiempo en que las condiciones sean ventajosas se proceda a la germinación. De esta forma las conidias funcionan como semillas que utiliza el hongo para colonizar nuevos sustratos. Por lo cual, las esporas son la principal forma de producción comercial de *Trichoderma sp* por ser el propágulo más viable (Lewis & Papavizas, 1993); (Eland & Kirshner, 1993).

Es importante conocer la morfología de *Trichoderma* para identificar a las conidias como la estructura de interés comercial. La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal, *Figura 4.4.1* (Infante y col., 2009)

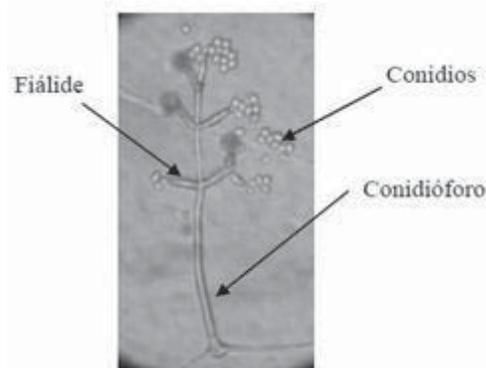


Figura 4.4.1 Conidios y conidióforos de *Trichoderma sp*.

En el mercado ya se encuentran productos a base *Trichoderma sp* para el control biológico, como es el caso de TRICHOBIOLOL (*Figura 4.4.2*) es un biofungicida a base de *Trichoderma lignorum*, el cual es antagonista de hongos fitopatógenos al producir una ruptura en las paredes hifales del hongo dañino seguida de la penetración de las hifas del antagonístico y su posterior esporulación. Se sabe que compite por espacio y coloniza los sistemas radiculares. También estimula la aparición y desarrollo de los pelos radiculares absorbentes. *Trichoderma lignorum* es un agente acelerador de la degradación de la materia orgánica en descomposición (Arias and Arias Bioinsumos, 2012).



Figura 4.4.2 Presentación comercial de conidias de *Trichoderma* (1000g).

La transición de micelio fúngico a esporas se determina por la interacción entre los elementos del medio ambiente, mediante el cual un factor por sí solo no es necesariamente suficiente para provocar el cambio; más bien, es la combinación de los factores que determinan el resultado. Las señales conocidas que influyen en la formación de conidios *Trichoderma* es: la luz, ritmos endógenos, la relación C: N, el pH del medio ambiente, calcio extracelular, lesión física al micelio y la presencia de hongos derivados de compuestos orgánicos volátiles (Steyaert y col., 2010).

4.5 PRODUCCIÓN DE *Trichoderma sp* EN DIVERSOS MEDIOS DE CULTIVO

Se ha reportado producción de conidias de *Trichoderma sp.* en cultivos sólidos entre los cuales se encuentran el PDA, salvado de trigo, el arroz, el cual ha sido empleado como sustrato base por la empresa Natural Control donde producen toneladas de biopreparados con *Trichoderma*, últimamente se han estudiado subproductos agroindustriales como cascarilla de algodón, cascarilla de arroz (Castro & Rivillas, 2003) (Vega, 2001), semillas de árboles con alto contenido de nutrientes (*Artocarpus incisa*) para enriquecer los sustratos, también se han utilizado subproductos de la industria azucarera con soportes sólidos como materiales celulósicos aprovechando la capacidad celulítica de *Trichoderma*; estas alternativas han sido estudiadas y

empleadas con el propósito de bajar los costos en la producción de biopreparados (Agamez & Zapata, 2008).

También han sido empleadas fermentaciones bifásicas para la producción de *Trichoderma spp* las cuales constan en preparar el inóculo en medio líquido, para posteriormente inocular con éste sustratos sólidos. En la Universidad de Talca se desarrolló un sistema semicontinuo de producción en laboratorio de las distintas cepas de *Trichoderma*. Básicamente consistió en un sistema de producción bifásico, con una primera fase de producción en medio líquido y una posterior en medio sólido, desde la cual se extraen las conidias para ser utilizadas. Este sistema utiliza como nutrientes una mezcla de granos (Cruzat & Ionannldls, 2008).

El estudio de la producción de conidias de *Trichoderma sp.* en medios líquidos ha estado teniendo gran relevancia por la enorme ventaja que esto representa en la producción de conidias para procesos de producción de forma masiva y en tiempos de producción más cortos, de ahí su importancia para su aplicación comercial.

El uso de medios líquidos ha sido estudiado en Venezuela donde reportan el empleo de melaza de trapiche de caña penelera fresca y levadura panadera granulada (*Saccharomyces cerevisiae*) como sustrato para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* en forma artesanal en condición estática (García & Durán, 2006). De igual forma se ha hecho uso de caldo dextrosa patata o caldo de Sabouraud con extracto de levadura y sulfato de estreptomicina para producir biomasa de *Trichoderma harzianum* a nivel matraz donde se producen hifas, conidias y clamidosporas, lo cual se integra con alginato y salvado de trigo para obtener un formulado en pellets. (Knudsen y col., 1991). También se ha hecho uso de medios VOGUEL, como el medio Voguel más glucosa y el Voguel más sacarosa (López-García, 2008) (Mendoza-Mendoza & Pozo, 2003). En el Instituto de Biotecnología de la UNAM han realizado investigaciones sobre la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* a nivel biorreactor, formularon un medio de cultivo líquido que tiene como fuente de carbono glucosa y como fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, logrando producciones de 5.4×10^8 esp/mL (Fernández-Sandoval, 2006).

Los biorreactores como equipo para la producción de *Trichoderma* tienen la función de proporcionar un ambiente controlado y estéril para el crecimiento de la especie biológica y formación de productos de interés. Las dimensiones de los biorreactores o fermentadores varían en tamaño desde 0.1-10 L (nivel laboratorio) o hasta 400,000 L (nivel industrial). Con fines de investigación el fermentador más empleado es el matraz con la gran ventaja de poder llevar acabo

un gran número de experimentos. Sin embargo, los fermentadores industriales presentan un alto grado de equipamiento, incluyendo sistemas de agitación y dispersión de aire para garantizar una buena oxigenación del medio y un eficiente mezclado, así como sensores para conocer el cambio de las variables del cultivo tales como: la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la concentración celular, entre otros (Galindo y col., 2007).

4.6 VENTAJAS DEL EMPLEO DE *Trichoderma virens* TVK1 EN EL CONTROL BIOLÓGICO

Trichoderma virens es un hongo del suelo ampliamente distribuido, siendo un parásito de otros hongos del suelo. La actividad micoparasítica de *T. virens* se correlaciona con la producción de numerosas actividades antifúngicas, incluyendo la secreción de un repertorio considerable de enzimas de degradación de la pared celular de hongos (Kim y col., 2002). Otra característica importante que ha sido estudiada de *T. virens* es la capacidad para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, un estudio describe que al inocular *T. virens* y *T. atroviride* en la raíz de la planta *Arabidopsis thaliana* se observó aumento en los brotes y crecimiento de las raíces, lo que conlleva a un mejor desarrollo de la planta. (Contreras-Cornejo y col, 2009). Es importante conocer que muchas de las cepas de *Trichoderma virens* pueden parasitar fitopatógenos importantes en la agricultura, como: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, y *Pythium sp.* Adicionalmente, esta especie produce una gran variedad de metabolitos antifúngicos y presentan la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, promoviendo así el fenómeno de resistencia cruzada (López-García, 2008).

En otro estudio se ha reportado la producción de peptaiboles por parte de *Trichoderma virens*, éstos son una clase de péptidos pequeños que tienen altas concentraciones del ácido α -aminoisobutírico, el cual es un antibiótico de importancia económica por sus propiedades antimicrobianas y propiedades contra el cáncer, así como su capacidad para inducir resistencia sistémica en plantas frente a la invasión microbiana (Mukherjee y col., 2011).

En células eucariotas como lo son las de *Trichoderma*, es conocido que las MAP cinasas, enzimas activadas por mitógenos, llevan a cabo la transducción de una gran variedad de señales externas para regular el crecimiento y diferenciación celular. Estudios en hongos fitopatógenos

indican que estas vías de transducción juegan un papel importante en la supervivencia, conidiación, proliferación, respuestas al estrés, fertilidad y patogenicidad. (Xu, 2000). Las cinasas de proteína activada por mitógenos traducen una variedad de señales en eucariotes, incluyendo levaduras, donde existen cinco genes que codifican para MAPK y transmiten señales para reproducción, crecimiento filamentoso, integridad celular, respuesta a estrés osmótico y formación de ascosporas. Por ejemplo, en el hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea*, han sido identificados tres genes que codifican para MAPK (Mukherjee y col., 2011).

Retomando el micoparasitismo y la producción de enzimas líticas como factores protagónicos en la función antagónica de las especies de *Trichoderma* contra fitopatógenos, cabe mencionar que la cepa *Trichoderma virens* 29.8 (silvestre) fue modificada genéticamente por la delección del gen *tvk1*, el cual codifica para una MAPK, con el fin de analizar si esta alteración disminuiría la capacidad micoparasítica, basándose en reportes para otros hongos. Se obtuvieron resultados donde se observó un claro incremento en el nivel de genes relacionados con el micoparasitismo comparado con la cepa silvestre. Dichos genes codifican para la producción de enzimas líticas como lo son β -1-3 glucanasas, β -1-6 glucanasas y proteasas, las cuales facilitan la penetración al huésped. El papel antagónico fue estudiado al confrontar directamente la cepa *Trichoderma virens* TVK1 contra la planta *Rhizoctonia solani* y la producción de enzimas líticas fue medida a partir del sobrenadante. Otra característica de gran interés de la mutante nula del gen *tvk1* es la capacidad de esporular en cultivo sumergido a nivel matraz, produciendo conidias con una pigmentación color verde oscuro, característica que no fue evidente con la cepa parental. De acuerdo con los resultados reportados se sugirió que el gen *tvk1* actúa como modulador negativo en el fenotipo de conidiación (Mendoza-Mendoza & Pozo, 2003).

En estudios preliminares se estudio la influencia del pH y la fuente de nitrógeno sobre la conidiación de *Trichoderma virens* TVK1 a nivel matraz, obteniendo que el amonio es una fuente de nitrógeno preferida sobre el nitrato por generar una producción mayor de biomasa, además se observó que la concentración de NH_4^+ regula directamente el fenotipo de conidiación ya que el transporte de NH_4^+ en *T. virens* esta acoplado a la expulsión de H^+ , por lo que la acidez resultado de este fenómeno es la condición que permite la diferenciación hacia la conidiación en cultivo sumergido de TVK1 (López-García, 2008).

5 JUSTIFICACIÓN

El género *Trichoderma* ha sido estudiado por su capacidad antagónica contra otras especies de hongos patógenos y es considerado un agente de control biológico. El uso de productos nobles para la naturaleza está siendo de primordial importancia para cooperar con el mantenimiento del equilibrio en el ecosistema, en este sentido el biocontrol es una alternativa en la elaboración de productos biotecnológicos de aplicación agrícola. La cepa *Trichoderma virens* TVK1 tiene la particularidad de ser más agresiva en el control biológico por tener una capacidad antagónica más elevada, por lo que resulta de gran interés implementar una producción a nivel biorreactor de las conidias de esta cepa para la elaboración de productos biológicos comerciales derivados de éste.

6 HIPÓTESIS

La concentración de NH_4Cl en el medio de cultivo tiene un efecto inversamente proporcional a la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 a nivel biorreactor, como se observó a nivel matraz.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 utilizando diferentes medios de cultivo a nivel biorreactor.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1.-Determinar la influencia que tiene la concentración de NH_4Cl como fuente de nitrógeno sobre la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 en cultivo sumergido a nivel biorreactor.

2.- Determinar la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 en medio MTH formulado para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*.

3.-Analizar la viabilidad de las conidias de *Trichoderma virens* TVK1 y 29.8 obtenidas en cultivo sumergido.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 MICROORGANISMOS

Las cepas *Trichoderma virens* TVK1 (mutante) y *Trichoderma virens* 29.8 (silvestre), utilizadas en los ensayos, fueron provistas por el CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

8.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- a) Agar Papa Dextrosa (PDA) (BD Bioxon), preparado según especificaciones del proveedor.
- b) Medio Mínimo VOGUEL (VMG), (López-García, 2008).

La preparación del VMG se llevó a cabo a partir de una solución stock 50X, para lo cual se disolvieron en 750mL de agua destilada las sales minerales siguiendo el orden que se muestra en la *Tabla 8.2.1*. La solución de los elementos traza se preparó por separado agregando las sales en el orden que muestra la *Tabla 8.2.2* y después se tomó la cantidad requerida para adicionarla a la solución anterior. La solución de biotina se preparó pesando 5.0mg y disolviendo en 50mL de agua destilada; después se tomó la cantidad requerida para adicionar a la solución de sales minerales primaria. Enseguida se aforó a 1000mL con agua destilada, y se almacenó la solución stock 50X a temperatura ambiente en un frasco de vidrio para su uso.

Tabla 8.2.1 Esquema para la preparación del medio VMG sin NH₄NO₃.

Compuesto	Fórmula	Cantidad del Reactivo (g/L)	Marca
Citrato de sodio dihidratado	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , 2 H ₂ O	125	J.T. Baker
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	250	MERCK
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	10	J.T. Baker
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	5	J.T. Baker
Elementos traza (snl.)	-----	5ml	-----
Biotina (snl.)	-----	2.5ml	-----

***Para preparar 1000 mL de VMG 50X**

Tabla 8.2.2 Esquema para preparar la solución de elementos traza.

Compuesto	Fórmula	Reactivo (g/100mL)	Marca
Ácido cítrico monohidratado	C ₆ H ₈ O ₇	5	Golden Bell
Sulfato de zinc, heptahidratado	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	5	Química MEYER
Sulfato ferroso amoniacal	Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	1	Golden Bell
Sulfato de cobre, pentahidratado	Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0.25	J.T Baker
Sulfato Manganoso	Mn SO ₄ , 1 H ₂ O	0.05	Golden Bell
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.05	MERCK
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0.05	MONTERREY

***Para preparar 100mL de solución**

Para preparar las dos versiones de VMG se pesaron 200g de glucosa respectivamente para cada solución y se disolvieron en agua destilada, enseguida se disolvió 6.6825g de NH₄Cl para la versión NH12.5 y para la versión NH25 se disolvió 13.365g de NH₄Cl; por último se agregaron 200mL de la solución stock 50X a cada versión, hasta llegar a un total de 9.9L, ya que del inóculo fueron 100mL y la suma nos da los 10L.

Medio *Trichoderma harzianum* (MTH)

Se fueron disolviendo las sales una a una sin agregar la siguiente antes de que se disolviera por completo la anterior, en el orden que se muestra en la *tabla 8.2.3* excepto el extracto de levadura que se agregó al final. La glucosa y el sulfato de amonio se disolvieron y esterilizaron por separado para incorporarlos posteriormente. Teniendo hasta aquí la cantidad de 9900mL entre las soluciones, para después completar los 10 000mL con los 100mL del inóculo.

Tabla 8.2.3 Esquema para preparar MTH.

Compuesto	Fórmula	Concentración (g/L)	Marca
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	30	Arancia- CPC, S. A de C. V
Sulfato de amonio	$(NH_4)_2SO_4$	5.6	Monterrey
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	7	Monterrey
Fosfato de sodio dibásico	Na_2HPO_4	2	Droguería Cosmopolita, S.A. de C. V.
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	1.5	Monterrey
Extracto de levadura		0.5	
Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.0671	J. T. Baker
Cloruro férrico hexahidratado	$Fe Cl_3 \cdot 6 H_2O$	0.008	J. T. Baker
Sulfato de zinc heptahidratado	$Zn SO_4 \cdot 7 H_2O$	0.0001	J. T. Baker

8.3 CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma*

Se tomaron bloques de $1cm^2$, a partir de una colonia madura de cada una de las cepas, para inocular placas de PDA colocando el bloque en el centro de la caja y sellándola con PARAFILM para evitar contaminaciones. Posteriormente se incubaron a una temperatura de $28^\circ C$ por un periodo de 6 días bajo luz constante.

8.4 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se realizó la cosecha de las conidias de *Trichoderma* después de 6 días de incubación, agregando 5mL de agua destilada-estéril a cada caja y raspando suavemente con una espátula estéril la superficie de la colonia, suspendiendo las conidias sin arrastrar demasiado micelio. Dicha suspensión se tomó con una jeringa estéril y se pasó a través de un filtro MILLIPORO con una malla del número 20, recibiendo la suspensión en un matraz Erlenmeyer estéril de 100mL para tener una marca de aforo aproximada.

8.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONIDIAS

Las conidias en suspensión se cuantificaron con la ayuda de una cámara de Neubauer (Improved Bright-Line BRAND), para lo cual se llevó a cabo una dilución conocida de la suspensión de conidias, y se tomó una alícuota de 20 μ L de dicha dilución y se colocó en un extremo de la cámara. Para la cuenta final se tomaron en cuenta los cuadrantes en color azul como lo muestra la *Figura 8.5*.

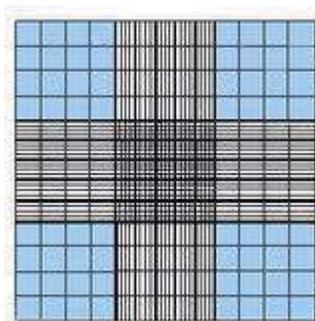


Figura 8.5 Esquema de los cuadrantes de la Cámara de Neubauer. Las conidias de *Trichoderma* fueron cuantificadas utilizando los cuadrantes marcados con azul.

Se usó la siguiente ecuación para obtener la concentración total final de conidias en la suspensión.

$$(\text{Promedio del No. de conidias})(10000)(F.D.) = \text{esp/mL}$$

Donde: **Promedio** corresponde al número de conidias que se encuentran en los cuadrantes azúles (*Figura 8.5*) dividido entre cuatro, **10000** es una constante, **F.D.** es el factor de dilución y **esp/mL** es el número de conidias que se encuentran en 1mL de la suspensión a valorar.

8.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO SUMERGIDO

Se usaron fermentadores Microferm New Brunswick Scientific Co. Inc., modelo MF-114 conteniendo 10L de medio de cultivo líquido bajo una temperatura de 28°C. Fueron empleados 3 impulsores Rushton de 0.5 (relación diámetro de impulsor /diámetro de tanque) con una agitación de 400 rpm y una aireación de 0.5 vvm. Se aplicó un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420) calibrado a 100% para medir la tensión de oxígeno disuelto (TDO) y se conectó a un amplificador de TOD para monitorearlo.

El monitoreo del pH del cultivo se realizó con un electrodo esterilizable (Ingold, modelo 2300) conectado a un transmisor-controlador de pH. El pH se mantuvo en un intervalo de entre 5.4 y 6 con un valor óptimo de 5.75 por medio de la adición automática de NaOH 2N estéril y HCl 2N estéril mediante una bomba peristáltica (Cole-Palmer, modelo 7014-20).

La espuma fue controlada por la adición de antiespumante estéril (Clerol AF, Dow Corning, 30% P/V), mediante un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica.

Los medios de cultivo fueron inoculados con 1×10^6 esp/mL y tuvieron una duración de 84h. Se tomó muestra cada 12h y se evaluó concentración de conidias, consumo de glucosa, biomasa y viabilidad, ésta última solo fue valorada a partir de las 36h ya que es cuando comenzó a ser evidente la producción de conidias.

8.7 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA DURANTE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO SUMERGIDO

El consumo de glucosa se determinó por medio del equipo analizador YSI 2700 SELECT, el cual tiene el siguiente principio: La tecnología de sensores enzimáticos, que emplea uno o más enzimas llevan a cabo reacciones catalíticas que al final producen peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es electroquímicamente oxidado en el ánodo de platino de la sonda electroquímica. La sonda electroquímica produce una señal eléctrica.

De acuerdo a lo anterior, la determinación de glucosa es una lectura de la dextrosa en solución por la enzima del sensor. La enzima de glucosa oxidasa inmovilizada en la membrana de dextrosa del YSI.

La reacción es la siguiente:



Para tal determinación se tomó 1mL del caldo de fermentación y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5mL, se centrifugó la muestra (12 000rpm)/3min, y se recupero el sobrenadante, después se realizó una dilución de concentración conocida, en caso de ser necesaria, ya que el analizador YSI realiza mediciones de glucosa confiables en un rango lineal de hasta 25 g/L. Por último se siguieron las indicaciones del manual para poder operar el analizador YSI, y esperar a que el equipo arroje el resultado en unidades g/L.

8.8 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DURANTE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO SUMERGIDO

La biomasa o crecimiento se determinó por el método de Peso Seco. Para lo cual se cortó un pliego de papel filtró (WHATMAN #1) en círculos con un diámetro de 47mm, se colocaron en una estufa a 84°C/24h y posteriormente se llevaron a un desecador por 2h, enseguida se pesó cada filtró en una balanza analítica y se registró el peso. Dicho protocolo nos garantiza un peso constante en los filtros.

Se tomaron 10g aproximadamente de cada muestra registrando el peso de cada una, y se filtró al vacío con los filtros ya a peso constante. Una vez filtradas las muestras se llevaron a la estufa bajo las mismas condiciones para llevar a peso constante los filtros, y así obtener el peso constante de las muestras. Se usó la siguiente ecuación para determinar la biomasa.

$$\text{Biomasa} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(Wp + m)(g) - (Wp)(g)}{\text{Volumen de la muestra (mL)}} * \frac{1000 (mL)}{1 \text{ litro}}$$

Donde:

$Wp+m$ = peso del papel filtro, más el peso de la muestra

Wp = peso del papel filtro

Volumen de la muestra

8.9 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CONIDIAS DURANTE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO SUMERGIDO

Para el estudio de la viabilidad de las conidias primero se determinó la cuenta viable, para lo cual se filtró la muestra a través de un filtro MILLIPORE con una malla del número 20. Enseguida se realizaron diluciones de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} , sólo se analizaron las diluciones de 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} . Se tomó una alícuota de $100 \mu\text{L}$ de la dilución y se inoculó en una caja con PDA enseguida se distribuyó dicho inóculo con perlas de cristal hasta que el medio lo adsorbiera por completo; se retiraron las perlas y se incubaron las cajas a 28°C por 48h. Las unidades formadoras de colonias fueron contabilizadas en cada caja y se calculó un promedio. Cada dilución se analizó por triplicado y solo se tomaron en cuenta aquellas cajas en las que era posible contar las colonias.

Ejemplo: En las placas con dilución 1×10^{-6} se contaron en promedio 9 colonias, lo que indica que se tienen 9×10^6 UFC, considerando que se sembró $100 \mu\text{L}$ de la muestra la cuenta viable se determina con la siguiente ecuación:

$$[(9 \times 10^6 \text{ UFC}) / (100 \mu\text{L})] / [(1000 \mu\text{L}) / (1 \text{ mL})] = 9 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

Por último para determinar la viabilidad se tomó el valor de la cuenta total de conidias y se sacó el porcentaje con la siguiente ecuación:

$$\frac{(A)(100)}{B} = \text{Viabilidad (\%)}$$

Donde:

A= cuenta viable (UFC/mL)

B= cuenta total (esp/mL)

9 RESULTADOS

9.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NH_4Cl COMO FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO, CONIDIACIÓN Y VIABILIDAD DE *Trichoderma virens* TVK1

En estudios anteriores realizados a nivel matraz ya se había identificado que usar NH_4Cl como fuente de nitrógeno era una buena alternativa para la producción de conidias de *T.virens* TVK1 y que la concentración de dicha sal también afectaba en la producción de las mismas, obteniendo que a una concentración de 12.5 mM de NH_4Cl presentaba el fenotipo de conidiación y no así con la concentración 25 mM (López-García, 2008). Con estos antecedentes, se realizaron ensayos a nivel biorreactor con el fin de observar si el comportamiento era similar.

Para estudiar si la concentración de NH_4Cl tenía algún efecto en particular a nivel biorreactor sobre el crecimiento, fenotipo de conidiación y viabilidad de *T. virens* TVK1; se prepararon dos versiones de VMG usando NH_4Cl como fuente de nitrógeno, una con una concentración a 12.5 mM y la otra a 25 Mm (ver materiales y métodos). El consumo de glucosa (como fuente de carbono), la biomasa y la cuenta total de conidias fueron monitoreados cada 12h; mientras que la viabilidad de éstas últimas se realizó a partir de las 36h de cultivo. También se documento fotográficamente la producción de conidias a las 36h, 60h y 84h de incubación en donde se puede observar progresivamente el fenotipo de conidiación por la aparición de un color verde oscuro típico de estas estructuras (*Figura 9.1.1*) La formación de conidias fue observada en fresco al microscopio (40X) a las 36h y a las 84h de incubación. En la *Figura 9.1.2* correspondiente a las 36h de cultivo se observa para ambas condiciones la producción de micelio tabicado y algunas conidias suspendidas. Por otra parte, a las 84h se hace evidente la presencia de clamidoconidias y una alta concentración de conidias en suspensión.



Figura 9.1.1 Documentación fotográfica de la producción de conidias en cultivo sumergido de *Trichoderma virens* TVK1. Conidias de *T. virens* TVK1 fueron inoculadas en el biorreactor conteniendo A) versión NH 12.5 del Medio VMG o B) versión NH 25 del Medio VMG. Cada fermentación fue monitoreada a las 36h, 60h y 84h de incubación.

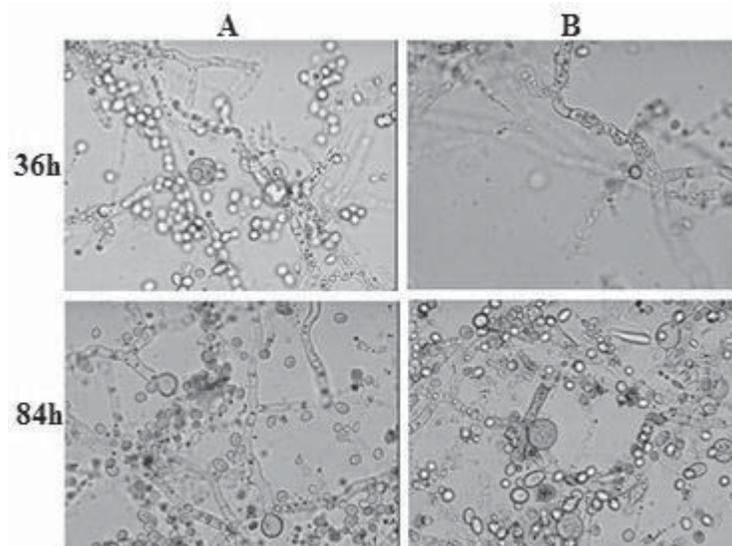


Figura 9.1.2 Documentación micrográfica de la formación de conidias en cultivo sumergido de la cepa *Trichoderma virens* TVK1. Muestras crecidas en A) versión NH 12.5 del Medio VMG o B) versión NH 25 del Medio VMG fueron observadas al microscopio (40X) a las 36h y 84h de crecimiento.

En el ensayo de crecimiento se obtuvo una producción máxima de biomasa de 3.84 g/L en la condición NH12.5 a las 72h. La glucosa se consumió casi por completo a partir de las 60h lo cual también se refleja en el inicio de la fase estacionaria que presenta la producción de biomasa en el mismo tiempo. En la condición NH25 se produjo como máximo 4.88 g/L de biomasa a las 84h y la glucosa también alcanzo niveles bajos a partir de las 60h (*Figura 9.1.3*)

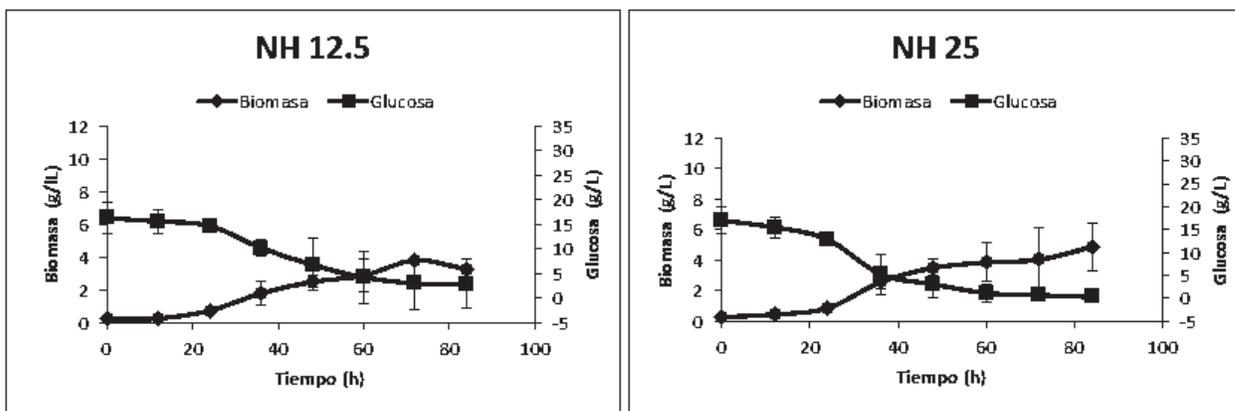


Figura 9.1.3 Evaluación de la producción de biomasa y consumo de glucosa de la cepa *Trichoderma virens* TVK1 por efecto de la concentración de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Se inocularon conidias de *T. virens* TVK1 en las dos versiones del VMG con la concentración 12.5mM y 25mM de NH_4Cl , para comparar el crecimiento de las 0h hasta 84h.

Respecto a la producción de conidias se obtuvo en la condición NH12.5 una cuenta total de 6.94×10^7 esp/mL y en la condición NH25 una concentración de 1.20×10^8 esp/mL. Ambos resultados corresponden a las 84h de cultivo donde se logró la cuenta más alta. Con ambas concentraciones se observó un comportamiento similar en las cinéticas, donde se presenta una fase de adaptación en las primeras 24h y una fase estacionaria en el lapso de 60h hasta 84h, que es el momento en que la concentración de conidias es mayor (*Figura 9.1.4*).

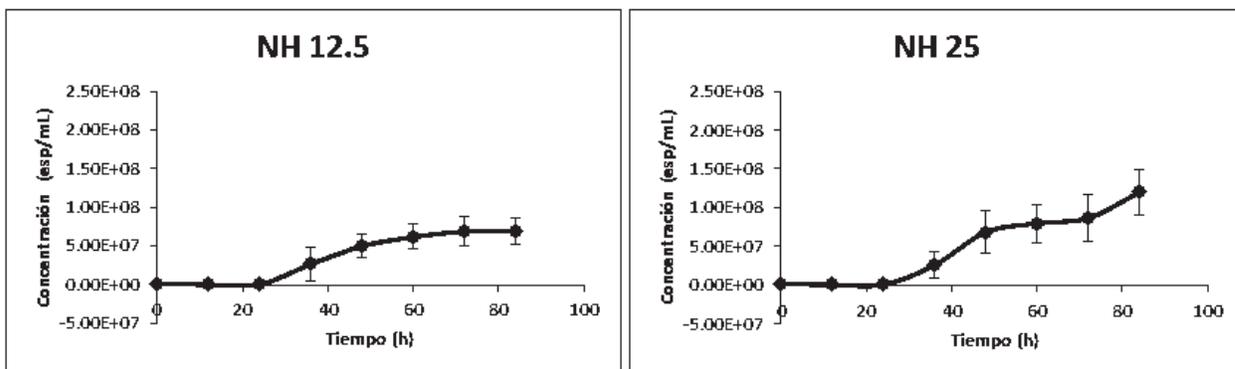


Figura 9.1.4 Evaluación de la producción de conidias de la cepa *Trichoderma virens* TVK1 por efecto de la concentración de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Se inocularon conidias de *T. virens* TVK1 en las dos versiones del VMG con la concentración 12.5mM y 25mM de NH_4Cl , para comparar la producción de conidias de las 0h hasta las 84h.

La viabilidad se analizó con el fin de tener una relación porcentual de las conidias que sobrevivieron al proceso de fermentación en los diferentes tiempos. El monitoreo inició a partir de las 36h, cuando ya era evidente la producción de conidias, en la condición NH12.5 se logró una viabilidad máxima del 91.48% a las 36h y una mínima de 61.30% a las 84h. Mientras que para la condición NH25 alcanzó una viabilidad máxima de 85.36% a las 36h y una mínima de 61.72% a las 72h, con dichos datos es más fácil identificar en cual tiempo se obtienen mejores rendimientos (Figura 9.1.5). En la Tabla 9.1 se encuentra la comparación de las conidias vivas calculadas entre los medios con las condiciones NH12.5 y NH25.

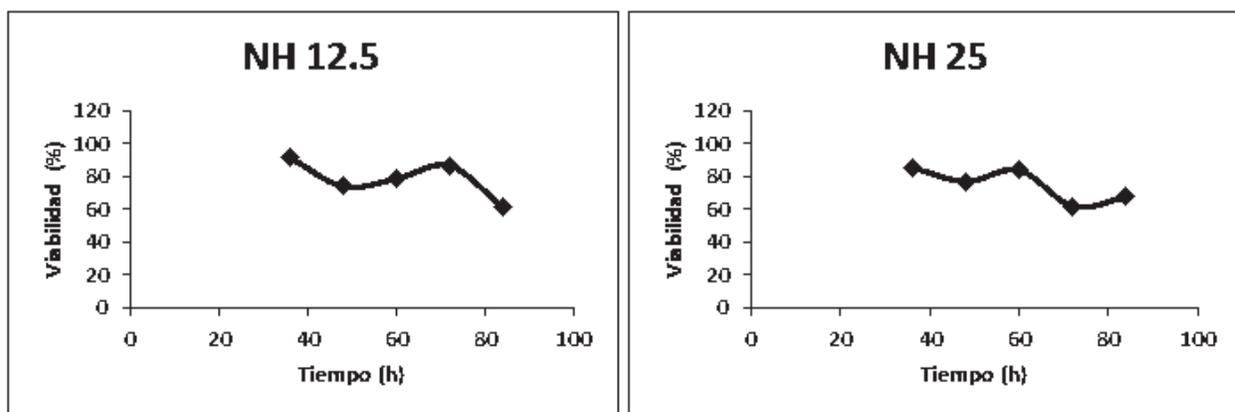


Figura 9.1.5 Evaluación de la viabilidad de la cepa *Trichoderma virens* TVK1 por efecto de concentración de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Se inocularon conidias de *T. virens* TVK1 en las dos versiones del VMG con la concentración 12.5mM y 25mM de NH_4Cl , para comparar la viabilidad de las 36h hasta las 84h.

Tabla 9.1 Concentración de conidias vivas de *Trichoderma virens* TVK1 obtenidas en los medios NH12.5 y NH25.

Concentración	Esporas Totales (esp/mL)	Viabilidad (%)	Esporas vivas (esp/mL)
NH12.5	6.94×10^7	61.30	4.25×10^7
NH25	1.20×10^8	67.57	8.1×10^7

*A las 84h de incubación

9.2 EFECTO DEL USO DEL MEDIO MTH (Medio *Trichoderma harzianum*) SOBRE EL CRECIMIENTO, CONIDIACIÓN Y VIABILIDAD DE *Trichoderma virens* TVK1 y *Trichoderma virens* 29.8

El MTH ha sido formulado para una alta producción de conidias de la cepa *Trichoderma harzianum* en el IBT (Instituto de Biotecnología) de la UNAM, por lo cual se optó por estudiar que efecto tenía en la producción de conidias de las cepas *Trichoderma virens* TVK1 y *T. virens* 29.8, considerando que la composición de éste medio respecto al medio VMG en sus dos versiones (NH12.5 y NH25) tiene diferencias significativas en la concentración y presencia de algunas de las sales, principalmente la fuente de nitrógeno que en éste caso es $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ver materiales y métodos). El ensayo consistió en mantener los parámetros anteriormente usados como: pH, agitación, temperatura, TOD, cambiando sólo el medio de cultivo. Para lo cual se preparo el MTH y fue inoculado con conidias de *T. virens* TVK1 y *T. virens* 29.8 respectivamente. El consumo de glucosa, la biomasa y la cuenta total de conidias fue monitoreado cada 12h, y a partir de las 36h se monitoreo la viabilidad de las mismas. También se documento fotográficamente la producción de conidias de ambas cepas a las 36h, 60h y 84h de incubación en donde se puede observar progresivamente el fenotipo de conidiación en color verde-pálido y café-amarillo de *T.virens* TVK1 y *T.vires* 29.8 respectivamente (*Figura 9.2.1*) La formación de conidias fue observada en fresco al microscopio (40X) a las 36h y a las 84h de incubación. En la *Figura 9.2.2A* correspondiente a las 36h de cultivo de la cepa TVK1 se observó abundante producción de micelio y una limitada presencia de conidias. En esta misma figura a las 84h se observaron conidias suspendidas. Para la cepa silvestre 29.8 (*Figura 9.2.2B*) a las 36h se observó la presencia de micelio y de conidias en suspensión; y a las 84h la concentración de conidias suspendidas era mayor y se observó una disminución en la presencia de micelio.



Figura 9.2.1 Documentación fotográfica de la producción de conidias en cultivo sumergido en el MTH de *Trichoderma virens* TVK1 y *T. virens* 29.8. Biorreactores conteniendo el Medio formulado para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* (MTH) fueron inoculados con A) *T.virens* TVK1 o B) *T.virens* 29.8 . Cada fermentación fue monitoreada a las 36h, 60h y 84h de incubación.

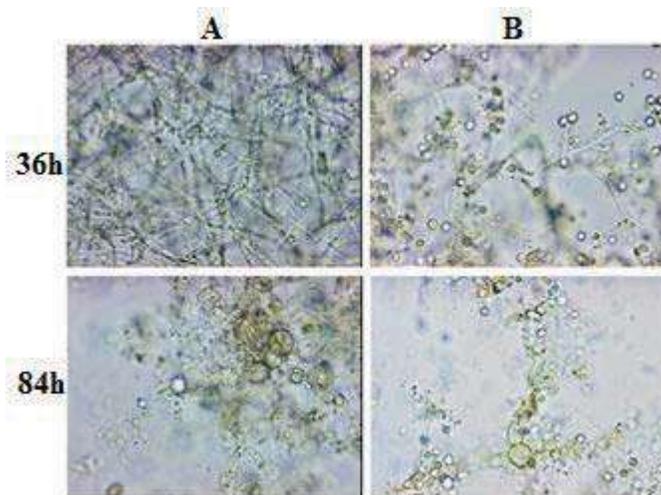


Figura 9.2.2 Documentación micrográfica de la formación de conidias en cultivo sumergido en el MTH de *Trichoderma virens* TVK1 y *T. virens* 29.8. Muestras crecidas en el Medio formulado para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* (MTH) inoculadas con A) *Trichoderma virens* TVK1 o B) *Trichoderma virens* 29.8 fueron observadas al microcopio (40X) a las 36h y 84h de crecimiento.

Respecto al crecimiento los resultados nos muestran que la cepa *Trichoderma virens* TVK1 logró una producción de biomasa en el MTH de 7.3 g/L y la cepa *T. virens* 29.8 de 7 g/L también a las 84h de incubación. La concentración de glucosa se redujo a prácticamente 0 a partir de las 60h en ambos ensayos y por lo tanto se puede observar que a partir de este tiempo de cultivo la producción de biomasa se encuentra en una fase estacionaria. (Figura 9.2.3)

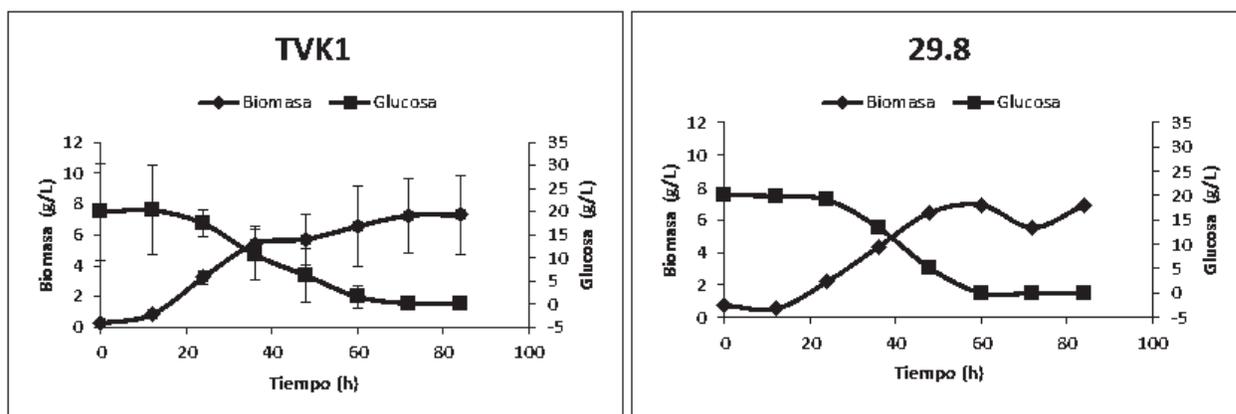


Figura 9.2.3 Evaluación de la producción de biomasa y consumo de glucosa de las cepas *Trichoderma virens* TVK1 y *Trichoderma virens* 29.8 por efecto del medio de cultivo MTH. Se inocularon conidias de *T. virens* TVK1 o *T. virens* 29.8 en el medio formulado para la producción de conidias de *T. harzianum* (MTH), y comparar el crecimiento de las 0h hasta las 84h.

Se encontró que con MTH la concentración de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 llegó hasta 1.3×10^8 esporas/mL y con *T. virens* 29.8 obtuvimos 2.1×10^8 esporas/mL a las 84h de cultivo. El comportamiento de estas cinéticas nos muestra que a partir de las 60h se llega a una fase estacionaria donde la concentración de conidias se encuentra prácticamente estable (Figura 9.2.4)

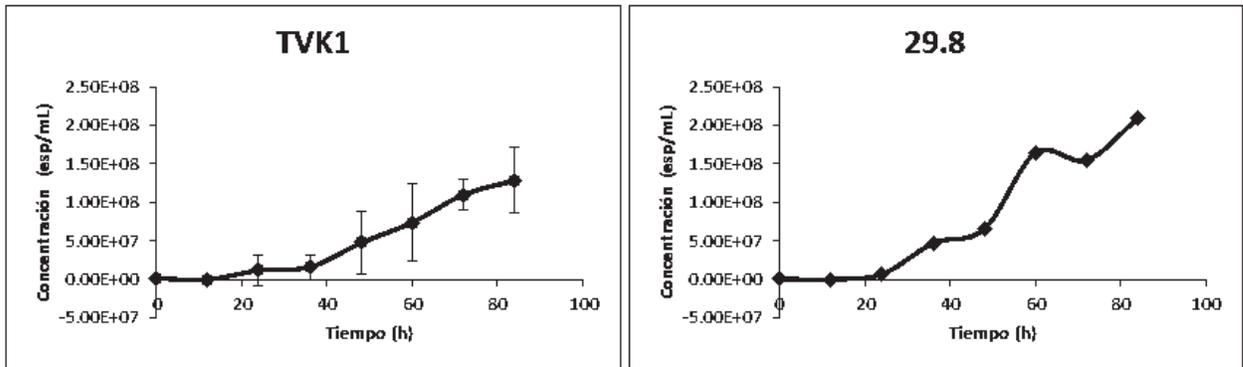


Figura 9.2.4 Evaluación de la producción de conidias de las cepas *Trichoderma virens* TVK1 y *Trichoderma virens* 29.8 por efecto del medio de cultivo MTH. Se inocularon conidias de *T. virens* TVK1 o *T. virens* 29.8 en el medio formulado para la producción de conidias de *T. harzianum* (MTH), y comparar la producción de conidias de las 0h hasta las 84h.

La determinación de la viabilidad se realizó con el fin de comparar cual de las dos especies de conidias eran más resistentes al proceso de fermentación. La viabilidad de las conidias de *Trichoderma virens* TVK1 con el MTH fue de 77.32% como máximo en las 36h, y una viabilidad mínima de 52.65% en las 84h. Mientras que con la cepa *T.virens* 29.8 se consiguió una viabilidad máxima de 61.16% a las 84h y una mínima de 10.58% a las 36h (*Figura 9.2.5*)

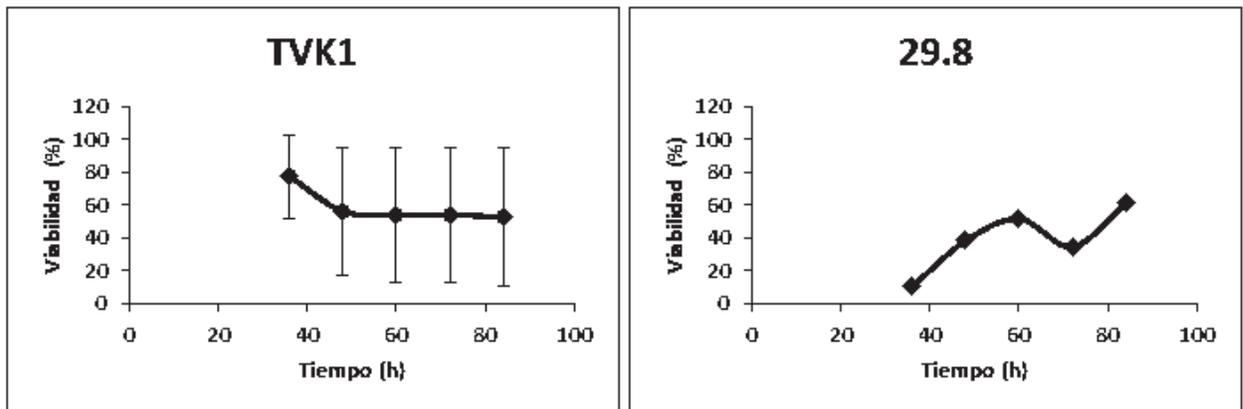


Figura 9.2.5 Evaluación de la viabilidad de las cepas *Trichoderma virens* TVK1 y *T. virens* 29.8 por efecto del medio de cultivo MTH. Se inocularon conidias de *T. virens* TVK1 o *T. virens* 29.8 en el medio caracterizado para la producción de conidias de *T. harzianum* (MTH), y comparar la viabilidad de las 36h a las 84h.

10 DISCUSIÓN

Múltiples especies de *Trichoderma* han sido usadas como agentes de control biológico sobre una gran variedad de hongos fitopatógenos presentes en suelos agrícolas. (Papavizas, 1985). De modo que *Trichoderma* sp. produce tres tipos de propágulos que son efectivos contra fitopatógenos: hifas, clamidioconidias y conidias, siendo estas últimas las más utilizadas por presentar mayor viabilidad y mayor resistencia a la manipulación para su formulación comercial (Fernández-Larrea, 2002).

Se ha estudiado la producción de conidias de *Trichoderma* sp. en diversos medios de cultivo, los más comunes son los medios sólidos como PDA, salvado de trigo, el arroz, subproductos agroindustriales como cascarilla de algodón, cascarilla de arroz, semillas de árboles con alto contenido de nutrientes (Agamez & Zapata Navarro, 2008). También en subproductos de la industria azucarera con soportes sólidos como materiales celulósicos. Entre los medios líquidos donde ha sido estudiado la producción de *Trichoderma* sp podemos mencionar la melaza de trapiche de caña penelera fresca y levadura panadera granulada (*Saccharomyces cerevisiae*), (García & Durán, 2006). El caldo dextrosa patata o caldo de Sabouraud con extracto de levadura y sulfato de estreptomicina también se ha utilizado para la producción de conidias de *Trichoderma* sp. En el Instituto de Biotecnología de la UNAM ha sido estudiado la producción de conidias de la cepa *Trichoderma harzianum*, donde formularon un medio líquido que tiene como fuente de carbono glucosa y como fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (Fernández-Sandoval, 2006).

Hablando específicamente de la cepa *Trichoderma virens* TVK1 es considerada un mejor agente antagónico contra especies fitopatógenas, por mostrar un claro incremento en la producción de enzimas líticas comparado con la cepa silvestre, además de tener la particularidad de producir conidias en medio líquido a nivel matraz, lo cual no se presenta con la cepa parental; dichas conidias muestran un color verde intenso, pigmentación que se desarrolla en micelio aéreo sobre cultivo sólido. La cepa TVK1 ha mostrado ventajas relevantes para su comercialización por el alto porcentaje de sobrevivencia que presenta en plantas de algodón que fueron infectadas con *Pythium ultimum*, y que al ser tratadas con la cepa silvestre el porcentaje de sobrevivencia fue del 20%, incrementándose hasta un 70% al implementar la cepa mutante, porcentaje que es incluso más alto que el obtenido con el fungicida comercial Apron (Mendoza-Mendoza & Pozo, 2003).

En estudios preliminares se determinó que la concentración de NH_4Cl como fuente de nitrógeno tenía impacto con la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 a nivel matraz, observando que a una concentración de 12.5 mM el fenotipo de conidiación estaba claramente presente, no así con la concentración de 25 mM. Se propuso que la concentración del ión NH_4^+ en el medio, tiene una influencia con la acidificación del mismo, probablemente a través de un transporte (antiporte) acoplado a H^+ . De manera que al verse disminuido el nivel de pH hasta 3, el fenotipo de conidiación fue inhibido indirectamente usando la concentración 25 mM (López-García, 2008).

En el presente trabajo se realizaron ensayos a nivel biorreactor y determinar las condiciones para obtener conidas de la cepa *T.virens* TVK1.

Se prepararon dos versiones del medio VMG (NH12.5 y NH25) variando la concentración de NH_4Cl , uno con una concentración de 12.5 mM y el otro a una concentración de 25mM, en biorreactores con una capacidad de 10L, los cuales fueron inoculados con 1×10^6 esp/mL de *T. virens* TVK1, con una concentración inicial de glucosa de 20 g/L, a una temperatura de 28°C, implementando una agitación de 400 rpm, una aireación de 0.5 vvm y un pH controlado entre intervalo de 5.4-6, valores que corresponden con Lejeune y Nielsen, donde mencionan que el crecimiento de *Trichoderma* es generalmente óptimo entre pH 4 y 6.5 sólo algunas especies de *Trichoderma* llegan a tolerar valores de pH menores a 3 (Lejeune & Nielsen, 1995).

Al evaluar el crecimiento a través de la producción de biomasa y comparando las dos versiones de VMG, se obtuvo con NH12.5 una concentración máxima de 3.84 g/L a las 72h de incubación y para NH25 la máxima concentración de biomasa fue de 4.88 g/L a las 84h, (Figura 9.1.3) mostrando un ligero incremento de 1.04 g/L (21.31%) de un medio a otro, indicando que la concentración de NH_4Cl afecta en la producción de biomasa. En cuanto al consumo de glucosa se observó que en ambos medios de cultivo a partir de las 60h comienza la fase estacionaria donde dicho carbohidrato se encuentra en concentraciones bajas de 4.28 g/L para la condición NH12.5 y de 1.17 g/L para la condición NH25 (Figura 9.1.3). Este comportamiento en la cinética nos indica que a las 60h *T. virens* TVK1 se encuentra en niveles nutricionales estresantes. Observando también que en NH25 la concentración de glucosa se agotó casi en su totalidad a las 84h (0.293 g/L), y con NH12.5 la concentración final fue de 2.93 g/L. Lo que nos lleva a concluir que la glucosa se metaboliza más rápido bajo la condición NH25, ya que al tener mayor disposición de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, se hace uso de energía

para su fabricación, y al encontrarse presentes en la célula como en el caso de las proteínas aumenta su actividad y con ello el gasto energético.

En cuanto a la producción de conidias en las versiones NH12.5 y NH25, fue de 6.94×10^7 esp/mL y 1.20×10^8 esp/mL respectivamente, (*Figura 9.1.4*) duplicándose prácticamente la concentración de las mismas lo que demuestra que la concentración de NH_4Cl tiene influencia directamente proporcional con el fenotipo de conidiación bajo las condiciones antes mencionadas, ya que el hongo al tener mayor disponibilidad de nitrógeno fue más capaz de producir mayor cantidad de biomasa y posteriormente dicha biomasa ser transformada en conidias. Al comparar dichos resultados con los estudios preliminares a nivel matraz, donde el pH no fue controlado (López-García, 2008) y no se logró obtener producción de conidias en la condición NH25, nos lleva a concluir que las condiciones a nivel biorreactor y nivel matraz son poco comparables ya que con el primero se pueden controlar variables de gran importancia como lo es el pH, no siendo así a nivel matraz. En relación con el fenotipo de conidiación en la *Figura 9.1.1* se observa su presencia en ambos medios mostrando una coloración verde intensa y en la *Figura 9.1.2* es evidente la presencia de conidias y clamidoconidias en ambas condiciones (NH12.5 y NH25), lo que demuestra que la concentración de NH_4Cl no afectó en la formación de las mismas cualitativamente hablando. En otras investigaciones sobre la producción de conidias de *Trichoderma spp* en sustratos sólidos se muestra un comportamiento similar en cuanto a la concentración de la fuente de nitrógeno, en el cual se utilizó urea como fuente de nitrógeno y se obtuvo que a concentraciones de 1% se frenó el proceso de crecimiento para dar paso a una mayor esporulación que la obtenida en los medios que presentaban concentraciones de urea al 0.1% (Agamez Elkin y col., 2008).

El ensayo de viabilidad tiene el propósito de mostrar la relación porcentual de las conidias que sobrevivieron al proceso de fermentación en los diferentes tiempos y con ello comparar los rendimientos entre las dos versiones de VMG (NH12.5 Y NH25). La *Figura 9.1.5* nos muestra que con la condición NH12.5 se obtuvo una viabilidad del 91.48% (máxima) a las 36h y de 61.30% (mínima) a las 84h. Mientras que para la condición NH25 alcanzó una viabilidad de 85.36% (máxima) a las 36h y de 61.72% (mínima) a las 72h. Con estos resultados observamos que la viabilidad tiende a decrecer conforme pasa el tiempo, esto puede deberse a que las condiciones nutricionales cada vez son menos favorables para las conidias y por lo tanto no todas logran sobrevivir al estrés que enfrentan en el biorreactor. En otros estudios realizados a nivel

biorreactor en cultivo sumergido, se reportaron viabilidades de conidias de *T. harzianum* mayores al 60% (Fernández Sandoval, 2006) coincidiendo con las viabilidades reportadas con la cepa *T. virens* TVK1, y en otra investigación en la que se utilizó olote como sustrato para la producción de conidias de *T. harzianum* Rifai se obtuvo una alta viabilidad del 90% (Michel-Aceves, y otros, 2008). Reportes que nos permiten demostrar que las viabilidades obtenidas en éste estudio están dentro de un porcentaje significativamente bueno.

Teniendo los valores de viabilidad y las concentraciones de conidias totales, se realizó el cálculo de la concentración de conidias vivas, para determinar si a pesar de tener viabilidades más bajas en la condición NH25 pero mayor producción de conidias, el rendimiento era mayor que con la condición NH12.5 donde las viabilidades son mayores y la producción menor (*Tabla 9.1*). Demostrando que con la condición NH25 los rendimientos son mejores.

En el instituto de biotecnología de la UNAM se ha estudiado la producción de conidias a nivel biorreactor de *Trichoderma harzianum* para su aplicación como control biológico. Han estandarizado la producción de conidias con un medio líquido, que emplea glucosa como fuente de carbono, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno, y otras sales para proporcionar elementos traza (ver materiales y métodos como medio MTH) en biorreactores con una capacidad de 10L, a una temperatura de 29°C, agitación de 400 rpm, aireación de 0.5 vvm y pH a 5.6. Condiciones con las cuales han obtenido altos rendimientos de 5.4×10^8 esp/mL (Fernández Sandoval, 2006).

Con el fin de probar dicho medio con la cepa *T. virens* TVK1 se preparó MTH (ver materiales y métodos) en un biorreactor con una capacidad de 10L, el cual fue inoculado con 1×10^6 esp/mL de *T. virens* TVK1, con una concentración inicial de glucosa de 30 g/L, a una temperatura de 28°C, agitación de 400 rpm, aireación de 0.5 vvm y pH controlado entre valores de 5.4-6.

Al obtener los resultados con el medio MTH se realizó una comparación sobre producción de biomasa con respecta al medio VMG (NH25) obteniendo concentraciones de 7.3 g/L (*Figura 9.2.3*) y 4.88 g/L (*Figura 9.1.3*) a las 84h respectivamente, lo cual nos indica que el medio MTH es más apto para una mayor producción de biomasa, sin embargo dicha biomasa no consiguió transformarse en conidias siendo éstas últimas el producto de interés. Con lo anterior se propone que por la falta de tiempo, el paso de micelio a conidias no pudo ser concluido.

En la *Figura 9.1.2* se puede observar la presencia de conidias y clamidoconidias en ambas condiciones (NH12.5 y NH25), pero no fue evidente la presencia de conidióforos, lo cual difiere con los primeros estudios a nivel matraz donde la formación de conidióforos se presenta en abundancia (López-García, 2008). Resultados que proponen que las condiciones entre matraz y biorreactor son poco comparables, ya que la agitación empleada a nivel biorreactor pudo influir con la ausencia de conidióforos en el medio.

En el ensayo sobre la producción de conidias se obtuvo que *T.virens* TVK1 alcanzó una concentración de 1.3×10^8 esp/mL a las 84h de incubación en el medio MTH (*Figura 9.2.4*), mientras que con el medio VMG (NH25) la producción máxima fue de 1.2×10^8 esp/mL a las 84h (*Figura 9.1.4*). Lo que hasta el momento nos indicaría que ambos medios de cultivo son favorables para la producción de conidias. Sin embargo al realizar el análisis de viabilidad de las conidias se obtuvo con MTH una viabilidad máxima de 77.3% a las 36h y una mínima de 52.6% a las 84h (*Figura 9.2.5*); realizando la comparación con lo obtenido en el VMG (NH25) la viabilidad máxima es de 85.36% a las 36h y la mínima de 61.72% a las 72h (*Figura 9.1.5*). Con dichos resultados y considerando que la concentración de la fuente de carbono entre los medios es significativamente diferente, siendo de 30g/L en MTH y de 20g/L en NH25, se propone que la diferencia en la viabilidad tiene que ver con que en el medio NH25 la concentración de glucosa se agota más rápido y por lo tanto el nivel de estrés es mayor lo que provoca la producción de conidias antes que en el MTH, obteniendo conidias más maduras conforme pasa el tiempo y que a su vez son más resistentes al estrés que pueda presentarse en el biorreactor. En un estudio para el desarrollo de un fungicida biológico a base *Trichoderma harzianum* se reporta una viabilidad del 95% en las esporas en PDA para su aplicación en los cultivos (García y col., 2006), considerando que las esporas producidas en éste medio sólido no fueron sometidas al estrés de la agitación en el biorreactor, podríamos concluir que las viabilidades obtenidas a nivel biorreactor son significativamente buenas tomando en cuenta la enorme ventaja de una producción en masa, ventaja que no se presenta con los medios sólidos.

La cepa *Trichoderma virens* 29.8 ya había sido estudiada en cultivo líquido a nivel matraz, y no presentó producción de conidias, (Mendoza-Mendoza & Pozo, 2003) es importante tener en cuenta que las condiciones a nivel matraz son poco comparables con las condiciones a nivel biorreactor. Sabiendo que el MTH es un medio caracterizado para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*, una cepa silvestre, se optó por analizar si *T. virens* 29.8 (silvestre) podría presentar producción de conidias, y de esta forma identificar si la mutación de la cepa

T.virens TVK1 esta directamente involucrada con la producción de conidias en cultivo sumergido, o es más bien una relación con el tipo de conidia producida. Para lo cual se preparó el medio MTH en un biorreactor con una capacidad de 10L, el cual fue inoculado con 1×10^6 esp/mL de *T. virens* 29.8, con una concentración inicial de glucosa de 30 g/L, a una temperatura de 28°C, agitación de 400 rpm, aireación de 0.5 vvm y pH controlado entre valores de 5.4-6.

Al analizar el crecimiento, la producción de biomasa fue de 7g/L a las 84h como concentración máxima (*Figura 9.2.3*), que al compararse con los 7.3g/L obtenidos con la cepa *T.virens* TVK1, también en el medio MTH, es prácticamente lo mismo.

Al contabilizar las conidias se obtuvo una concentración de 2×10^8 esp/mL a las 84h (*Figura 9.2.4*), lo cual es una cantidad significativamente buena, basándonos en otros estudios donde se produjeron conidias de *T. harzianum* Rifai con olote como sustrato y se obtuvo una concentración de 4.43×10^8 esp/mL (Michel-Aceves, y otros, 2008), en otros ensayos donde se han empleado desechos agrícolas como sustrato para producir conidias de *Trichoderma sp.* se reportan concentraciones de 2.1×10^8 esp/g (Agamez & Zapata Navarro, 2008).

El estudio de las viabilidades dio valores desde 10.58% a las 36h hasta 61.16% a las 84h (*Figura 9.2.5*). Tomando en cuenta dichos resultados se puede considerar que la mutante no está relacionada con la producción cuantitativa de conidias, pero si en la cualitativa ya que la pigmentación presentada por las conidias de *T. virens* TVK1 son de un color verde pálido, característica que es común encontrar en conidias aéreas, sin embargo la cepa *T. virens* 29.8 produjo conias color amarillo-cafesoso (*Figura 9.2.1*), además de ser conidias menos viables. En la *Figura 9.2.2B* se observa la presencia de un conidióforo a las 36h, lo cual no se presenta en la mutante (*Figura 9.2.2A*).

11 CONCLUSIONES

*La concentración de NH_4^+ tiene una influencia directamente proporcional con la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1, siempre y cuando la concentración de glucosa siga estando en una concentración considerablemente mayor a la de la fuente de nitrógeno.

* Las conidias de *Trichoderma virens* TVK1 son fenotípicamente diferentes a las conidias de *T.virens* 29.8 en el medio MTH, por lo que la mutación no esta relacionada con la concentración de conidias que se producen, pero si con el tipo de conidia.

*Las condiciones empleadas en la producción de conidias de *Trichoderma virens* TVK1 a nivel biorreactor no son comparables a las condiciones empleadas a nivel matraz, lo que se ve reflejado en los resultados.

*El mejor rendimiento entre los tres diferentes medios empleados para producir conidias de *Trichoderma virens* TVK1 se consiguió con el medio VMG en la versión NH25.

*La mutante TVK1 produce conidias más viables que la silvestre (*T.virens* 29.8) y por lo tanto mejores rendimientos.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Agamez, E., & Zapata Navarro, R. I. (2008). EVALUACIÓN DE SUSTRATOS Y PROCESOS DE FERMENTACIÓN SÓLIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE *Trichoderma* sp. *Rev.Colomb.Biotecnol*, 23,24,25,26,27,29,30.
- Agosin, E., & Aguilera, J. M. (1998). INDUSTRIAL PRODUCTION OF ACTIVE PROPAGULES OF *Trichoderma* FOR AGRICULTURAL USES. En G. E. Harman, & C. P. Kubicek, *Trichoderma and Gliocladium. Vol 2.Enzymes, biological control and commercial applications* (págs. 205-228). New York: Taylor and Francis.
- Arias and Arias Bioinsumos. TRICHOBIOLOG WP 1000g. Pag. web [<http://ayabioinsumos.com/index.php/productos/a-base-de-hongos/hongo-biofungicida-y-bioestimulante/trichobiol-wp-1000-gr-detail>]. Extraído el 03 de Agosto de 2012.
- Baker, K., & Cook, R. F. (1974). BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT PATHOGENS. San FRANCISCO.
- Benitez, T., Limón, & Codón, A. (2004). BIOCONTROL MECHANISM OF *Trichoderma* STRAINS. *International Microbiology*, 249-260.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. (1999). ROLE OF THE *Trichoderma harzianum* ENDOCHITINASE GENE ech42, IN MYCOPARASITISM. *Applied and Environmental Microbiology*, 929.
- Castro, A., & Rivillas, C. (2003). MANEJO SOSTENIBLE DE LA LLAGA MACANA EN CAFETALES RENOVADOS POR ZOCA. *Avances Técnicos Cenicafé*, 2-7.

- Contreras-Cornejo, H., Macías Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, A PLANT BENEFICIAL FUNGUS, ENHANCES BIOMASS PRODUCTION AND PROMOTES LATERAL ROOT GROWTH THROUGH AN AUXIN-DEPENDENT MECHANISM IN *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 1579-1580.
- Cruzat G , R., & Ionannldls N, D. (2008). BIOCONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS CON *Trichoderma* spp. Chile: Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario.
- Eland, I., & Kirshner, B. (1993). SURVIVAL IN THE PHYLLOPLANE OF AN INTRODUCED BIOLOGICAL CONTROL AGENT *Trichoderma harzianum* AND POPULATIONS OF THE PLANT PATHOGEN *botrytis cinerea* AS MODIFIED BY ABIOTIC CONDITIONS. *Phytoparasitica*, 303-313.
- Fernández Sandoval, M. T. (2006). ESTUDIO DE LOS FACTORES DE DAÑO CELULAR PRESENTES DURANTE EL SECADO Y ALMACENAMIENTO DE ESPORAS DE *Trichoderma harzianum*. En *Tesis de Maestría* (págs. 2-6). Cuernavaca Morelos: Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas-UNAM.
- Fernández-Larrea, O. (2002). CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS. *Control Bilógico de Plagas Agrícolas*, 160-184.
- Galindo, E., Peña, C., & Serrano-Carreón, L. (2007). DOMESTICAR MICROORGANISMOS EN UN BIORREACTOR: LOS RETOS DEL BIOINGENIERO. *Biotecnología*, 131-143.
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). MORPHOLOGY AND IDENTIFICATION OF *Trichoderma*. En C. P. Kubicek, & G. E. Harman, *Trichoderma and Gliocladium* (pág. 3). New York: Taylor and Francis.

- García, R., & Durán, M. A. (2006). PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Trichoderma Harzianum* POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA. *Fitosanidad*, 295-297.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C., & Gutiérrez, L. (2006). DESARROLLO DE UN FUNGICIDA BIOLÓGICO A BASE DE UNA CEPA DEL HONGO *Trichoderma harzianum* PROVENIENTE DE LA REGIÓN ANDINA VENEZOLANA. *Fitosanidad*, 115-116.
- Haram, S., Schickler, H., Oppenheim, A., & Chet, I. (1996). DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *Trichoderma harzianum* CHITINASES DURING MYCOPARASITISM. *Phytopathol*, 980-985.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Rev. Protección Veg.*, 15-18.
- Kim, D.-J., Baek, J.-M., Uribe, P., Kenerley, C., & Cook, D. (2002). CLONING AND CHARACTERIZATION OF MULTIPLE GLYCOSYL HYDROLASE GENES FROM *Trichoderma virens*. *Current Genetics*, 374.
- Knudsen, G. R., Eschen, D. J., Dandurand, L. M., & Wang, Z. G. (1991). METHOD TO ENHANCE GROWTH AND SPORULATION OF, PELLETTIZED BIOCONTROL FUNGI. *Applied and Environmental Microbiology*, 2865-2867.
- Lejeune, R., & Nielsen, J. (1995). INFLUENCE OF pH ON THE MORPHOLOGY OF *Trichoderma reesei* QM 9414 in submerged culture. *Biotechnol*, 341-344.

Lewis, J., & Papavizas, G. (1993). CHLAMYDOSPORE FORMATION BY *Trichoderma* spp. IN NATURAL SUBSTRATES. *Can, J. Microbial*, 1-6.

López-García, K. (2008). ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH Y LA FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE LA CONIDIACIÓN EN CULTIVO SUMERGIDO DE *Trichoderma virens* TVK1. Morelia, Mich.

Mendoza-Mendoza, A., & Pozo, M. J. (2003). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of mitogen-activated protein kinase. *PNAS*, 15965-15968.

Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, A. (2008). PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* Rifai EN DIFERENTES SUSTRATOS ÓRGANICOS. *Chapingo*, 185-191.

Monzón, A. (2001). PRODUCCIÓN, USO Y CONTROL DE CALIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN NICARAGUA. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos*, 95-103.

Mukherjee, P., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., & Moran-Diez, M. (2011). TWO CLASSES OF NEW PEPTAIOLS ARE SYNTHESIZED BY A SINGLE NON-RIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE OF *Trichoderma virens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 4544.

Murherjee, K., Latha, J., Hadar, R., & Horwitz, B. (2003). TmkA, A MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE of *Trichoderma virens*, IS INVOLVED IN BIOCONTROL PROPERTIES AND REPRESSION OF CONIDIATION IN THE DARK. *Eukaryotic Cell*, 446-455.

- Papavizas, G. (1985). Trichoderma and Gliocladium: BIOLOGY, ECOLOGY AND POTENTIAL FOR BIOCONTROL. *Annu Rev. Phytopathol*, 23.
- Piña, C. M., & Ávila Forcada, S. (2005). LOS EFECTOS DE UN IMPUESTO AMBIENTAL A LOS PLAGUICIDAS. *Gaceta Ecológica*, 43,44.
- Rodríguez, M., Gerding, M., & France, A. (2006). SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE HUEVOS DE LA POLILLA DEL TOMATE, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: gelechiidae). *Agricultura Técnica*, 151-158.
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). REPRODUCTION WITHOUT SEX: CONIDIATION IN THE FILAMENTOUS FUNGUS *Trichoderma*. *Microbiology*, 2887-2891,2893-2894.
- Vega, O. F.-L. (2001). MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL FITOSANITARIO. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos*, 96-100.
- Vero, S., & Mondino, P. (1999). CONTROL BIOLÓGICO POSTCOSECHA EN URUGUAY. *Horticultura Internacional*, 29-30.
- Villegas, M. (2008). *Trichoderma* Pers. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y SU POTENCIAL BIOLÓGICO EN LA AGRICULTURA SOSTENIBLE. *Orius Biotecnología*.
- Xu, J.-R. (2000). MAP kinasas IN FUNGAL PATHOGENES. *Fungal Genetics and Biology*, 137-152.

Zimand, G., Eland, Y., & Chet, I. (1996). EFFECT OF *Trichoderma harzianum* ON *Botrytis cinerea* PATHOGENICITY. *Phytopathol*, 125-126.