



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**Campus Tuxtepec**

**Identificación morfológica de  
aislamientos del género *Trichoderma*  
presentes en suelos cultivados con  
banano y caña de azúcar**

**T E S I S**

Presentado por:

**Nancy Cruz Velasco**

Para obtener el título de:

**Ingeniero en Biotecnología**

**Director de Tesis**

**Codirector de Tesis**

Dr. Vladimir Sánchez López    Dr. Mario Ramírez Lepe

*San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca*

*Noviembre, 2013*

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios***

*Por estar en cada paso de mi vida y permitirme finalizar mi carrera, y sobre todas las cosas por darme la perseverancia necesaria para seguir en los momentos difíciles de mi vida.*

### ***A mi mamá: Nancy Velasco Del Valle***

*Por su cariño, sus valores, confianza y su lucha incansable para ser de mi una persona de bien.*

### ***A mis hermanos: Vicente, Ana Celia e Isabel***

*Por el apoyo brindado, su cariño y por los momentos maravillosos que pasamos desde pequeños pero sobre todo por estar conmigo para reír y llorar.*

### ***A mis abuelitos: Sabino Cruz y Jesús Velasco***

*Por sus consejos, experiencias y regaños otorgados para enfrentarme a la vida. Por sus incansables historias y cuentos que me asustaban y me asían reír y que siempre las recordare.*

## AGRADECIMIENTOS

**A la Universidad del Papaloapan**, por la oportunidad de estudiar una carrera profesional con profesores de calidad.

**A PROMEP (Programa de Mejoramiento del Profesorado)**, por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis. Con el proyecto 2008: Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. de diferentes ecosistemas en la región del Papaloapan.

**A mi director de Tesis** también tutor y profesor, Dr. Vladimir Sánchez López por su enseñanza, apoyo, amistad y formación académica durante mi carrera.

**A mi codirector de Tesis**, Dr. Mario Ramírez Lepe por su apoyo durante la realización de la tesis.

**A la Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología**, Dra. Ana Karin Navarro Martínez por la disposición, apoyo y consejos brindados. También un sincero agradecimiento a todos aquellos profesores que contribuyeron en mi formación académica, por el entusiasmo y empeño para enseñar de la mejor manera.

**A las técnicas de laboratorio**, QFB Lety Saldaña, IBQ Luz Quevedo por su apoyo, consejos dentro del laboratorio y por su agradable amistad.

**A mis amigos**, Anita gg por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por los malos y buenos consejos, por quererme como a una hermana. Made por brindarme su amistad sincera y su apoyo incondicional. Jade por ser una gran persona y amiga por su nobleza y comprensión. Juan José amigo y único compañero en la carrera por nuestra larga amistad, por soportarnos uno al otro y por los malos y sobretodo buenos momentos. Miguel por su amistad y por convivir con la generación buenos momentos con sus constantes fiestas. También agradezco a mis amigas Laura carmelita, Raquel, Beckie y Adri por su amistad sincera y los buenos momentos que pasamos juntas dentro y fuera de la universidad. A Juanito Glez por ser un buen amigo y sobre todo por escucharme. A Karime y Goretty en especial por ser parte de mi formación y por el apoyo que me brindan siempre, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por su gran cariño.

**A las familias**, Sánchez Campana, Gómez Gómez, Perucini Avendaño y a la abuelita de jade doña Alejandrina por permitirme un espacio en su hogar y su cariño sincero.

A todas esas personas que intervinieron en alguna etapa de mi vida, por su contribución, apoyo y consejos otorgados.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1. Historia del género <i>Trichoderma</i> .....	3
2.2. Ecología y distribución geográfica .....	4
2.3. Características morfológicas .....	4
2.4. Clasificación taxonómica .....	6
2.5. Reproducción .....	6
2.6. Identificación de <i>Trichoderma</i> a nivel especie .....	6
2.6.1. Estudios morfológicos .....	6
2.6.2. Estudios moleculares .....	7
2.7. Importancia de <i>Trichoderma</i> en la Biotecnología .....	7
2.7.1. Biotecnología vegetal .....	8
2.7.2. Biotecnología animal .....	8
2.7.3. Biotecnología alimentaria .....	8
2.7.4. Biotecnología ambiental .....	9
2.7.5. Biotecnología medica .....	9
2.8. Investigación de <i>Trichoderma</i> en México .....	10
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	13
4.1. General .....	13
4.2. Específicos .....	13
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	14

5.1.	Material Biológico .....	14
5.2.	Reactivación de los aislados .....	15
5.3.	Estudios morfológicos .....	15
5.3.1.	Medios de cultivo .....	15
5.3.2.	Observación del crecimiento micelial .....	15
5.3.3.	Preparación de la muestra.....	16
5.3.4.	Observación de conidióforos, fiálides y conidias .....	16
5.3.5.	Observación de clamidosporas .....	16
5.3.6.	Registro de datos y análisis de las mediciones .....	17
5.4.	Identificación con claves taxonómicas .....	17
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
6.1.	Aislados de <i>Trichoderma</i> presentes en el agroecosistema banano .....	18
6.1.1.	VSL 185, VSL 186 y VSL 188.....	18
6.2.	Aislados de <i>Trichoderma</i> presentes en el agroecosistema caña de azúcar .....	25
6.2.1.	VSL 4, VSL 97, VSL 105 y VSL 107 .....	25
6.2.2.	VSL 99, VSL 100 y VSL 110.....	31
6.2.3.	VSL 104 y VSL 117 .....	36
6.2.4.	VSL 106.....	39
6.2.5.	VSL 116 y VSL 118 .....	41
6.2.6.	VSL 127.....	44
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>49</b>
<b>APÉNDICE A</b> .....	<b>55</b>	
<b>APÉNDICE B</b> .....	<b>57</b>	
<b>APÉNDICE C</b> .....	<b>61</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .....	6
<b>Tabla 2.</b> Estudios de <i>Trichoderma</i> realizados en México.....	10
<b>Tabla 3.</b> Aislados estudiados.....	14
<b>Tabla 4.</b> Mediciones de conidias, fiálides y clamidosporas los aislados presentes en el agro-ecosistemas cultivado con banano, en medios CMD y SNA .....	21
<b>Tabla 5.</b> Mediciones de conidias, fiálides y clamidosporas de los aislados presentes en el agro-ecosistema cultivado con caña de azúcar, en medios CMD y SNA.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Morfología de la especie <i>T. koningiopsis</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Aislado VSL 185 de <i>T. koningiopsis</i> .....	22
<b>Figura 3.</b> Aislado VSL 186 de <i>T. koningiopsis</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Aislado VSL 188 de <i>T. koningiopsis</i> .. ..	24
<b>Figura 5.</b> Morfología de la especie <i>T. asperelloides</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> Aislado VSL 4 de <i>T. asperelloides</i> . .....	27
<b>Figura 7.</b> Aislado VSL 97 de <i>T. asperelloides</i> . .....	28
<b>Figura 8.</b> Aislado VSL 105 de <i>T. asperelloides</i> . .....	29
<b>Figura 9.</b> Aislado VSL 107 de <i>T. asperelloides</i> .. ..	30
<b>Figura 10.</b> Morfología de los aislados pertenecientes a la sección <i>Trichoderma</i> .....	32
<b>Figura 11.</b> Aislado VSL 99.....	33
<b>Figura 12.</b> Aislado VSL 100.....	34
<b>Figura 13.</b> Aislado VSL 110.....	35
<b>Figura 14.</b> Aislado VSL 104.....	37
<b>Figura 15.</b> Aislado VSL 117.....	38
<b>Figura 16.</b> Aislado VSL 106 de <i>T. gamsii</i> . .....	40
<b>Figura 17.</b> Aislado VSL 116.....	42
<b>Figura 18.</b> Aislado VSL 118.....	43
<b>Figura 19.</b> Aislado VSL 127.....	45

## RESUMEN

Algunas especies del género *Trichoderma* son de importancia en la biotecnología, debido a que controlan enfermedades causadas por hongos fitopatógenos y nematodos que afectan a diversos cultivos agrícolas. También son productoras de enzimas hidrolíticas y de sustancias con actividad antibiótica. En el presente trabajo se identificaron con estudios morfológicos tres aislados de *Trichoderma* de un agro-ecosistema con banano y trece de agro-ecosistemas con caña de azúcar en el Distrito de Tuxtepec, Oax. Los aislados fueron analizadas macro y microscópicamente de colonias crecidas en el medio harina de maíz agar más dextrosa y un medio sintético bajo en nutrientes. Se registró la apariencia de la colonia, color, formación de anillos concéntricos, pigmentación del medio, aroma y el tiempo en que el micelio cubrió la superficie del medio de cultivo. Las pústulas se observaron con un microscopio estereoscópico. Los conidióforos, fiálides y conidias se observaron en preparaciones con KOH (3%) utilizando un microscopio compuesto con las técnicas de campo claro y contraste de fases. Se realizaron mediciones de al menos 30 estructuras de conidias (longitud y ancho), fiálides (longitud, ancho, base y el ancho de la célula que soporta la fiálide), y clamidosporas (longitud y ancho) de fotos tomadas con la cámara del microscopio. Con el software estadístico Minitab® versión 14.1 y Microsoft Excel se calcularon las medidas de dispersión y de tendencia central para cada estructura. Los aislados VSL 185, VSL 186 y VSL 188 del agro-ecosistema con banano se identificaron como *T. koningiopsis*. Cuatro aislados (VSL 4, VSL 97, VSL 105 y VSL 107) del agro-ecosistema caña de azúcar se identificaron como *T. asperelliodes* y una (VSL 106) como *T. gamsii*. Ocho cepas no se pudieron identificar a nivel de especie, de las cuales siete son miembros de la sección *Trichoderma* y una cepa de la sección *Pachybasium*. *T. asperelliodes* y *T. gamsii* representan el primer reporte para México.

**Palabras clave:** *Trichoderma*, taxonomía, agroecosistema, Tuxtepec.

## ABSTRACT

Some species of the genus *Trichoderma* are important in biotechnology due to its ability to control diseases caused by phytopathogenic fungi and nematodes which affect various agricultural crops. They are also producers of hydrolytic enzymes and substances with antibiotic activity. In this work, three isolated of *Trichoderma* from an banana agro-ecosystem and thirteen isolated of sugarcane agro-ecosystems in the District of Tuxtepec, Oaxaca were identified with morphological studies. The isolated were examined macro and microscopically from colonies grown on cornmeal agar and a synthetic medium low in nutrients. Colony appearance, color, concentric ring formation, medium pigmentation, aroma and the time in which the mycelium covered the surface medium were recorded. The pustules were observed with a stereoscopic microscope and conidiophores, phialides and conidia were observed in preparations containing KOH (3%) using a compound microscope. Measurements of at least 30 structures conidia, phialides and chlamydospores were made of photos taken with the microscope camera. Minitab ® statistical and Microsoft Excel were used to calculate measures of central tendency and dispersion for each structure. The isolated VSL 185, VSL 186 and VSL 188, isolated from the banana agro-ecosystem were identified as *T. koningiopsis*. Four (VSL 4, VSL 97, VSL 105 and VSL 107) of the sugarcane agro-ecosystem were identified as *T. asperelliodes* and one (VSL 106) as *T. gamsii*. Eight strains could not be identified to level species, of which seven are members of the section *Trichoderma* and one of the section *Pachybasium*. *T. asperelliodes* and *T. gamsii* are reported for the first time in Mexico.

**Key words:** *Trichoderma*, taxonomy, agroecosystem, Tuxtepec.

## 1. INTRODUCCIÓN

El hongo *Trichoderma* fue descrito por primera vez en 1794 por Persoon, quien incluyó cuatro especies en el género, de las cuales solamente *T. viride* es reconocida hasta la fecha como especie verdadera de *Trichoderma*. Actualmente la Subcomisión Internacional de *Trichoderma/Hypocrea* reconoce 104 especies que han sido caracterizadas a nivel morfológico y molecular. Este microorganismo se ha aislado del suelo, de cortezas en descomposición, raíces, tallos, del interior de tallos o troncos y de tubérculos como endofítico, así como en el interior de hospitales y de casas (Samuels, 2006).

*Trichoderma* contiene especies de importancia biotecnológica. Por ejemplo, en la biotecnología vegetal son empleadas como agentes de control biológico contra varios fitopatógenos en diversos cultivos, inclusive existen biofungicidas que tienen como ingrediente activo a *Trichoderma* y se encuentran disponibles comercialmente (Paulitz y Bélanger, 2001). En la biotecnología alimentaria se ha usado como productor de enzimas para mejorar el proceso de elaboración de la cerveza, y en la producción de jugos de frutas, en el área de biotecnología ambiental tiene potencial para ser aplicado en la biorremediación de sitios contaminados con sustancias de origen orgánico e inorgánico (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). En el área de biotecnología médica, se han identificado antibióticos producidos por *T. atroviride* y *T. virens* con actividad citotóxica contra células cancerígenas de próstata y leucemia (Oh *et al.*, 2002), y contra células cancerígenas de colon humano, respectivamente (Reino *et al.*, 2008).

Algunas especies de *Trichoderma* están ampliamente distribuidas en el mundo, como por ejemplo *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2003) y *T. asperellum*, las cuales son cosmopolitas. Hay otras especies que tienen una distribución limitada, por ejemplo, *T. polysporum* y *T. minutisporum* siendo especies de regiones más frías. Se ha encontrado mayor diversidad de especies en ecosistemas naturales que en ecosistemas cultivados. En el caso de suelos cultivados con caña de azúcar se ha identificado a *T. harzianum* y *T. viride* (Malathi *et al.*, 2002), en suelos con cacao a *T. theobromicola* y *T. paucisporum* (Samuels *et al.*, 2006b), en suelos con banano se han encontrado *T. asperellum* y *T. virens* (Xia *et al.*, 2010).

En México, *Trichoderma* se ha estudiado principalmente como agente de biocontrol contra varios fitopatógenos que atacan a diferentes cultivos agrícolas, tales como mango (Michel-Aceves *et al.*, 2001), Agave ‘Azul’ (Sánchez *et al.*, 2007; Sánchez y Rebolledo, 2010), chile (Guigón y González, 2004; Guigón *et al.*, 2010), plátano (Arzate-Vega *et al.*, 2006; Del Olmo-Ruiz *et al.*, 2010), garbanzo (Paredes-Escalante *et al.*, 2008), clavel (Aquino-Martínez *et al.*, 2007), sorgo (Larralde-Corona *et al.*, 2008), ajo (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008; Ibarra-Medina *et al.*, 2010), lechuga, litchi (Ibarra-Medina *et al.*, 2010), frijol (Hernández-Mendoza *et al.*, 2011), cacao (Cuervo-Parra *et al.*, 2012), y tomate (Gómez y Ortiz, 2012). A pesar de su alto potencial biotecnológico no existen estudios referentes a la distribución y biodiversidad de *Trichoderma* en México. Los mecanismos de acción de *Trichoderma* pueden ser de manera indirecta a través de la competencia por nutrientes y espacio, promoción del crecimiento e inducción de la resistencia de la planta y antibiosis, o directamente por el micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004).

Por esta razón en el 2009 se llevó a cabo una colecta de suelos en ecosistemas cultivados y naturales en la región del Papaloapan. Se recuperaron aislamientos de suelos cultivados con banano, caña de azúcar, piña y de suelos de ecosistemas naturales en Tuxtepec, Chiltepec, Loma Bonita, Ciudad Isla y Dobladero. Después se seleccionaron algunos aislados con potencial antagonico, los cuales son el ingrediente activo de un producto denominado “Microgolpe” producido en el laboratorio químico-biológico de la UNPA, y que desde 2009 se está evaluando en campo contra la enfermedad sigatoka negra que ataca a plantas de banano. Otros aislados se estudiaron sobre plantas de tomate bajo condiciones de invernadero y promovieron su crecimiento (Gómez y Ortiz, 2012). Sin embargo, éstas no han sido identificadas a nivel de especie.

El propósito del presente trabajo es identificar morfológicamente estos aislados con potencial antagonico que se obtuvieron de suelos cultivados con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y de plátano (*Musa spp.*), así como el resto de los aislados de esos dos ecosistemas cultivados.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Historia del género *Trichoderma*

La primera descripción del hongo *Trichoderma* se realizó en 1794 por Persoon, quien incluyó cuatro especies en el género, llamándolas *T. viride*, *Xylohypha nigrescens*, *Sporotrichum aureum* y *Trichothecium roseum*. De estas, solamente *T. viride* es reconocida hasta la fecha como especie de *Trichoderma*. En 1865, los hermanos Tulasne en Francia ilustraron un vínculo entre *T. viride* y su etapa sexual como *Hypocrea rufa* (Tulasne y Tulasne, 1865). En 1969 se publicó la primera monografía de *Trichoderma* y se dividió a las cepas en nueve “agregados de especies” las cuales fueron: *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* y *T. viride* (Rifai, 1969). Posteriormente, de 1984 a 1991, J. Bissett llevó a cabo una revisión del género *Trichoderma* partiendo del trabajo de Rifai y dividió al género en 5 secciones: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Hypocreanum* y *Saturnisporum*, y dentro de estas secciones colocó a las especies, describiendo solamente a las especies de dos secciones: *Longibrachiatum* y *Pachybasium*, quedando las demás secciones si ser abordadas de la misma manera. En total reconoció 31 especies: 4 especies en la sección *Longibrachiatum*, 20 especies en la sección *Pachybasium*, 4 especies en la sección *Trichoderma*, 2 especies en la sección *Saturnisporum*, y una sola especie en la sección *Hypocreanum* (Bissett, 1984-1991). Después Gams y Bissett (1998) revisaron los trabajos publicados por J. Bissett y solo reconocieron 4 secciones, excluyendo a la sección *Saturnisporum*. Las especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense* las colocaron en la sección *Longibrachiatum*. A partir de entonces, se han descubierto nuevas especies de *Trichoderma/Hypocrea* en diferentes ecosistemas, y en el 2006, se reportaron las primeras 100 especies del género identificadas mediante análisis de secuencias de ADN (Druzhinina *et al.*, 2006). En la actualidad, la Subcomisión Internacional de *Trichoderma/Hypocrea* reconoce 104 especies (<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>), que se han caracterizado con estudios morfológicos y a nivel molecular.

## 2.2. Ecología y distribución geográfica

*Trichoderma* es un habitante común del suelo y también coloniza cortezas en descomposición, raíces, tallos, y el interior de tallos o troncos como organismo \*endofítico. Además se le ha encontrado en hospitales y en interiores de casas de madera (Samuels, 2006a). Se alimenta principalmente de materia orgánica, de otros hongos y nematodos. Algunas especies de *Trichoderma* están ampliamente distribuidas en el mundo, como por ejemplo *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2003) y *T. asperellum*, las cuales son \*cosmopolitas. En cambio, hay otras especies que tienen una distribución limitada, por ejemplo, *T. polysporum* y *T. minutisporum*, habitan regiones más frías. *T. aureoviride* se encuentra limitada al Reino Unido y al norte de Europa. *T. reesei* es la especie más conocida por la producción comercial de enzimas celulasas, se encontró en las Islas Salomón de la región del Pacífico y es una especie que está limitada en su distribución a una banda ecuatorial estrecha, y ha sido aislado directamente de sustratos naturales en Brasil y Guayana Francesa (Lieckfeldt *et al.*, 2001). *T. stromaticum* tiene quizás la distribución más restringida que cualquier otra especie en el género, ya que sólo se ha encontrado en Brasil y Ecuador en asociación con árboles de cacao (*Theobroma cacao*) (Samuels *et al.*, 2000). *T. longibrachiatum* se ha encontrado en el Norte y Sur de América, Europa, África y la India, pero no en el Sureste de Asia y Australia, mientras que *T. citrinoviride* se encuentra en el Norte y Sur de América, Europa, Sureste de Asia, y Australasia, pero no en África y la India. En suelos agrícolas se han encontrado menor diversidad de especies, en suelos con caña de azúcar se identificó a *T. harzianum* y *T. viride* (Malathi *et al.*, 2002), en suelos con cacao a *T. theobromicola* y a *T. paucisporum* (Samuels *et al.*, 2006b), en suelos con banano a *T. asperellum* y a *T. virens* (Xia *et al.*, 2010).

## 2.3. Características morfológicas

Las colonias de *Trichoderma* son generalmente de crecimiento rápido, el cual se observa en los primeros 5 días de incubación, \*micelio inicialmente sumergido. Dependiendo de la cepa y el medio de cultivo, el micelio es aéreo, \*hialino, eventualmente \*flocoso o lanoso. El reverso de la colonia se presenta sin color, o de color amarillo, ámbar, rojo opaco, o verde-amarillo. Poseen aroma pronunciado o débil, algunas con olor a coco o

alcanfor. Su conidiación es \*efusa, en manojos, o en \*pústulas, típicamente de color verde, menos común blancas, gris o pardo, se logra apreciar al tercer y cuarto día de incubación (Gams y Bissett, 1998). En la mayoría de las especies el \*conidióforo tiene un eje principal ancho y los brazos en intervalos regulares, por lo general con brazos sucesivos apicales y distales progresivamente más cortos y más angostos, más o menos divergentes, solitarias o en pares, o en verticilos, ramificación repetitiva verticilada que puede resultar en una estructura piramidal altamente ramificada (Gams y Bissett, 1998). En otras especies la ramificación es menos regular, con ramas solitarias o en pares, y sin ramificación extensiva. En la sección *Pachybasium*, el eje principal y los brazos primarios del conidióforo terminan a menudo en elongaciones estériles que pueden ser simples o ramificadas, rectas, flexuosas, ondulares, en gancho o en espiral; puede ocurrir \*anastomosis entre conidióforos adyacentes, se observan cuando la pústula es joven alrededor del tercer y cuarto día de incubación. A partir de \*hifas aéreas no diferenciadas en áreas de conidiación efusa se derivan con frecuencia \*fiálides y brazos fértiles (Gams y Bissett, 1998).

Las fiálides se encuentran típicamente dispuestas en verticilos divergentes terminales en las ramas del conidióforo, o en verticilos directamente debajo de la \*septa a lo largo del conidióforo y brazos, de otra forma en pares o solitarios y dispuestos irregularmente; son cilíndricos, subulatas, \*lageniformes, \*ampuliformes o subglobosos. Posee \*conidias unicelulares, típicamente de color verde, o incoloras, gris o pardo, lisas o rugosas, sinuadas o con proyecciones en forma de alas en la pared exterior, subglobosas, obovoides, elipsoidales, oblongas o cilíndricas cortas, en algunos casos acumuladas en gotas de líquido verde en la punta del conidióforo o contenidas en una estructura en forma de saco, siendo visible con altas magnificaciones (con un microscopio electrónico, a partir del cuarto al quinto día de incubación) (Gams y Bissett, 1998). \*Clamidosporas generalmente presentes y a menudo abundantes, especialmente en el micelio sumergido, intercaladas, o terminales sobre brazos laterales cortos de hifas vegetativas, globosas a elipsoidal, incoloras, amarillo pálido o verdosas, lisas y algunas veces de pared gruesa, estas aparecen a partir del séptimo día de incubación. Hifas vegetativas generalmente hialinas, pared lisa, (1–)2–10  $\mu\text{m}$  de ancho, menos frecuentes (o en el micelio sumergido) amarillo pálido, con engrosamientos irregulares mayores a 16  $\mu\text{m}$  de ancho. Cuando se

conoce el \*teleomorfo, son de los géneros *Hypocrea*, *Podostroma* o *Sarawakus* (Gams y Bissett, 1998).

## 2.4. Clasificación taxonómica

El género *Hypocrea/Trichoderma* se clasifica como sigue (Tabla 1) (Kulkarni y Sagar, 2007).

**Tabla 1** Clasificación de *Hypocrea/Trichoderma*

Posición	Estado asexual (conidias)	Estado sexual (Ascosporas)
Reino	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycota	Ascomycota
Sub-división	Deuteromycotina	Ascomycotina
Clase	Hyphomycetes	Pyrenomycetes
Orden	Monilliales	Sphariales
Familia	Monilliaceae	Hypocreaceae
Genero	<i>Trichoderma</i>	<i>Hypocrea</i>

## 2.5. Reproducción

*Trichoderma* se reproduce asexualmente mediante conidias y es el estado \*anamorfo. También es capaz de reproducirse sexualmente y corresponde al género *Hypocrea* (estado teleomorfo), por eso al referirse a *Hypocrea* o *Trichoderma*, se trata del mismo organismo. Existen algunas especies de *Trichoderma* a las que todavía no se les conoce su estado como teleomorfo (Samuels, 2006).

## 2.6. Identificación de *Trichoderma* a nivel de especie

### 2.6.1. Estudios morfológicos

El principal método para la identificación de *Trichoderma* a nivel de especie, sigue siendo el morfológico. Las descripciones morfológicas de las especies de *Trichoderma* se han estandarizado de colonias creciendo sobre los medios de cultivo extracto de malta

agar al 2% (Rifai, 1969; Bissett, 1984), harina de avena agar (Gams y Bissett, 1998), harina de maíz agar más dextrosa (Samuels *et al.*, 2002) y un medio sintético bajo en nutrientes (Nirenberg, 1976). Estos medios, al igual que el de papa dextrosa agar se emplean también para determinar el crecimiento, la temperatura óptima y las características macroscópicas de las colonias (Samuels *et al.*, 2002). De cada cepa se debe de estudiar la apariencia de la colonia, producción de pústulas o \*fascículos, micelio aéreo, así como el color de las pústulas, la pigmentación del medio, el aroma, así como las características de los conidióforos, \*células conidiógenas y clamidosporas. Además se mide cada estructura tales como conidias, fialides, la célula que soporta la fiálide y clamidosporas. Para la identificación de los aislamientos a nivel de especie se usan claves taxonómicas.

### 2.6.2. Estudios moleculares

Para conocer la variación genética de las especies de *Trichoderma*, los micólogos empezaron a usar el método de electroforesis de isoenzimas, siendo Zamir y Chet (1985) los primeros en caracterizar a cepas de *Trichoderma* por su patrón de isoenzimas. Después los taxónomos utilizaron las técnica de RLFP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico) para caracterizar a nivel molecular a las especies de *Trichoderma*. Actualmente, se analizan secuencias de ADN y se construyen \*árboles filogenéticos para una correcta identificación. Los genes que se han secuenciado son: región espaciadora transcrita interna (ITS por sus siglas en ingles Internal Transcribed Spacer), factor de elongación 1-á (*tef1*), actina (*act*), y calmodulina (*cal*) (Druzhinina *et al.*, 2006). Las secuencias obtenidas de cada especie se comparan con secuencias de otras especies de *Trichoderma* incluidas en el GenBank utilizando la herramienta básica de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Mediante análisis filogenéticos se identifica la especie (Chaverri *et al.*, 2003, Druzhinina *et al.*, 2006).

## 2.7. Importancia de *Trichoderma* en la Biotecnología

### **2.7.1. Biotecnología vegetal**

Algunas especies de *Trichoderma* son de importancia agrícola, debido a que han mostrado un control efectivo contra varios \*fitopatógenos en diversos cultivos, inclusive existen biofungicidas que tienen como ingrediente activo a especies de *Trichoderma* y se encuentran disponibles comercialmente, como por ejemplo SoilGard® (Paulitz y Bélanger., 2001), PHC® RootMate® (<http://www.phcmexico.com.mx>), y RootShield® <http://www.bioworksinc.com/>. *Trichoderma* emplea varios mecanismos de acción como agente de control biológico, tales como: 1) \*micoparasitismo, 2) \*antibiosis, 3) competencia, 4) promoción del crecimiento y 5) inducción de la resistencia de la planta (Harman *et al.*, 2004). También se han utilizado genes de *Trichoderma* para la transformación genética de plantas con resistencia a enfermedades, como es el caso de brócoli, manzano y arroz (Mei *et al.*, 2003).

### **2.7.2. Biotecnología animal**

*Trichoderma* produce enzimas hidrolíticas, tales como glucanasas, quitinasas, proteasas, y xilanasas, que son usadas como aditivos en la elaboración de alimentos para el ganado y para alimentos de mascotas (Schuster y Schmoll, 2010).

### **2.7.3. Biotecnología alimentaria**

*Trichoderma* se ha aplicado ampliamente para la producción de aditivos alimentarios y productos relacionados. Actualmente varias enzimas de *Trichoderma* son utilizadas para mejorar el proceso de elaboración de la cerveza ( $\beta$ -glucanasas), y en la producción de jugos de frutas (pectinasas, celulasas, hemicelulasas). Las celulasas son aplicadas principalmente en la cocción, el malteado, y la producción de alcohol de grano (Galante *et al.*, 1998). Sin embargo, no solo las enzimas de *Trichoderma* son utilizadas, también sus metabolitos son empleados como aditivos. Uno de los primeros productos aislados de *T. viride* fue una sustancia química con aroma a coco, ésta se identificó como 6-pentil- $\alpha$ -pirona la cual posee propiedades antibióticas (Collins y Halim, 1972). También existen reportes de *Trichoderma* que produce amilasas (De Marco *et al.*, 2003), lactasas (Seyis y Aksoz, 2004) y proteasas (Sánchez *et al.*, 2007) que son de importancia en la industria alimentaria.

#### **2.7.4. Biotecnología ambiental**

Se ha demostrado que algunas especies de *Trichoderma* tienen potencial para ser aplicadas en la biorremediación de sitios contaminados con sustancias de origen orgánico (hidrocarburos del petróleo, explosivos y plaguicidas) e inorgánico (metales pesados y cianuro) (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Por ejemplo, *T. viride* contribuye en la degradación del herbicida triflurina en más del 90 % en aproximadamente 10 d. *T. harzianum* mostró una degradación muy lenta del herbicida arvadex. También esta especie tiene la capacidad de degradar a plaguicidas organoclorados como el DDT, el dieldrin, el endosulfán y el insecticida organofosforado clorpirifos. Por otro lado, *Trichoderma* puede degradar pentacloronitrobenceno y pentaclorofenol, los cuales son compuestos organoclorados altamente tóxicos que son descargados al medio ambiente por la industria de la celulosa (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). En el caso de compuestos explosivos, el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) es conocido por su alta toxicidad y mutagenicidad en animales, peces, plantas y microorganismos, y es relativamente tóxico para los humanos por inhalación, absorción oral y contacto con la piel, provoca cianosis y anemia. *T. viride*, es capaz de transformar al TNT en un 16 % en metabolitos solubles como 2,2',6,6'-tetranitro-4,4'-azoxitolueno, 4-amino-2,6-dinitrotolueno y 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). También existen reportes de *T. polysporum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* con la capacidad para degradar hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en aceites combustibles. Así mismo, *Trichoderma* sp. se ha empleado para la detoxificación de cianuro usando dos enzimas (rodanasa y cianuro hidratasa) capaces de degradarlo (Argumedo-Delira *et al.*, 2009).

#### **2.7.5. Biotecnología médica**

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas antibióticos (Schuster y Schmoll, 2010). Se han identificado antibióticos producidos por *T. atroviride* y *T. virens* con actividad citotóxica contra células cancerígenas de próstata, leucemia y contra células cancerígenas de colon humano (Oh *et al.*, 2002). Además se sabe que antibióticos (antraquinonas) producidos por *T. viride*, *T. polysporum*, *T. aureoviride*, *T.*

*harzianum*, *T. koningii*, *T. virens*, afectan el crecimiento de bacterias y hongos que afectan al ser humano tales como *Cryptococcus neoformans* (ataca a pulmones), *Trichophyton mentagrophytes* (ataca piel y uñas), *Aspergillus fumigatus* (ataca pulmones, uñas) (Reino *et al.*, 2008). Por otra parte *T. viride*, *T. harzianum* y *T. koningii* producen pironas con actividad antibiótica contra *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* (ataca a pulmones), *Staphylococcus aureus* (causa neumonía, ataca piel y mucosas) (Reino *et al.*, 2008). Así mismo *T. longibrachiatum* es una fuente potencial de fármacos antimicóticos eficaces frente a las especies de *Candida* y *Aspergillus* (Vicente *et al.*, 2001).

## 2.8. Investigación de *Trichoderma* en México

*Trichoderma* se ha estudiado principalmente como agente de biocontrol contra hongos que afectan principalmente a diferentes cultivos agrícolas (Tabla 2), y se ha aislado de suelos agrícolas. Existen pocos estudios sobre la biodiversidad de este género en ecosistemas naturales.

**Tabla 2** Estudios de *Trichoderma* realizados en México

Investigación	Cultivo afectado	Origen de <i>Trichoderma</i>	Especies Identificadas	Referencias
Efecto de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. subglutinans</i>	Mango	Guerrero y Colima	<i>T. harzianum</i> , <i>T. virens</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. koningii</i> y <i>T. minutisporum</i>	Miche-Aceves <i>et al.</i> , 2001
Actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Phytophthora capsici</i> y promoción de crecimiento de la planta	Chile	Chihuahua	<i>Trichoderma spp.</i>	Guigón y González , 2004
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Plátano	Guerrero	<i>Trichoderma spp.</i>	Arzate-Vega <i>et al.</i> , 2006
Diversidad de géneros presentes en suelos cultivados con nogal y alfalfa		Durango y Coahuila	<i>Trichoderma spp.</i>	Samaniego-Gaxiola y Chew-Madinaveitia, 2007
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre la rabia del garbanzo causado por <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Garbanzo	Sinaloa	<i>T. lignorum</i> y <i>T. harzianum</i>	Paredes-Escalante <i>et al.</i> , 2008
Biocontrol de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>dianthi</i> con	Clavel	Guerrero	<i>Trichoderma spp.</i>	Aquino-Martínez <i>et al.</i> ,

<i>Trichoderma</i>				2007
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Macrophomina phaseolina</i>	Sorgo	Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila	<i>T. atroviride</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. citrioviride</i> . y <i>T. harzianum</i>	Larralde-Corona <i>et al.</i> , 2008
Efecto de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium</i> y <i>Penicillium</i>	Ajo	Guanajuato	<i>Trichoderma sp.</i>	Quiroz-Sarmiento <i>et al.</i> , 2008
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	Agave tequilana	Jalisco	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. viridescens</i> , <i>T. reesei</i> y <i>T. harzianum</i>	Sánchez y Rebolledo, 2010
<i>Trichoderma</i> como antagonista de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>S. minor</i>	Lechuga, ajo, litchi, y hortalizas	Jalisco, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Guanajuato y Edo. de México	<i>T. viride</i> , <i>T. pseudokoningii</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. virens</i>	Ibarra-Medina <i>et al.</i> , 2010
Micromicetos en un suelo agrícola	Plátano	Tabasco	<i>T. parceramosus</i> , <i>T. aureoviride</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. citrinoviride</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. virens</i>	Del Olmo-Ruiz <i>et al.</i> , 2010
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , <i>R. solani</i> , <i>M. phaseolina</i> y <i>P. omnivora</i> .	Chile	Chihuahua	<i>T. asperellum</i> y <i>T. longibrachiatum</i>	Guigón <i>et al.</i> , 2010
Caracterización molecular y agronómica de <i>Trichoderma</i> y su antagonismo sobre <i>M. phaseolina</i> y <i>F. oxysporum</i>	Frijol	Noreste	<i>T. hammatum</i> , <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. asperellum</i> , y <i>Trichoderma sp.</i>	Hernández-Mendoza <i>et al.</i> , 2011
Efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> contra patógenos que afectan a frutos de cacao	Cacao	Jalisco	<i>T. harzianum</i>	Cuervo-Parra <i>et al.</i> , 2011
Efecto de <i>Trichoderma</i> sobre la promoción del desarrollo de las plantas.	Tomate	Oaxaca	Aislamientos VSL179, VSL185, VSL4, VSL97, VSL107, VSL110	Gómez y Ortiz, 2012.
<i>Trichoderma</i> sobre la sigatoka negra ( <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ) en campo	Banano y plátano	Oaxaca	VSL 4, VSL 97, VSL107, VSL110	Datos no publicados (2009-2012)

Revisión de nuevas especies del clado de <i>Longibrachiatum</i>	Tubérculo de <i>Solanum hintonii</i>	Estado de México	<i>T. solani</i>	Samuels <i>et al.</i> , 2012
Nuevos registros de <i>T. crassum</i> para México y sus variación morfológica de diferentes ecosistemas	Banano y bosque tropical	Oaxaca	<i>T. crassum</i>	Sánchez <i>et al.</i> , 2012
Producción de celulasas en medio de cultivo líquido con salvado de trigo		Oaxaca	VSL4, VSL97, VSL99, VSL100, VSL104, VSL105, VSL106, VSL107, VSL110, VSL116, VSL117, VSL118, VSL127, VSL185, VSL188. Con un índice enzimático entre 1.01-1.21	Datos no publicados (2013)

Ante esta situación, desde el 2007 el Dr. Vladimir Sánchez y sus colaboradores, iniciaron colectas de suelo y plantas en ecosistemas naturales de clima templado a frío en los Estados de México (volcán Nevado de Toluca y municipio de Temascaltepec) y Morelos (Sierra de Zempoala) para conocer su biodiversidad. Dentro de esta colección de cepas, se encontró una nueva especie endófito en un tubérculo de *Solanum hintonii* colectado en el municipio de Temascaltepec y se denominó *T. solani*, la cual pertenece al Clado *Longibrachiatum* (Samuels *et al.*, 2012). Los demás aislados se encuentran en estudio. En el 2009 realizaron otra colecta en ecosistemas cultivados y naturales de clima tropical en la región del Papaloapan, obteniendo aislados de suelos cultivados con banano, caña de azúcar, piña y en suelos de ecosistemas naturales. De esta colección se identificaron 10 cepas de *T. crassum* (Sánchez *et al.*, 2012). Algunas de estas cepas se evaluaron en campo contra la enfermedad sigatoka negra que ataca a plantas de banano, otras se evaluaron contra la enfermedad manchado del fruto del litchi y otras promovieron el desarrollo de plantas de tomate bajo condiciones de invernadero (Tabla 2). Sin embargo, estas cepas sólo se han identificado a nivel de género, pero no a nivel especie.

En base a los estudios reportados en la literatura sobre el estudio de *Trichoderma* en suelos agrícolas tales como caña de azúcar y banano es posible encontrar las especies de *T. harzianum*, *T. viride* (Malathi *et al.*, 2002), *T. asperellum* y a *T. virens* (Xia *et al.*, 2010) en los suelos agrícolas de Tuxtepec Oaxaca, debido a que son cultivos de climas tropicales, tales como los reportados.

### 3. HIPÓTESIS

*T. virens* y *T. asperellum* se encuentran en suelos cultivados con banano (*Musa* spp.) y en suelos cultivados con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se encuentran *T. viride* y *T. harzianum* en Tuxtepec, Oaxaca.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. General

Identificar mediante estudios morfológicos aislamientos de *Trichoderma* habitando suelos cultivados con banano (*Musa* spp.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

#### 4.2. Específicos

1. Determinar las características morfológicas a nivel macroscópico de los aislamientos de *Trichoderma*.
2. Analizar la morfología a nivel microscópico y medir las estructuras de aislamiento cepa de *Trichoderma*.
3. Identificar cada aislamiento de *Trichoderma* mediante claves taxonómicas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Material biológico

Se estudiaron los aislados (Tabla 3), que se obtuvieron de los agro-ecosistemas cultivados con banano y caña de azúcar con una profundidad de 0-30 cm y que se encuentran en el laboratorio Químico-Biológico a 5°C en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec y son parte de la colección de hongos del Dr. Vladimir Sánchez López.

**Tabla 3** Aislados estudiados

Aislados	Origen geográfico	Localidad	Hábitat	Referencia
VSL 185	N18°07'51.4"O96°08'67.7"	Finca Mundo Nuevo Tuxtepec	Agroecosistema banano	Sánchez <i>et al.</i> , 2012
VSL 186	N18°07'51.4"O96°08'67.7"	Finca Mundo Nuevo Tuxtepec	Agroecosistema banano	Sánchez <i>et al.</i> , 2012
VSL 188	N18°07'51.4"O96°08'67.7"	Finca Mundo Nuevo Tuxtepec	Agroecosistema banano	Sánchez <i>et al.</i> , 2012
VSL 4	N17°59'.604"O96°10.193"	Pinacho Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 97	N17°59'.604"O96°10.193"	Pinacho Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 99	N18°05.831"O96°13.567"	Tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 100	N18°05.831"O96°13.567"	Tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 104	N18°05.831"O96°13.567"	Tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 105	N18°05.959"O96°13.607"	Tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 106	N18°05.959"O96°13.607"	Tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 107	N17°59'.604"O96°10.193"	Pinacho Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 110	N18°05.831"O96°13.567"	Tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 116	N18°01.680"O96°13.472"	Camelia Roja Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 117	N18°01.898"O96°13.329"	Camelia Roja Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 118	N18°01.680"O96°13.472"	Camelia Roja Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	
VSL 127	N18°01.680"O96°13.472"	Camelia Roja Tuxtepec	Agroecosistema caña de azúcar	

## **5.2.Reactivación de los aislados**

Los aislados se conservan a 5°C en el Laboratorio Químico-Biológico de la Universidad del Papaloapan. La reactivación consistió en colocar un trozo de micelio de cada uno de ellos en cajas de Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente, bajo condiciones naturales de luz/oscuridad por una semana.

## **5.3. Estudios morfológicos**

### **5.3.1. Medios de cultivo**

Se utilizaron los medios de cultivo específicos, reportados en la literatura para los estudios morfológicos : 1) harina de maíz agar más dextrosa (CMD), compuesto por 17 g de harina de maíz agar y 20 g de dextrosa disueltos en 1000 ml de agua destilada (Samuels *et al.*, 2002); y 2) el medio sintético bajo en nutrientes (SNA) (Nirenberg, 1976), compuesto por 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g de  $\text{KCl}$ , 0.2 g de glucosa, 0.2 g de sacarosa, 20 g de agar y 1000 ml de agua destilada. Para evitar el crecimiento de bacterias se agregó 50 mg de cloranfenicol a los medios de cultivo. Se inoculó cada aislado de *Trichoderma* a 1 cm de la orilla de la caja Petri (9 cm de diám.) y se incubaron sobre una mesa de trabajo a 25-30°C bajo condiciones naturales de luz y oscuridad durante 10 días.

### **5.3.2. Observación del crecimiento micelial**

Durante el periodo de incubación, diariamente se registró la apariencia de la colonia, color de las conidias y su distribución sobre la superficie del medio, formación de anillos concéntricos, así como el color de las pústulas, la pigmentación del medio, el aroma y el tiempo en que el micelio cubrió la superficie del medio de cultivo. Para observar más a detalle las pústulas, se utilizó un microscopio estereoscópico (Leica EZ4D, Microsystems GmbH Wetzlar, Germany). Se colocó la caja Petri sobre la platina y se abrió parcialmente para observar como los conidióforos se encontraban agregados, la forma de las pústulas y si presentaban extensiones fértiles o estériles, además si eran rectos o en forma de espiral. También se observó si en la punta de los conidióforos se formaron gotas de color verde o blanco.

### **5.3.3. Preparación de la muestra**

La muestra micelial se tomó antes de que las fiálides colapsaran, que es cuando las pústulas estaban jóvenes y eran de color verde con blanco, o verde-amarillo con blanco, o solamente blancas, esto se logró ver al 3-4 día de incubación. Para comenzar, se colocó la caja Petri conteniendo el aislado de *Trichoderma* sobre la platina del microscopio compuesto (Leica DM3000, Microsystems GmbH Wetzlar, Germany), después se abrió parcialmente para localizar una pústula y se tomó parte de ella con la punta de la navaja del bisturí y se colocó en una gota de KOH (3%) agregada en un portaobjeto. Posteriormente, se puso un cubreobjeto y se limpió el exceso de KOH con papel absorbente.

### **5.3.4. Observación de conidióforos, fiálides y conidias**

El portaobjeto conteniendo la muestra micelial se colocó sobre la platina del microscopio compuesto (Leica DM3000) y se inició la observación con el objetivo 10x, seguido por los objetivos 20x, 40x y 100x. Antes de usar el objetivo 100x se agregó una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjeto, procurando no formar burbujas. Se registró la morfología y el patrón del conidióforo, presencia de ramas laterales pares o impares, forma de las fiálides, presencia de fiálides solitarios e intercalados, presencia o ausencia de extensiones estériles o fértiles del conidióforo, y terminación del conidióforo. Los conidióforos se analizaron con los objetivos 20x, 40x y 100x. Para el caso de las fiálides, se determinó su forma y longitud, con el objetivo 100x. Las conidias se observaron usando el objetivo 100x, se anotó su color, forma, ornamentación (lisa o rugosa), longitud y ancho, se lograron observar al quinto día de incubación.

### **5.3.5. Observación de clamidosporas**

Las clamidosporas se observaron en la parte inferior de la caja Petri después de 7-10 días de incubación del cultivo. Primero, se volteó la caja Petri y se colocó sobre la platina del microscopio compuesto, posteriormente se usó el objetivo de 20x para su observación. Se registró su forma, ornamentación, si eran terminales, intercaladas en hifas, solitarias, en cadenas, unicelular o en una masa multicelular, además su longitud y ancho.

### 5.3.6. Registro de datos y análisis de las mediciones

Se midieron por lo menos 30 unidades de conidias (longitud y ancho), fiálides (longitud, ancho, base y el ancho de la célula que soporta la fiálide), y clamidosporas (longitud y ancho). También se determinó el radio L/A para cada estructura, la cual se obtuvo al dividir la longitud/ancho. Con ayuda de Microsoft Excel y el software estadístico Minitab® versión 14.1 (Minitab Inc.), se calculó la media aritmética, desviación estándar (DE), el valor máximo (max) y mínimo (min), y un intervalo de confianza (IC) del 95% para cada unidad. Las mediciones se reportaron de esta manera: (min-) media  $\pm$  DE (-max).

### 5.4. Identificación con claves taxonómicas

En cuanto estuvieron listas las observaciones morfológicas del crecimiento micelial, conidióforos, fiálides, conidias y clamidosporas, así como el análisis de las mediciones de las estructuras, el paso final fue la identificación a nivel de especie de cada cepa de *Trichoderma* bajo estudio. Primero se realizó la identificación a nivel de sección, para eso, se consultó la clave taxonómica referente a las secciones del género *Trichoderma* descrita por Bissett (1991), Gams y Bissett (1998). Después, se usaron claves taxonómicas para cada sección de *Trichoderma*: i) sección *Trichoderma* (Gams y Bissett, 1998), ii) *Pachybasium* (Bissett, 1991; Gams y Bissett, 1998). También se consultó la clave interactiva disponible en <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Se utilizaron también otras claves taxonómicas para: especies con conidias con ornamentación rugosa (Samuels *et al.*, 1999), y *Trichoderma* (Bissett *et al.*, 2003), especies agregadas a *T. koningii* (Samuels *et al.*, 2006a), y especies de la sección *Trichoderma* (Jaklitsch *et al.*, 2006). En el Apéndice B se encuentra una copia de cada clave taxonómica utilizada en este trabajo.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

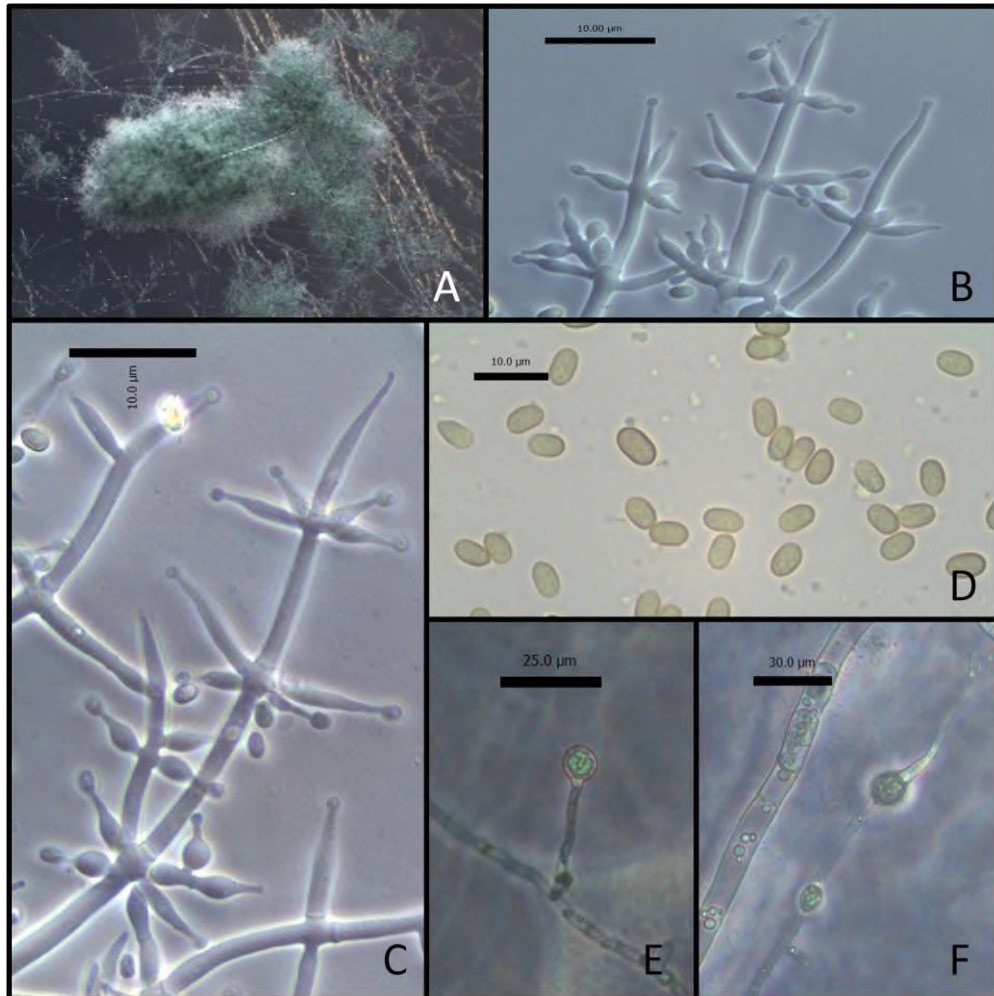
Se analizaron morfológicamente 16 aislados del género *Trichoderma*. Tres se obtuvieron de plantaciones comerciales de banano y trece de plantaciones de caña de azúcar. Las mediciones de las estructuras de cada aislado se muestran en las Tabla 3 y 4, y sus características morfológicas se describen a continuación.

### 6.1. Aislados de *Trichoderma* presentes en el agroecosistema banano

#### 6.1.1. VSL 185, VSL 186 y VSL 188

Los aislados fueron crecidos en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivo en 5 d. Las colonias no produjeron aroma a coco en los medios, en SNA hubo un ligero color amarillo y sobre CMD no se encontraron pigmentos difundidos. En los medios CMD y SNA formaron pústulas, de las cuales primero presentaron un color blanco y después un color verde oscuro, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula (Figura 1A). Conidióforos con características de la sección *Trichoderma*, con un eje longitudinal central y con ramas laterales generalmente en pares terminando de 2-5 fiálides (Figura 1C). Fiálides lageniformes y en menor proporción ampuliformes, más o menos hinchados en la parte media, la mayoría fueron rectos y algunos curvos (Figura 1B). Las conidias presentaron un color verde con forma elipsoidal y con una ornamentación lisa (Figura 1D). Sus clamidosporas fueron de forma globosa a subglobosa, unicelular, terminales e intercaladas y solitarias (Figura 1F-E). De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, se identificó como *T. koningiopsis* con la clave taxonómica descrita por Samuels *et al.* (2006a). Cabe resaltar que el aislado VSL 185 se evaluó sobre la germinación y el crecimiento de plantas de tomate saladette variedad Cid F1 bajo condiciones de invernadero, donde se obtuvieron beneficios en la germinación y la promoción del desarrollo de las plantas (Gómez y Ortiz, 2012).

Los aislados VSL 185 (Figura 2), VSL 186 (Figura 3) y VSL 188 (Figura 4) mostraron características morfológicas de conidióforos, fialides, conidias y clamidosporas similares, las cuales se identificaron como *T. koningiopsis*.



**Figura 1.** Morfología de la especie *T. koningiopsis*. A) Pústula con conidióforos ramificados sobre CMD visto con el estereoscópico 35x (VSL 185). B) Fiálides lageniformes y ampuliformes (VSL 188). C) Conidióforo con características de la sección *Trichoderma* (VSL 185). D) Conidias con ornamentación lisa sobre SNA (VSL 185). E-F) Clamidosporas terminales e intercaladas (VSL 186).

Estos resultados corresponden a las descripciones realizadas por Samuels *et al*, (2006a). Sin embargo hubo diferencias en las mediciones de algunas estructuras (Tabla 4). Las conidias de los aislados estudiados fueron de forma subglobosa a elipsoidal a anchamente elipsoidal mientras lo reportado por Samuels *et al*. (2006a) fueron conidias elipsoidales, dentro de la especie hubo variedad de medición y en las medias se observan diferencias (ver Apéndice C), de acuerdo a la clave taxonómica reportadas por Samuels *et al*. (2006a) son consideradas de la misma especie debido a que las medidas de las estructuras se encuentran dentro de los parámetros establecidos por los investigadores, por ejemplo el intervalo de confianza (IC) de L/A en las conidias debe de ser mayor a 1.3  $\mu\text{m}$  con una

confiabilidad del 95%, los aislados VSL 185, VSL 186 y VSL 188 tienen un IC de L/A de 1.56-1.68, 1.40-1.45 y 1.37-1.40  $\mu\text{m}$  respectivamente. La literatura describe que *T. koningiopsis* y *T. koningii* tienen características morfológicas similares, se identificaron las diferencias entre estas dos especies, una de ellas es que *T. koningiopsis* produce dos anamorfos: uno parecido a *Trichoderma* y otro semejante a *Pachybasium*, de las cuales se observaron en los tres aislados analizados, en cambio *T. koningii* solo produce un anamorfo parecido a *Trichoderma*. Otra característica que las hace diferentes es que *T. koningiopsis* produce fiálides intercalados de los cuales se observaron en los tres aislados mientras que *T. koningii* no produce fiálides intercalados. En un estudio que está realizando Ernesto A. Zavala (ITVER, comunicación personal), extrajo ADN y realizó la secuencia del gen ITS, de los aislados VSL 185 y VSL188, dando como resultado una homología del 100% con *T. koningiopsis*, *T. ovalisporum* y *T. gamsii*. Sin embargo descartamos a *T. ovalisporum* porque la forma de sus conidias es ovoidal (Samuels, *et al.*, 2006b) y a *T. gamsii* porque produce fiálides proliferados (Jaklitsch, *et al.*, 2006), los cuales no se observaron en los aislados VSL 185, VSL 186 y VSL 188.

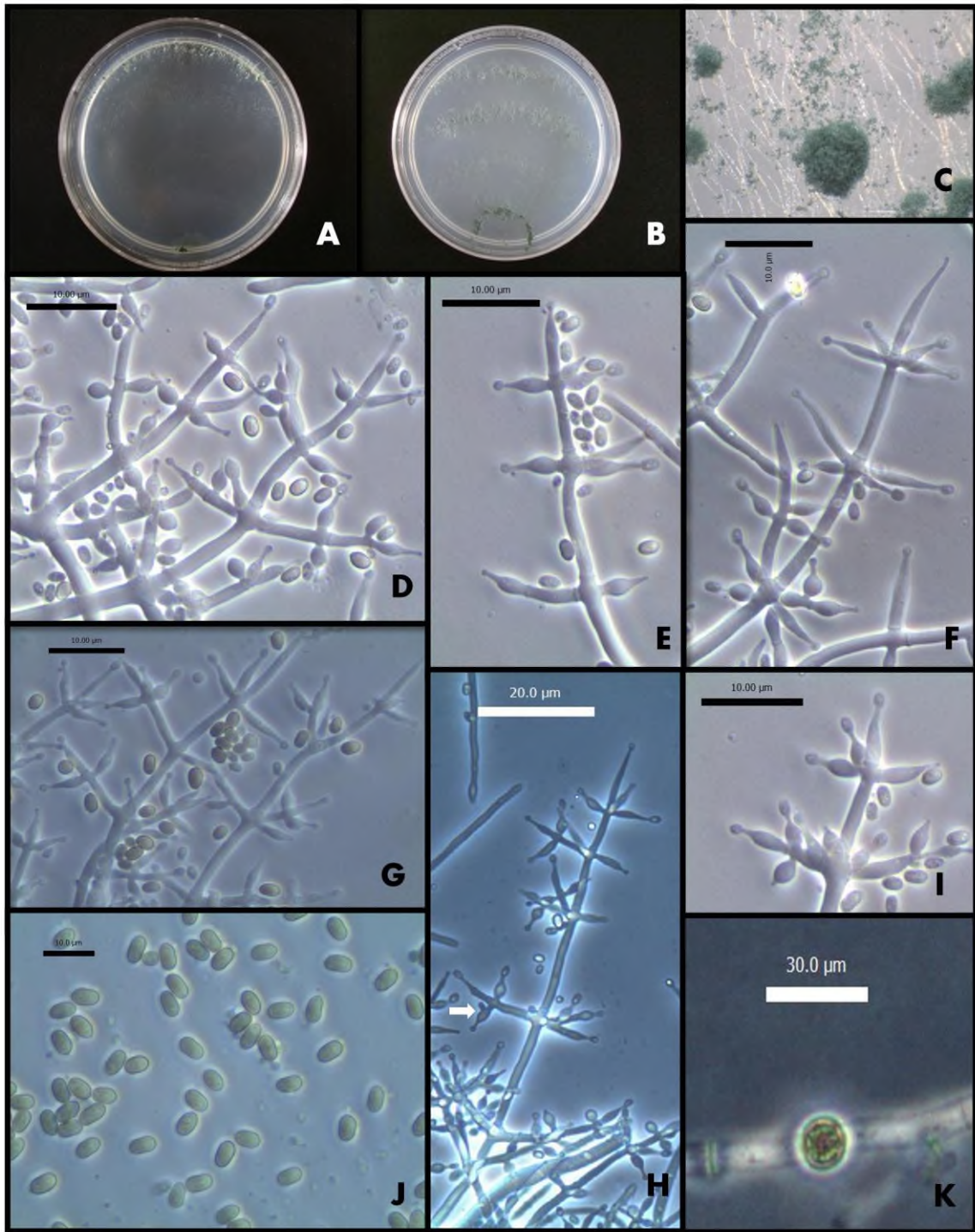
En la literatura se reporta que *T. koningiopsis* se ha encontrado en Brasil, Canadá, Etiopía, Ecuador, Alemania, Ghana, Perú y México. Se han aislado de vainas de cacao (*Theobroma*) y de troncos de *Th. grandiflorum*, *Th. gileri* y *Theobroma sp* (cacao del monte), además del suelo, de ramas y hojas en descomposición (Samuels *et al.*, 2006b). Como *Hypocrea* se ha encontrado en troncos de cacao, en Cuba, Puerto rico y EE.UU. (Samuels *et al.*, 2006b).

En México existen dos reportes de *T. koningiopsis*, la cepa HK701 fue aislada en la rizósfera de *Helianthus annuus*, y en suelos cultivados con frijol, las cuales se encontraron al noreste de México. También se encontró que la cepa HK701 tiene actividad micoparasítica contra *M. phaseolina* y *F. oxysporum* (Hernández-Mendoza *et al.*, 2011). Este trabajo aporta tres cepas de *T. koningiopsis* nativas de una región tropical, siendo el primer reporte para un agroecosistema cultivado con banano.

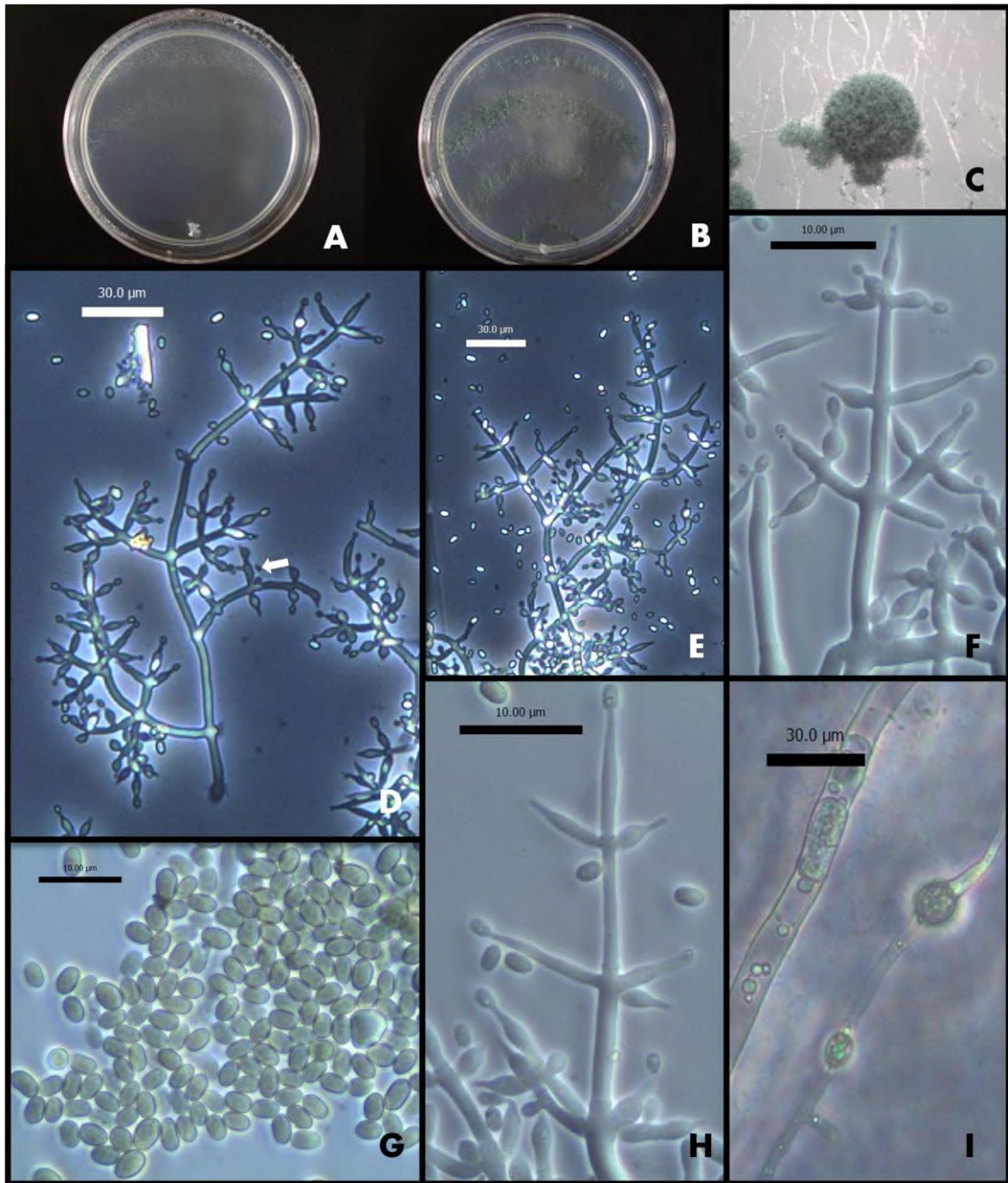
**Tabla 4** Mediciones de conidias, fiálides y clamidosporas de los aislamientos presentes en el agro-ecosistema cultivado con banano, crecidas en medios CMD y SNA

<b>Aislamientos de <i>Trichoderma</i></b>			
	VSL 185	VSL 186	VSL 188
<b>Origen</b>			
	Suelo cultivado con banano en la Finca Mundo Nuevo Tuxtepec	Suelo cultivado con banano en la Finca Mundo Nuevo Tuxtepec	Suelo cultivado con banano en la Finca Mundo Nuevo Tuxtepec
<b>Especies identificadas</b>			
	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningiopsis</i>
<b>Características de Conidias</b>			
Largo $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(3.14-)3.50-4.38(-4.76) 3.82-4.06 50	(5.16-)5.48-6.16(-6.48) 5.72-5.91 50	(3.25-)3.42-3.88(-4.10) 3.59-3.71 50
Ancho $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(2.07-)2.25-2.62(-2.77) 2.38-2.49 50	(3.33-)3.79-4.37(-4.91) 4.00-4.16 50	(2.36-)2.48-2.74(-2.93) 2.57-2.65 50
L/A $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(1.25-)1.41-1.83(-2.09) 1.56-1.68 50	(1.15-)1.33-1.53(-1.60) 1.40-1.45 50	(1.18-)1.29-1.50(-1.61) 1.37-1.40 50
<b>Características de Fiálides</b>			
Largo $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(6.46-)7.28-16.57(-25.51) 10.64-13.21 50	(4.55-)5.73-10.78(-19.03) 7.56-8.96 50	(4.31-)6.38-11.41(-15.18) 8.19-9.59 50
Ancho $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(2.56-)3.20-4.39(-4.75) 3.63-3.96 50	(1.44-)1.98-2.78(-3.21) 2.27-2.49 50	(1.61-)2.11-2.71(-2.96) 2.33-2.50 50
L/A $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(1.38-)1.42-5.35(-9.65) 2.84-3.93 50	(1.67-)2.07-5.22(-9.18) 3.21-4.08 50	(1.21-)1.47-2.00(-2.24) 1.66-1.81 50
Base $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(1.61-)2.02-2.84(-3.49) 2.31-2.54 50	(1.15-)1.44-1.96(-2.50) 1.63-1.77 50	(1.71-)1.97-2.42(-2.70) 2.13-2.26 50
Eje $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(1.99-)2.85-3.59(-3.98) 3.12-3.32 50	(1.59-)1.95-2.56(-2.95) 2.17-2.34 50	(1.54-)2.23-5.47(-9.09) 3.40-4.30 50
<b>Características de Clamidosporas</b>			
Largo $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(5.78-)6.90-9.61(-11.87) 7.88-8.63 50	(7.44-)9.06-12.64(-15.89) 10.36-11.35 50	(6.20-)7.12-9.83(-11.88) 8.10-8.86 50
Ancho $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(5.12-)6.08-8.50(-10.15) 6.95-7.63 50	(6.48-)8.03-11.29(-12.71) 9.20-10.11 50	(5.78-)6.13-8.69(-11.78) 7.06-7.76 50
L/A $\mu\text{m}$ 95 % IC n	(1.01-)0.99-1.28(-1.85) 1.09-1.18 50	(1.00-)1.03-1.21(-1.34) 1.10-1.15 50	(1.00-)1.02-1.27(-1.61) 1.11-1.18 50

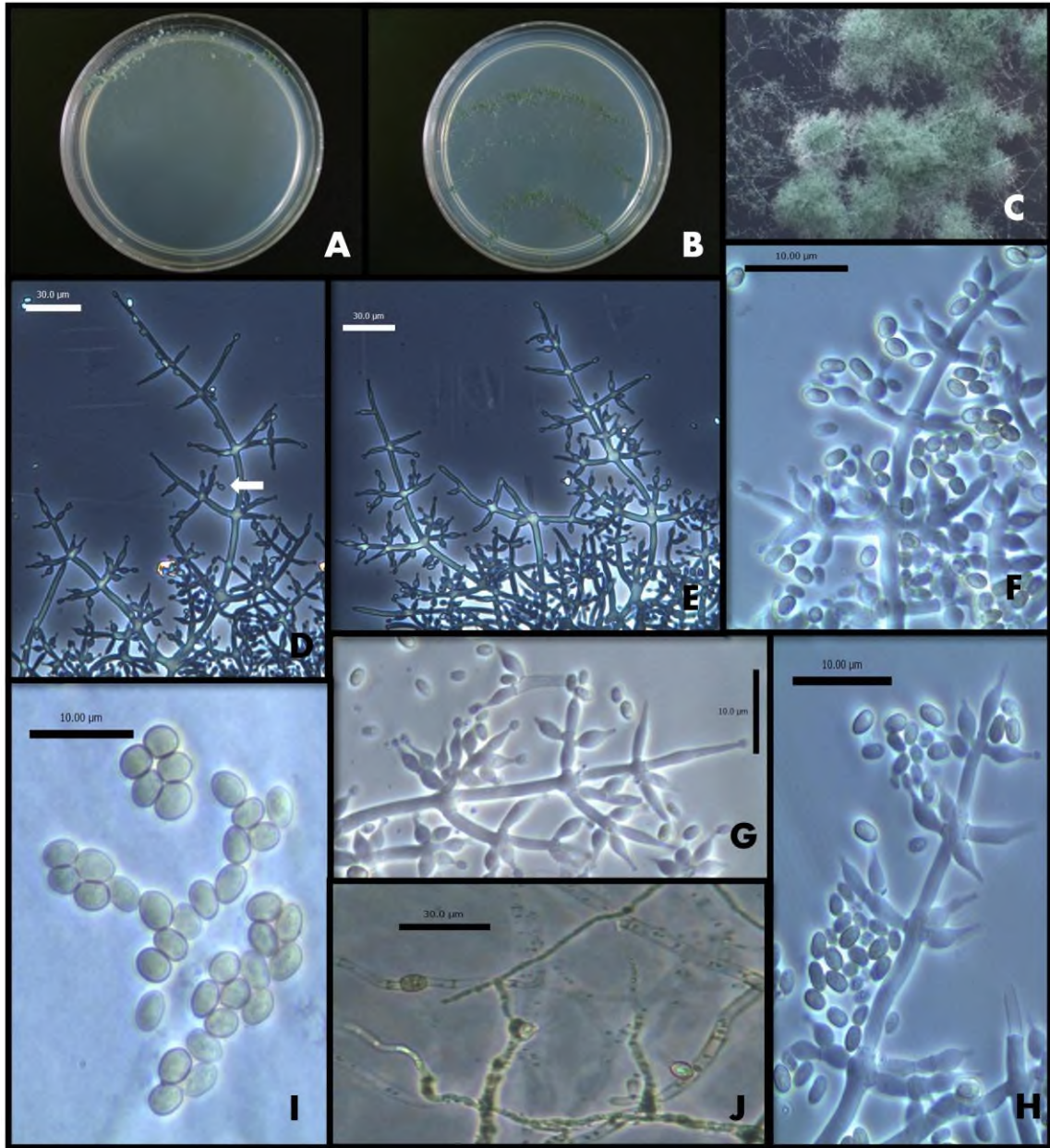
Los datos son reportados de acuerdo a los seguimientos que se dan en las claves taxonómicas reportadas en la literatura (ver Apéndice B). Se siguen de la siguiente manera: (valor mínimo-) (resultado de la media - desviación estándar)-(resultado de la media + desviación estándar) (-valor máximo) y con intervalo de confianza (IC) del 95%. n es igual al número de unidades medidas y L/A es la razón longitud/ancho.



**Figura 2.** Aislado VSL 185 de *Trichoderma koningiopsis*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústulas a vistas con el microscopio estereoscópico a 35x los 6 d sobre CMD. D-G e I) Conidioforos vistos con el microscopio compuesto a 100x a los 4 d sobre SNA. H) Conidióforo con fiálide intercalado magnificación 20x a los 4 d sobre SNA. J) Conidias vistas con magnificación 100x en SNA a los 5 d. y K) Clamidospora vista con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d sobre CMD.



**Figura 3.** Aislado VSL 186 de *T. koningiopsis*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d sobre CMD. D-E) Conidióforos con fiálide intercalado vistos al microscopio compuesto a 20x a los 4 d sobre SNA. F y H) Fiálides vistos con magnificación 100x a los 4 d sobre SNA. G) Conidias observadas a 100x a los 5 d sobre CMD. I) Clamidosporas vistas a 20x a los 7 d sobre CMD.



**Figura 4.** Aislado VSL 188 de *T. koningiopsis*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en SNA. D-E) Conidióforos con fiálide intercalado observados en el microscopio compuesto a 20x a los 4 d sobre SNA. F-H) Fiálides observados a 100x a los 4 d sobre SNA, I) Conidias vistas con magnificación 100x a los 5 d en CMD, y J) Clamidosporas observadas con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d sobre CMD.

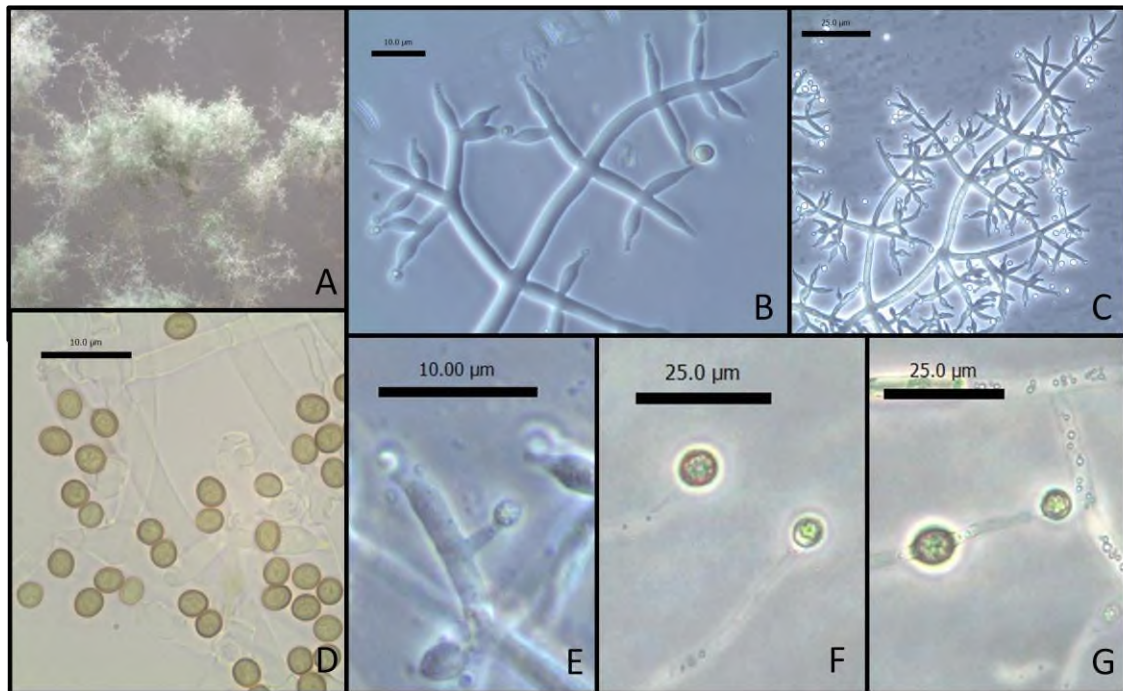
## 6.2. Aislados de *Trichoderma* presentes en el agroecosistema caña de azúcar

### 6.2.1. VSL 4, VSL 97, VSL 105 y VSL 107

Los aislados fueron crecidos en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivo en 5 d. La colonia no produjo el aroma a coco y tampoco pigmentos difundidos en ningún medio de cultivo. En los medios CMD y SNA hubo formación de pústulas (Figura 5A), las cuales primero fueron de color blanco y después de color verde oscuro, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula. Los conidióforos presentaron características de la sección *Trichoderma*, con un eje longitudinal central, las ramas laterales generalmente en pares, las fiálides forman cruces bien definidos distribuidos regularmente (Figura 5C). Las conidias de color verde, forma subglobosa a anchamente elipsoidal con una ornamentación finamente verrugosa (Figura 5C). Las fiálides de forma lageniforme, más o menos hinchados en la parte media, la mayoría fueron rectos y algunos curvos (Figura 5B), además produjo fiálides intercalados (Figura 5E). Sus clamidosporas fueron de forma globosa a subglobosa, unicelular, terminales e intercaladas y solitarias (Figura 5F-G). De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, se identificó como *T. asperelloides* (Samuels *et al.*, 2010). Los aislados VSL 4, VSL 97, y VSL 107 fueron evaluadas sobre la germinación y el crecimiento de plantas de tomate saladette variedad Cid F1 bajo condiciones de invernadero, obteniendo beneficios en la germinación y la promoción del desarrollo de las plantas (Gómez y Ortiz, 2012).

Los aislados VSL 4 (Figura 6), VSL 97 (Figura7), VSL 105 (Figura 8) y VSL 107 (Figura 9), se identificaron como *T. asperelloides*, y sus características morfológicas correspondieron a las descripciones realizadas por Samuels *et al.*, (2010). Se encontraron algunas diferencias en las mediciones, por ejemplo la longitud máxima de las conidias de los aislados analizados fue de 3.93 µm (Tabla 5) y en la reportada por estos investigadores fue de 4.7 µm. En el caso de las fiálides la longitud máxima fue de 18.16 µm mientras que en lo reportado por Samuels *et al.*, (2010) fue de 27.5 µm. *T. asperelloides* tiene características morfológicas muy similares a *T. asperellum*, una de las diferencia entre ellas es que *T. asperellum* no produce fiálides intercalados mientras

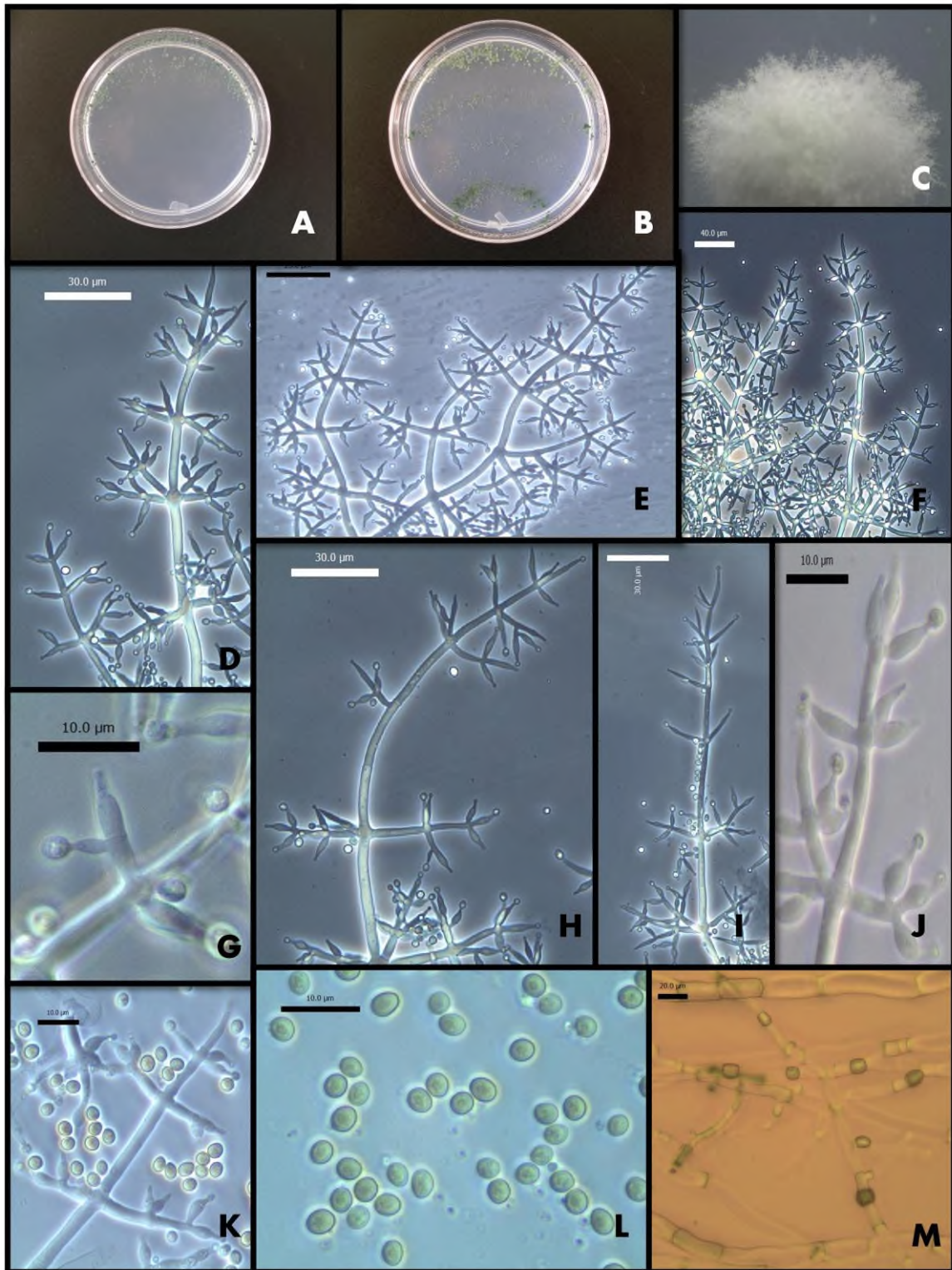
que en *T. asperelloides* si produce fiálides intercalados, lo cual se observó en los cuatro aislados analizados.



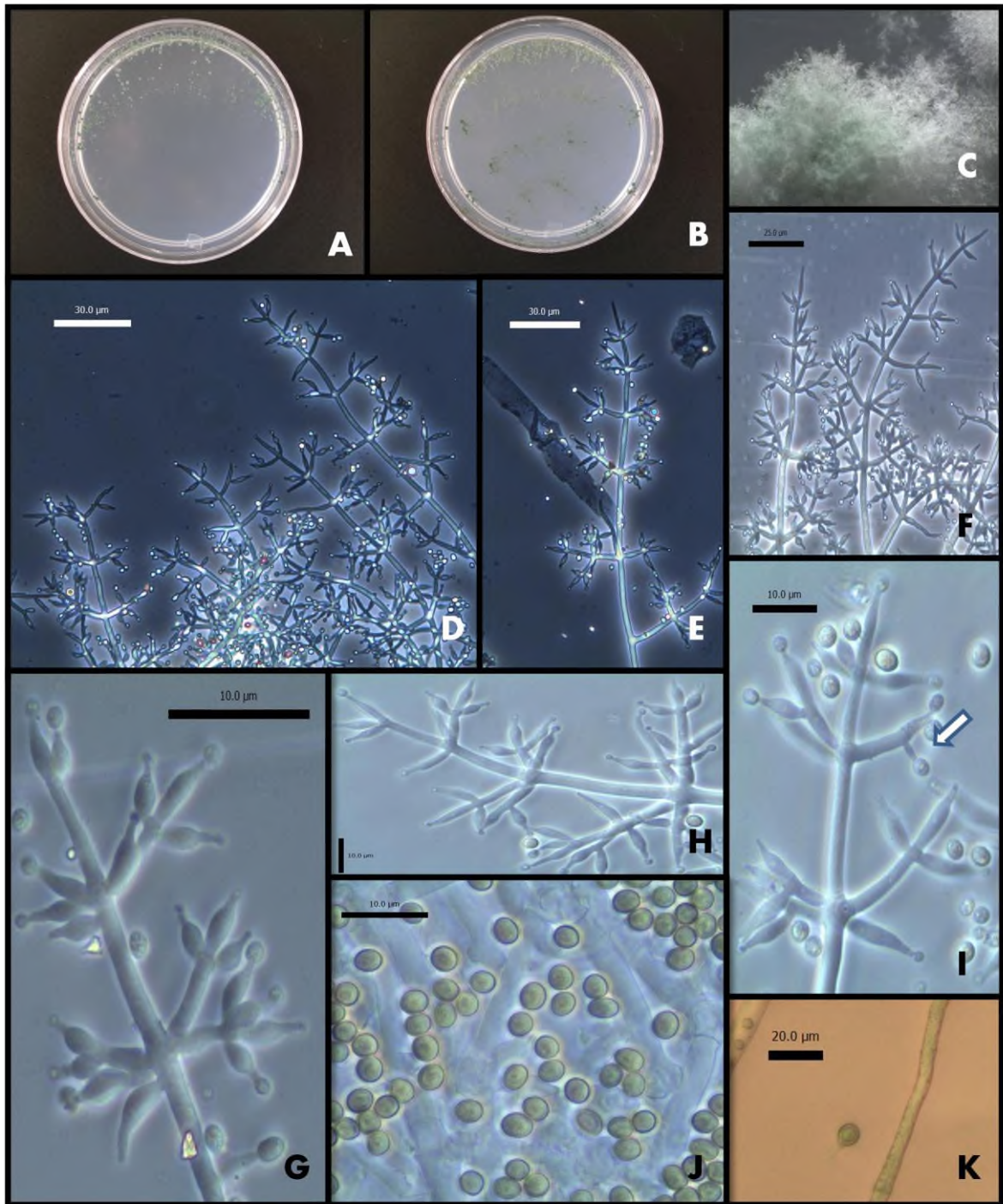
**Figura 5.** Morfología de la especie *T. asperelloides*. A) Pústula sobre SNA vista con el microscopio estereoscópico a 25x (VSL 107). B) Fiálides lageniformes (VSL 107). C) Conidióforo con características de la sección *Trichoderma* (VSL 4). D) Conidias con ornamentación finamente rugosa (VSL 97). E) Fiálide intercalado (VSL 105). F-G) Clamidosporas terminales e intercaladas (VSL 105).

Estudios reportados en la literatura muestran que *T. asperelloides* es una especie cosmopolita, pero principalmente se encuentra distribuida en climas tropicales (Samuels *et al.*, 2009), y es de importancia en el control biológico.

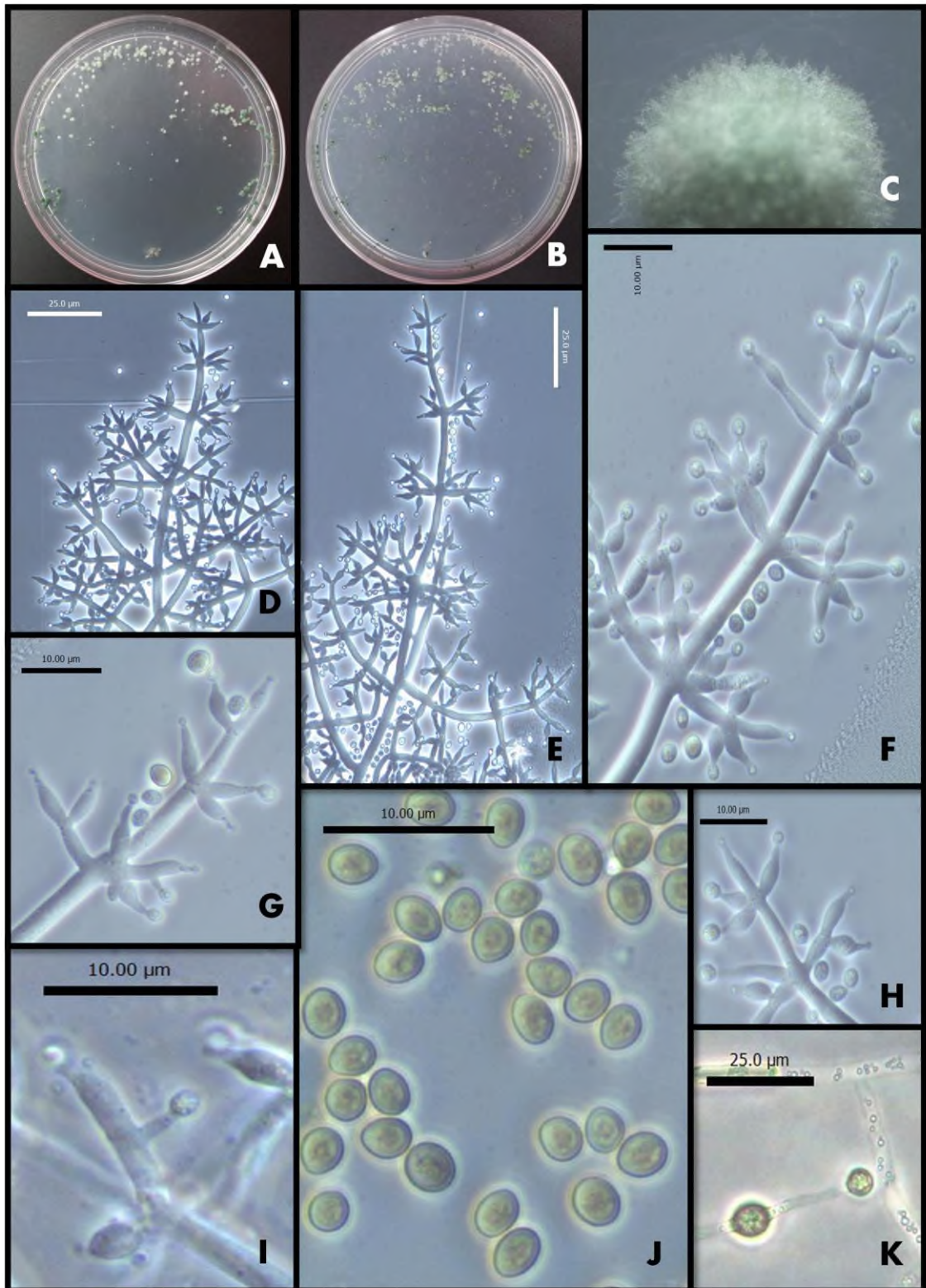
En México no existe ningún reporte de esta especie, hasta ahora presenta el primer reporte para esta especie con cepas nativas de esta región del Papaloapan donde el clima es tropical, lo cual coincide con lo reportado por Samuels *et al.*, (2009).



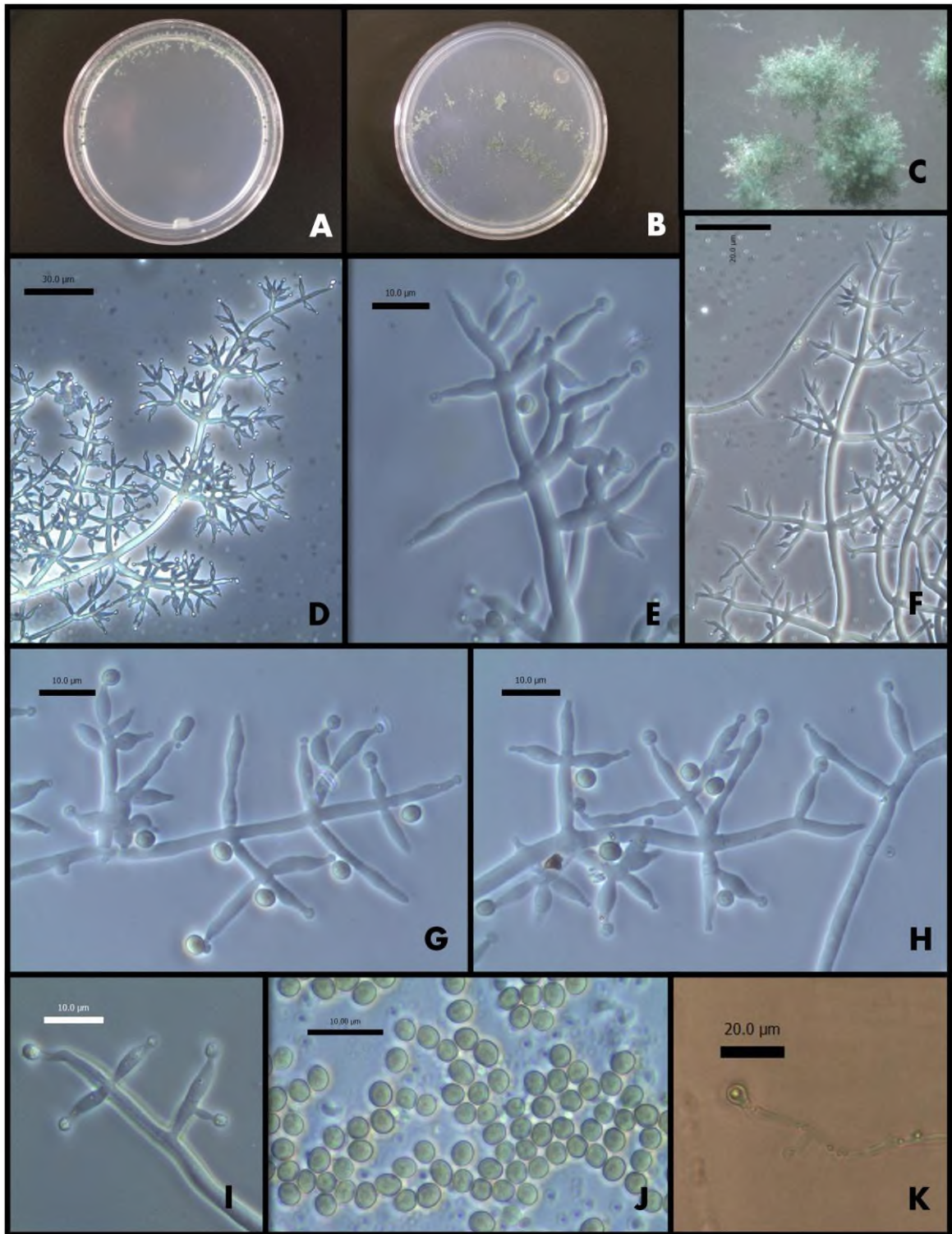
**Figura 6.** Aislado VSL 4 de *T. asperelloides*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en CMD. D-E y H-I) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 40x a los 4 d en SNA, F) Conidióforos observados a 20x a los 4 d en SNA. G) Fiálide intercalado a los 4 d en SNA. J-K) Fiálides observados a 100x a los 3 d en SNA. L) Conidias vistas a 100x a los 5 d en CMD, y M) Clamidosporas observadas con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d en CMD.



**Figura 7.** Aislado VSL 97 de *T. asperelloides*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 5 d en CMD. D-E) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 20x a los 4 d en SNA. F) Conidióforo observado a 40x a los 4 d en SNA. G-H) Fiálides observados al microscopio compuesto a 100x a los 4 d en SNA. I) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. J) Conidias vistas en el microscopio compuesto a 100x a los 5 d en CMD, y K) Clamidospora observada con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d en CMD.



**Figura 8.** Aislado VSL 105 de *T. asperelloides*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula vista con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d. D y E) Conidióforos vistos en el microscopio compuesto a 40x a los 4 d en SNA. F-H) Fiálides observados a 100x a los 4 d en SNA. I) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. J) Conidias vistas a 100x a los 6 d en CMD, y K) Clamidosporas observadas con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d en CMD.

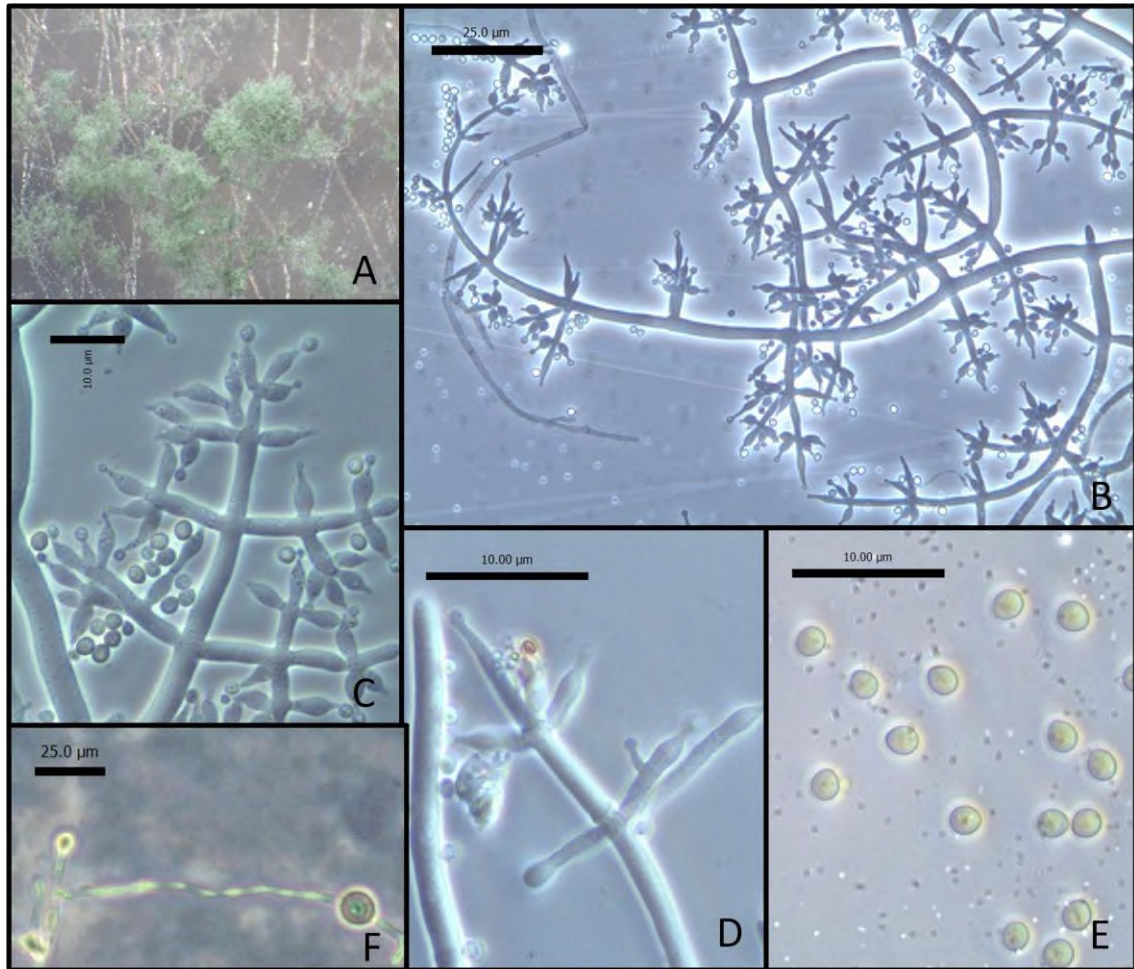


**Figura 9.** Aislado VSL 107 de *T. asperelloides*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en CMD. D y F) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 20x y 40x a los 4 d en SNA. E, G-H) Fiálides observados a 100x a los 4 d en SNA, I) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. J) Conidias vistas a 100x a los 5 d en CMD. K) Clamidospora vista con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d sobre CMD.

### 2.1.1. VSL 99, VSL 100 y VSL 110

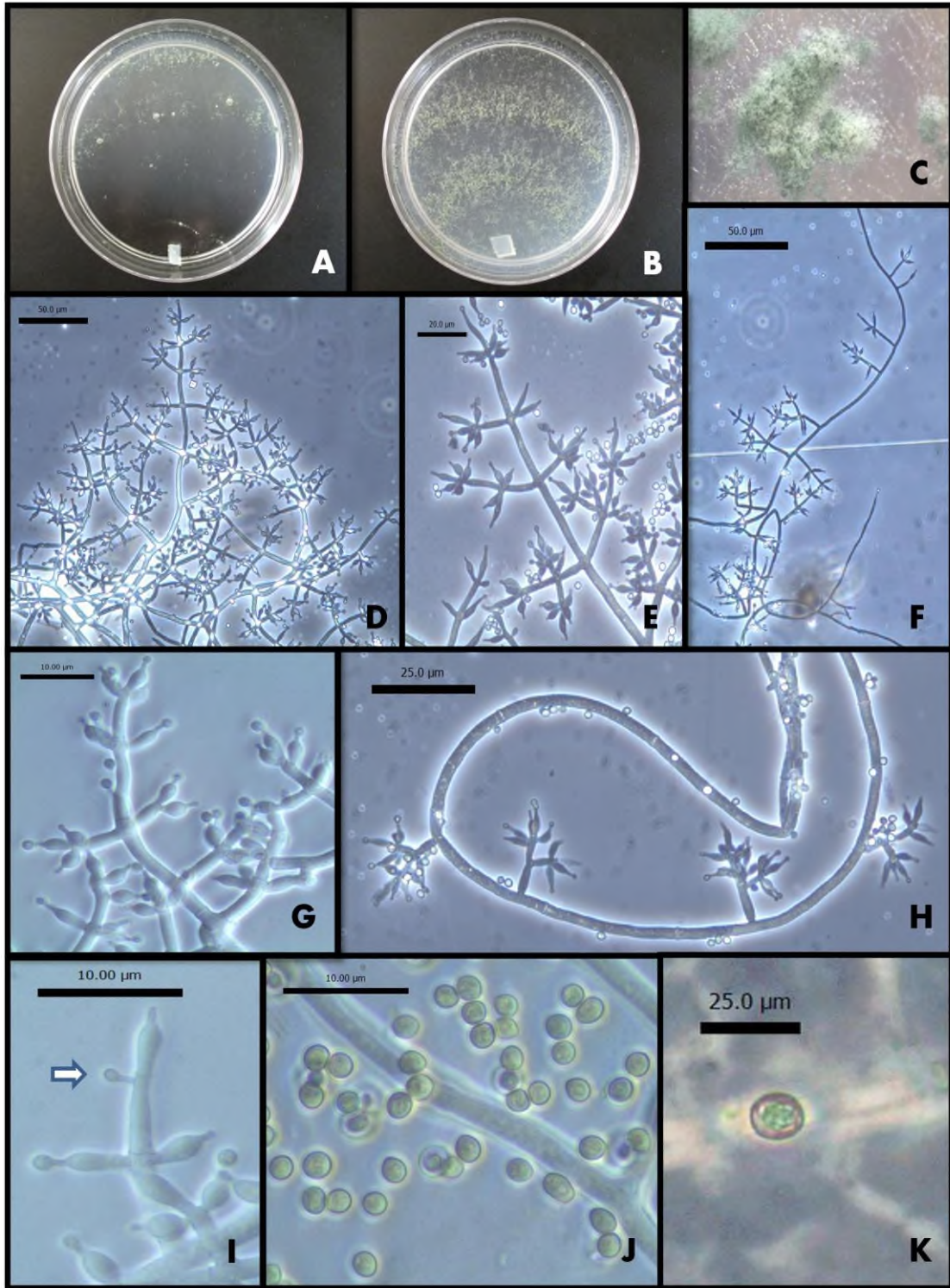
Los aislados fueron crecidos en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivo en 4 d. Las colonias no produjeron olor a coco y tampoco pigmentos difundidos en ningún medio de cultivo. En ambos medios de cultivo se generaron pústulas al igual que racimos de conidióforos, las cuales primero presentaron un color blanco y después un color verde oscuro, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula (Figura 10A). Los conidióforos formaron un eje longitudinal central, las ramas laterales generalmente en pares, las fiálides formaron cruces bien definidos distribuidos regularmente, también se observaron conidióforos sinanamorfos con características similares a *Gliocladium* (Figura 10B). Las conidias presentaron un color verde, de forma globosa a subglobosa con una ornamentación lisa (Figura 10E). Las fiálides tuvieron formas lageniformes, más o menos hinchados en la parte media, la mayoría fueron curvos y algunos rectos (Figura 10C), además produjo fiálides intercalados (Figura 10D). Sus clamidosporas fueron de forma globosa a subglobosa, unicelular, terminales e intercaladas y solitarias (Figura 10F). De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, pertenece a la sección *Trichoderma*. Al usar las claves de Rifai (1969) se identificaron como *T. harzianum*. Con las claves de Gams y Bissett (1998) y Jaklitsch *et al.*, (2006) se identificaron como *T. atroviride*. Por otra parte, la clave reportada por Chaverri *et al.*, (2003) se identificaron como *T. virens*, y con la clave de Samuels *et al.*, (2006b) se identificó como *T. ovalisporum*.

Los aislados VSL 99 (Figura 11), VSL 100 (Figura 12) y VSL 110 (Figura 13) se identificaron como *T. harziaum*, *T. atroviride*, *T. virens* y *T. ovalisporum*, respectivamente por características similares a las reportadas. Sin embargo no corresponden con las características de estas especies. *T. harzianum* no produce fiálides intercalados y tampoco sinanamorfos similares a *Gliocladium* como Los aislados estudiados. *T. atroviride* no produce un sinanamorfo como *Gliocladium* y tampoco fiálides intercalados. *T. virens* no forma un sinanamorfo como *Gliocladium* y los aislados analizadas si lo forman. *T. ovalisporum* produce fiálides intercalados pero no produce un sinanamorfo como *Gliocladium*, además la forma de sus conidias son ovoides, por lo que tampoco corresponde a esta especie.

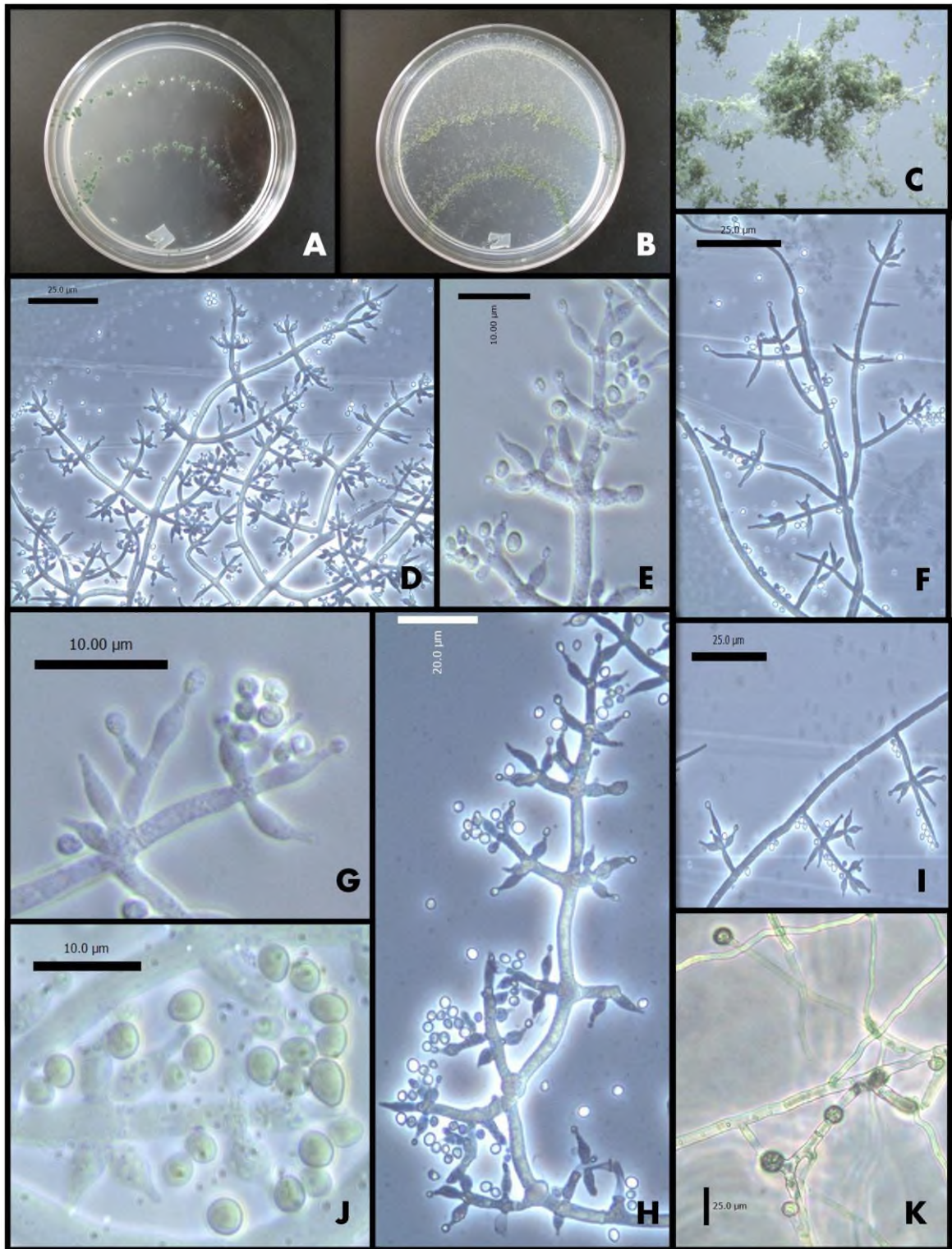


**Figura 10.** Morfología de los aislados pertenecientes a la sección *Trichoderma*. A) Pústula sobre SNA visto con el microscopio estereoscópico a 35x (VSL 99). B) Conidióforos del sinanamorfo parecidos a *Gliocladium* (VSL 100). C) Fiálides lageniformes mas o menos hinchados en la parte media (VSL 110). D) Fiálide intercalado (VSL 100). E) Conidias globosas a subglobosas (VSL 110). F) Clamidosporas terminales e intercaladas (VSL 99).

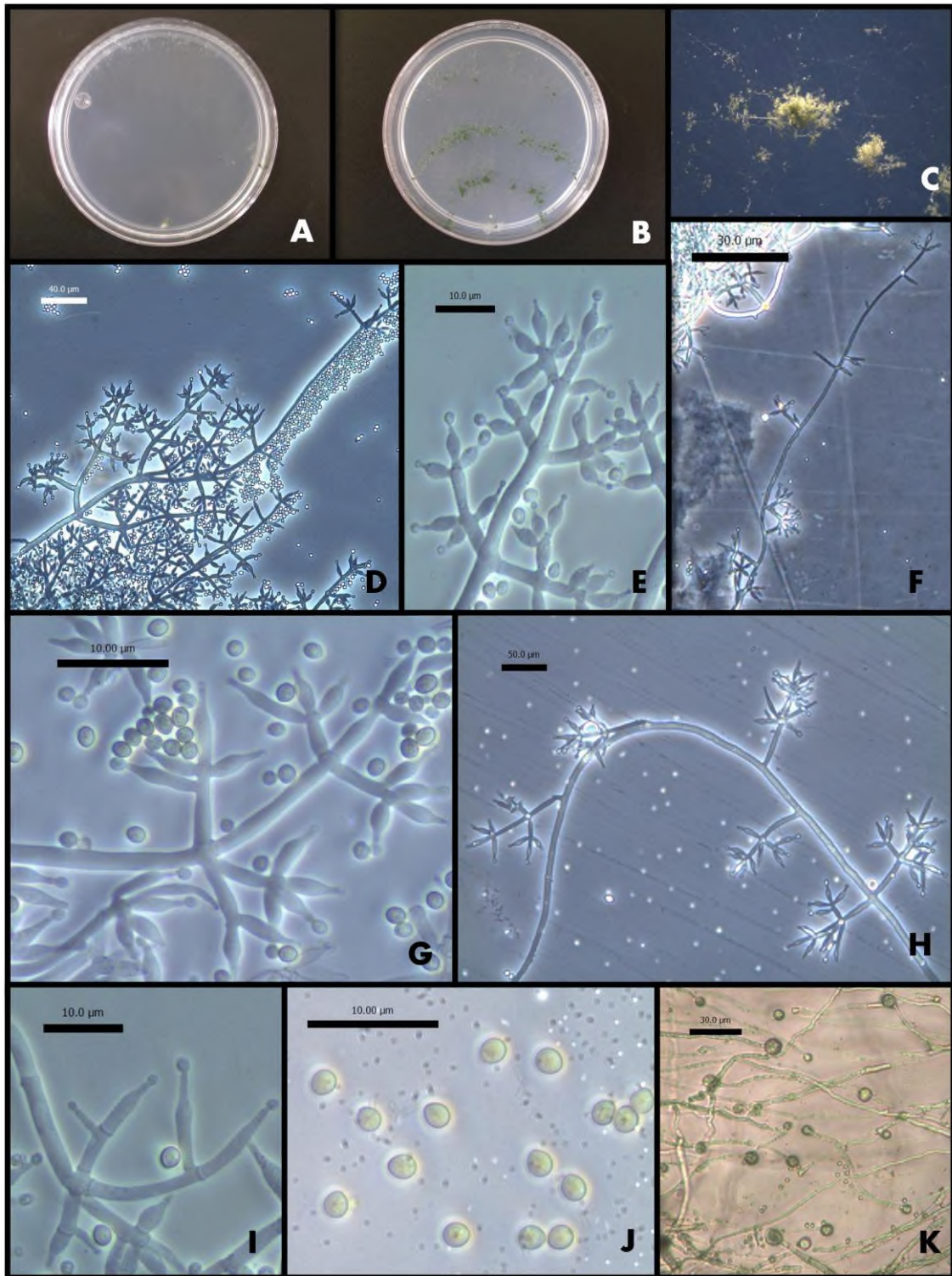
Al utilizar la clave interactiva disponible en línea <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> estos aislados se identificaron como *T. harzianum*, *T. aggressivum*, *T. pleuriticola*, y *T. atroviride*. Pero no pueden ser ninguna de estas especies porque ninguna produce fiálides intercalados y tampoco un conidióforo sinanamorfo como *Gliocladium*. Ante esta situación es necesario secuenciar algunos genes y mediante un árbol filogenético realizar una correcta identificación de estos cuatro aislados.



**Figura 11.** Aislado VSL 99. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula vista con el microscopio estereoscópico a 35x a los 5 d en CMD. D-E) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 20x y 40x a los 4 d en SNA. F y H) Sinamorfo *Gliocladium* observado a 20x a los 4 d en SNA. G) Fiálides observados al microscopio compuesto a 100x a los 4 d en CMD. I) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. J) Conidias observadas en el microscopio compuesto a 100x a los 6 d en CMD, y K) Clamidospora observada con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d sobre CMD.



**Figura 12.** Aislado VSL 100. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula vista con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en SNA. D y H) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 40x a los 4 d en SNA. E) Fiálides observados a 100x a los 4 d en SNA. F e I) Sinanamorfo *Gliocladium* observado a 40x a los 4 d en SNA. G) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. J) Conidias observadas en el microscopio compuesto a 100x a los 6 d en CMD. y K) Clamidosporas vistas con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d en CMD.

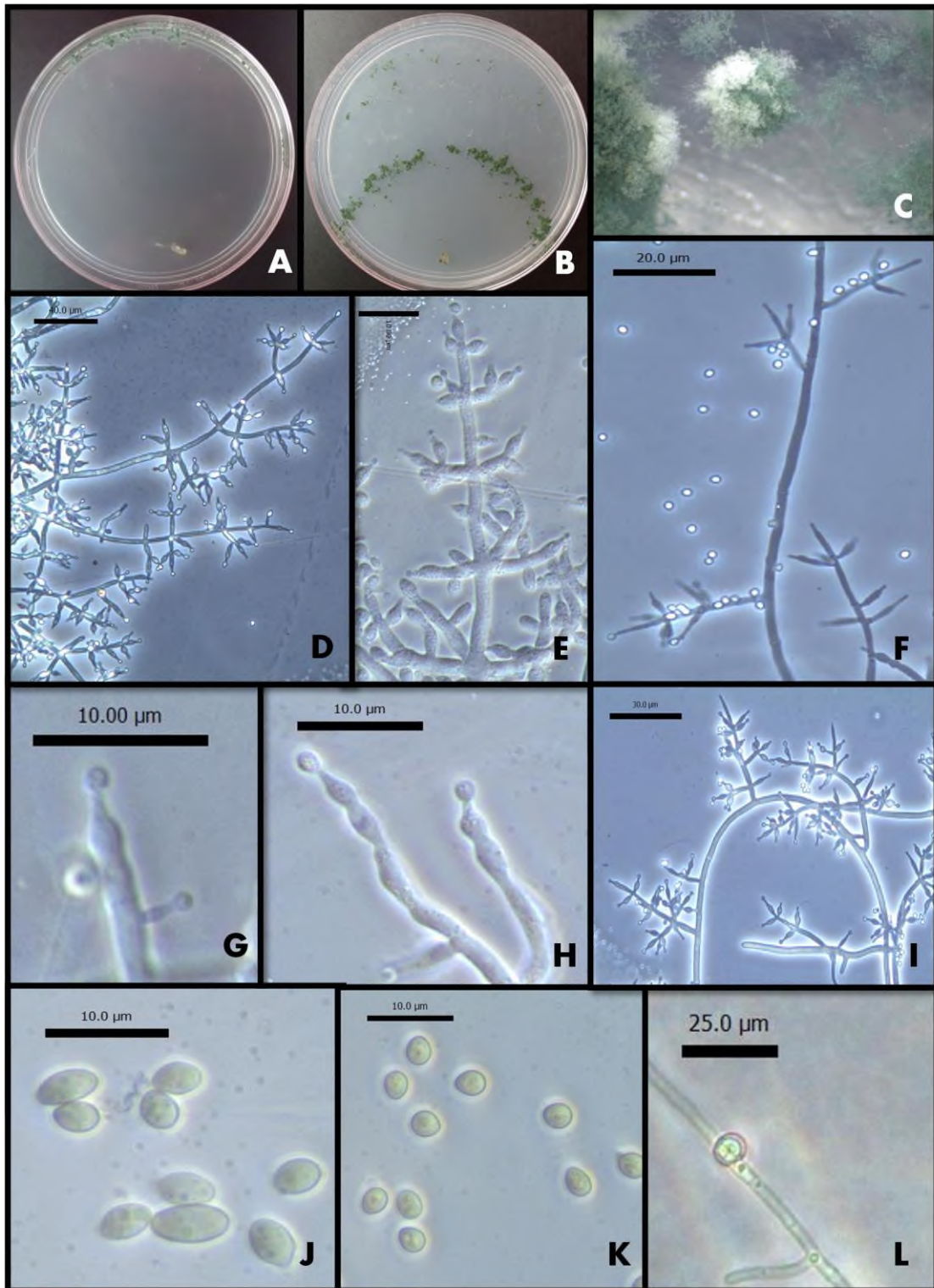


**Figura 13.** Aislado VSL 110. A) Sobre CMD a los 7 d., B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en SNA. D) Conidióforo observado en el microscopio compuesto a 20x a los 4 d en SNA. E y G) Fiálides observados a 100x los 4 d. en SNA. F y H) Sinanamorfo *Gliocladium* a los 4 d en CMD. I) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. J) Conidias observadas a 100x a los 5 d en SNA, y K) Clamidosporas vistas con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d sobre CMD.

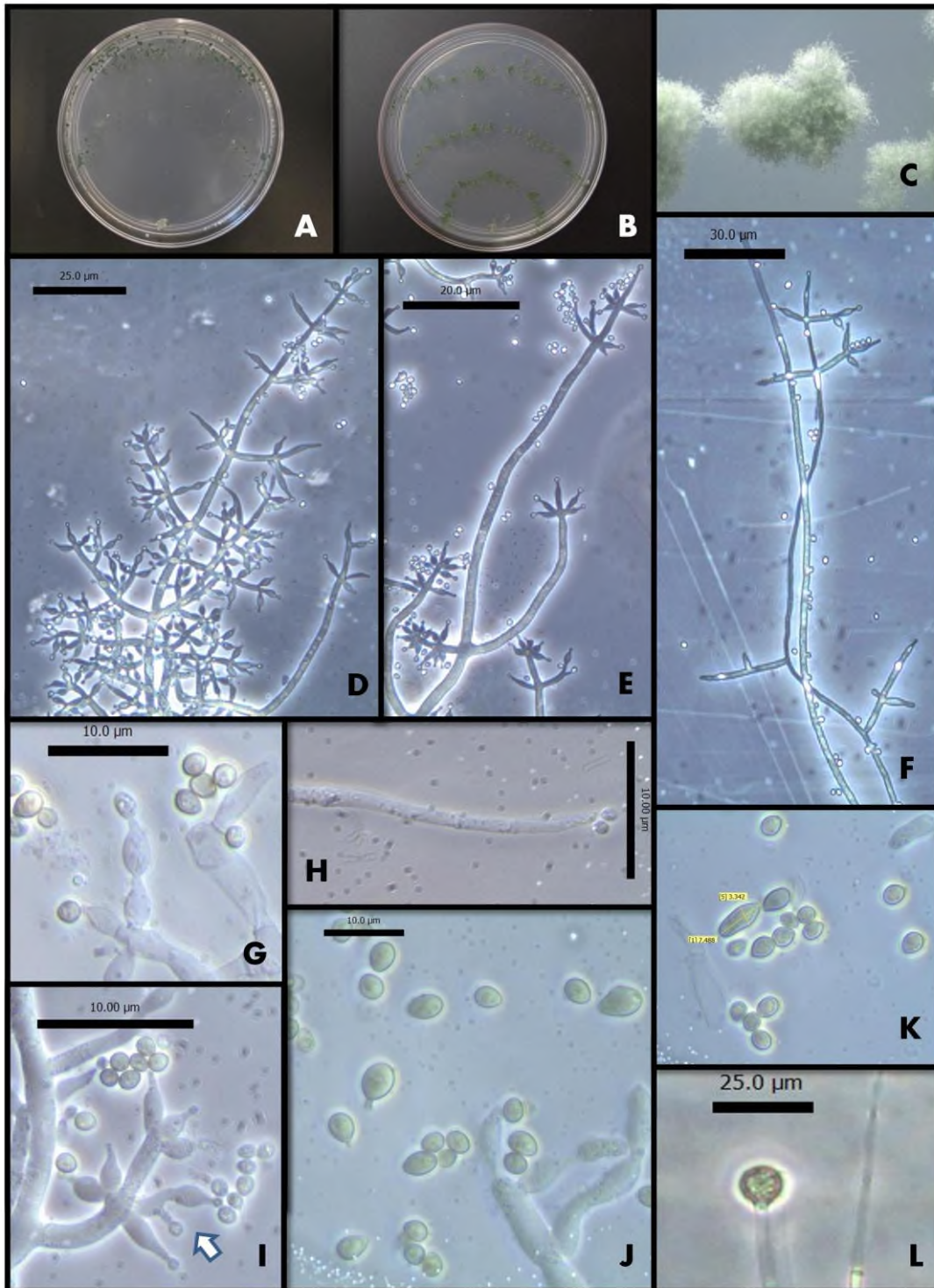
### 2.1.1. VSL 104 y VSL 117

Los aislados fueron crecidos en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivo en 4 d. La colonia no produjo olor a coco en ningún medio de cultivo, en el medio SNA no presentó pigmentos difundidos y en CMD se observó un color amarillo. En los medios CMD y SNA se generaron pústulas en anillos concéntricos así como también racimos de conidióforos (Figuras 14B-15B), las cuales primero presentaron un color blanco y después un color verde oscuro, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula (Figuras 14C-15C). Los conidióforos presentaron un eje longitudinal central, las ramas laterales generalmente en pares, las fiálides formaron cruces bien definidos distribuidos regularmente (Figuras 14E-15D), además se formaron conidióforos sinanamorfos con características similares a *Gliocladium-Verticillium* (Figuras 14F,I-15E,F). Las conidias presentaron un color verde, de forma subglobosa a anchamente elipsoidal con una ornamentación lisa (Figuras 14J,K-15J,K). Las fiálides obtuvieron forma lageniformes, más o menos hinchados en la parte media, la mayoría fueron rectos y algunos curvos, produjo fiálides intercalados (Figuras 14G-15I) y proliferados (Figuras 14H-15G). Sus clamidosporas fueron de forma globosa a subglobosa, unicelular, terminales (Figura 15L) e intercaladas (Figura 14L) y solitarias. De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, pertenece a la sección *Trichoderma*. Al usar la clave interactiva disponible en línea <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> se identificó como *T. viridescens* y *T. gamsii*.

Las claves taxonómicas empleadas dieron como resultado que los aislados VSL 104 (Figura 14) y VSL 117 (Figura 15) pertenecen a las especies de: *T. viridescens* y *T. gamsii*. Por lo que se descarta la idea de que sean algunas de éstas, debido a que *T. viridescens* produce conidias rugosas mientras que los aislados evaluados no y por otro lado tampoco es posible que sea *T. gamsii*, debido a que no produce un sinanamorfo como *Gliocladium-Verticillium*.



**Figura 14.** Aislado VSL 104. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula vista con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en CMD. D y E) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 20x y 100x a los 4 d en SNA. F e I) Sinanamorfo *Gliocladium* visto a 40x a los 4 d en SNA. G) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. H) Fiálides proliferados a 100x a los 4 d en SNA. J y K) Conidias observadas con el microscopio compuesto a 100x a los 6 d en CMD, y L) Clamidospora observada con magnificación 20x a los 7 d en CMD.



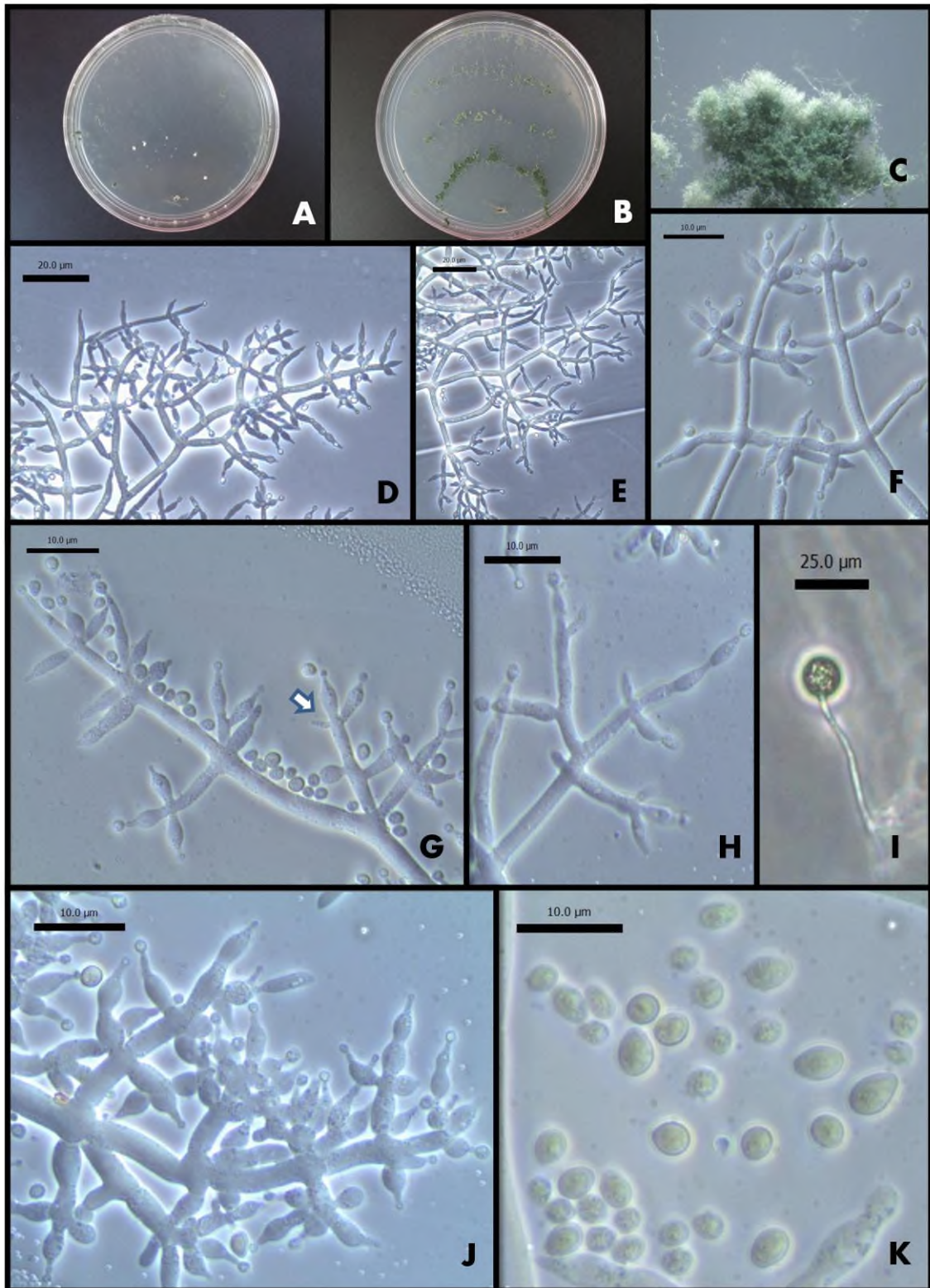
**Figura 15.** Aislado VSL 117. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en CMD. D-E) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 40x a los 4 d en SNA. F) Sinanamorfo *Verticillium* visto a los 4 d en SNA. G) Fiálide proliferado observado a 100x a los 4 d en SNA. H) Fiálide con característica del género *Pachybasium* visto a 100x a los 4 d en SNA. I) Fiálide intercalado visto 100x a los 4 d en SNA. J-K) Conidias vistas a 100x a los 5 d en SNA, y L) Clamidospora observada en el microscopio compuesto a 20x a los 7 d en CMD.

### 2.1.1. VSL 106

El aislado fue crecido en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivo en 4 d. La colonia no produjo olor a coco y tampoco pigmentos difundidos en ningún medio de cultivo, pero en al día 7 se observó un color amarillo sobre CMD. En medios de cultivo CMD y SNA se generaron pústulas en forma de anillos concéntricos aunque también se generaron racimos de conidióforos (Figura 16B), las cuales primero presentaron un color blanco y después un color verde oscuro, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula (Figura 16C). Los conidióforos presentaron características de la sección *Trichoderma*, con un eje longitudinal central, las ramas laterales generalmente en pares, las fiálides formaron cruces bien definidos distribuidos regularmente (Figura 16D-F). Las conidias presentaron un color verde, de forma elipsoidal a ovalada con una ornamentación lisa (Figura 16K). Las fiálides tuvieron forma lageniforme, la mayoría fueron rectos y otros curvos, se formaron fiálides intercalados (Figura 16G) y proliferados (Figura 16H,J). Sus clamidosporas fueron de forma globosa, unicelular, terminales e intercaladas y solitarias (Figura 16I). De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, fue identificada como *T. gamsii*. Con la clave reportada por Jaklitsch *et al.*, (2006) se identificó como *T. gamsii*.

El aislado VSL 106 (Figura 16), se identificó como *T. gamsii*, y pertenece a la sección *Trichoderma* (Gams y Bissett., 1998). Sus características morfológicas correspondieron a las descripciones realizadas por Jaklitsch *et al.*, (2006).

En la literatura existen pocos reportes de esta especie y solo se han encontrado en Italia, Estados Unidos, Australia y en Rusia. Se ha aislado de suelos agrícolas y forestales, solo una vez se ha encontrado como endófito en un helecho y en un tallo de *Riccinus communis* (higuerilla) (Jaklitsch *et al.*, 2006). Para México este sería el primer reporte de *T. gamsii*, como un habitante de un ecosistema tropical.

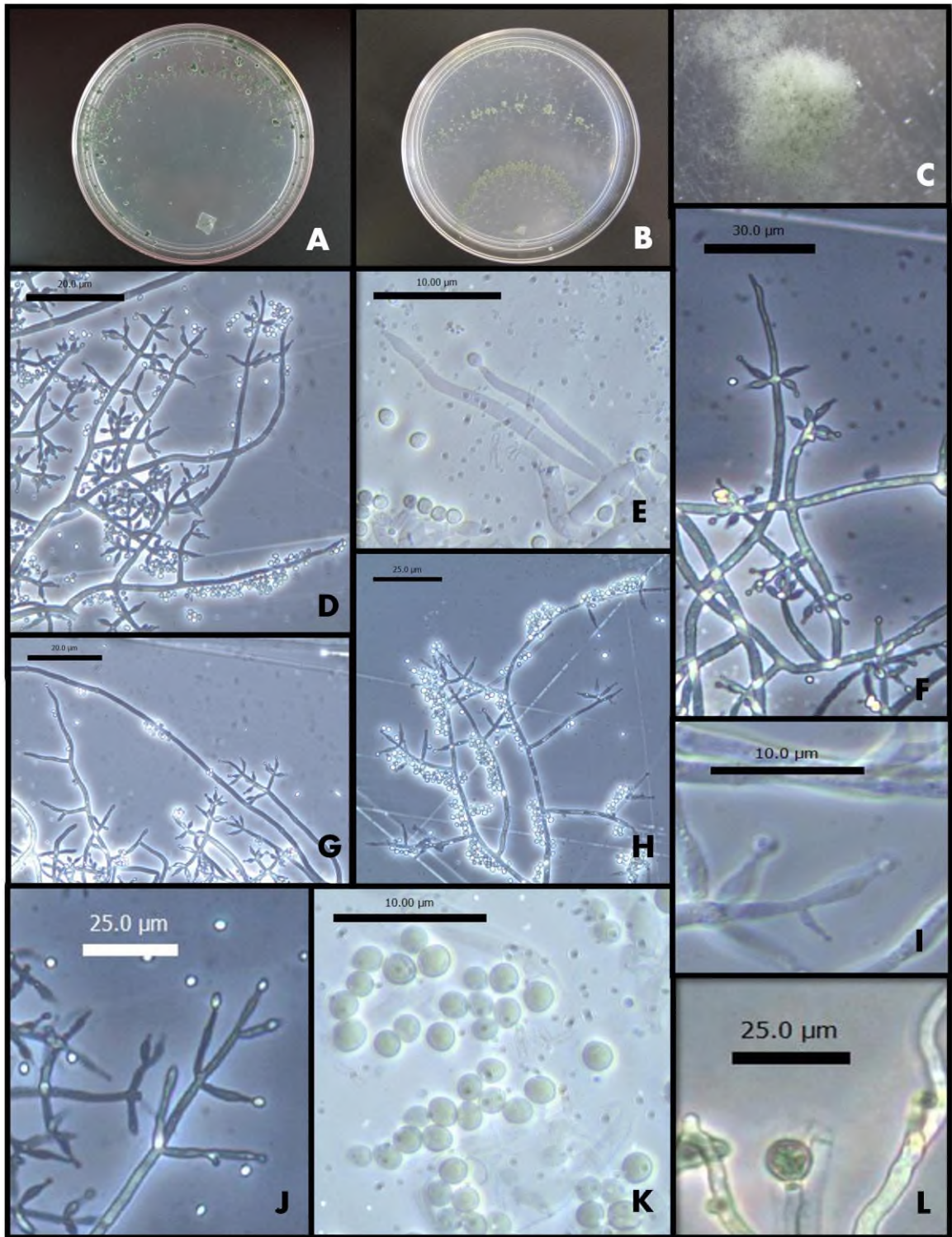


**Figura 16.** Aislado VSL 106 de *T. gamsii*. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en CMD. D y E) Conidióforos observados en el microscopio compuesto a 20x y 40x a los 4 d en SNA. F y J) Fiálides observados a 100x a los 4 d en SNA. G) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. I) Clamidospora vista a 20x los 7 d en CMD, y K) Conidias observadas a 100x a los 5 d en CMD.

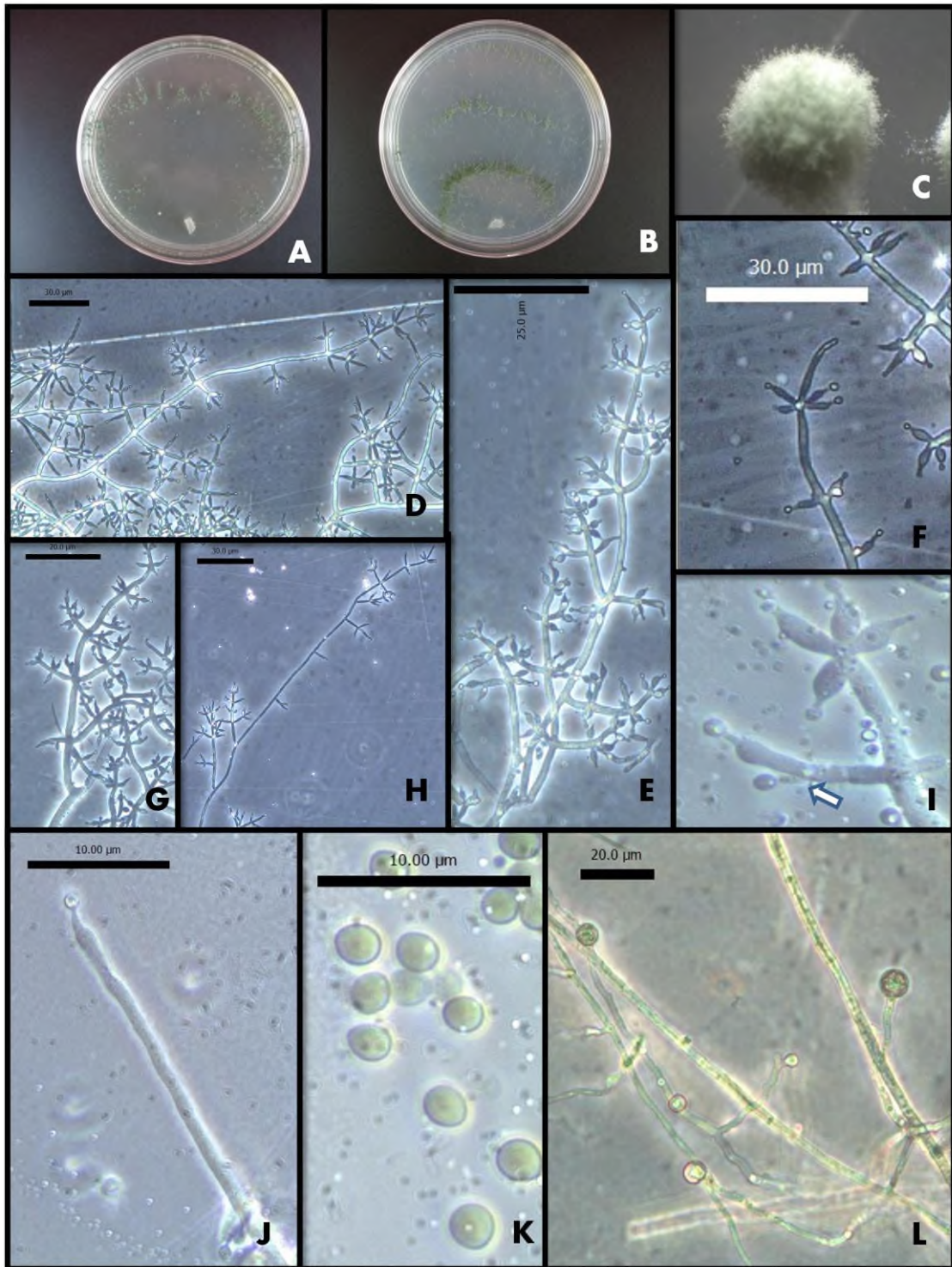
### 2.1.1. VSL 116 y VSL 118

Los aislados fueron crecidos en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivo en 4 d. Las colonias produjeron pigmentos difundidos, amarillo pálido en CMD y amarillo más intenso en SNA pero no hubo olor a coco en ningún medio de cultivo. En ambos medios de cultivo se generaron pústulas al igual que racimos de conidióforos, en SNA se observaron anillos concéntricos de las cuales primero presentaron un color blanco y después un color verde oscuro (Figuras 17B-18B), con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula. Se formaron conidióforos de tipo *Pachybasium* (Figuras 17E-18J), y *Trichoderma* (Figuras 17D-18D,E,G), además de un sinanamorfo similar a *Verticillium* (Figuras 17G,H,J-18H). Las conidias presentaron un color verde, de forma globosa a anchamente elipsoidal con una ornamentación lisa (Figuras 17K-18K). Las fiálides tuvieron una forma lageniforme, la mayoría fueron curvos y algunos rectos (Figuras 17F-18F), se formaron fiálides intercalados (Figuras 17I-18I). Las clamidosporas de forma globosa a subglobosa, unicelular, terminales e intercaladas y solitarias (Figuras 17L-18L). De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, pertenece a la sección *Trichoderma*. No fue posible identificarlas a nivel de especie.

Los aislados VSL 116 (Figura 17) y VSL 118 (Figura 18), mostraron características muy similares a la sección *Trichoderma* producen dos anamorfos: uno parecido a *Trichoderma* y otro semejante a *Pachybasium*, y también un sinanamorfo como *Verticillium*. De acuerdo a la clave interactiva disponible en línea <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>, no pertenece a ninguna especie reportada en la base de datos, y con las claves de taxonómicas tampoco corresponden a ninguna de las especies ya reportadas, por lo que se cree que pueden pertenecer a una nueva especie de la sección *Trichoderma*.



**Figura 17.** Aislado VSL 116. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 5 d en CMD. D) Conidióforo observado en el microscopio compuesto a 40x a los 4 d en SNA. E) Fiálides con características del género *Pachybasium* visto a 100x a los 4 d en SNA. F y J) Fiálides observados en microscopio compuesto a 20x a los 4 d. G y H) Sinanamorfo *Gliocladium-Verticillium* observado a 40x a los 4 d en SNA. I) Fiálide intercalado a 100x a los 4 d en SNA. K) Conidias observadas a 100x a los 5 d en CMD, y L) Clamidospora vista a 20x a los 7 d sobre CMD.



**Figura 18.** Aislado VSL 118. A) Sobre CMD a los 7 d. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 5 d en CMD. D-E y G) Conidióforos observados con el microscopio compuesto a 20x y 40x a los 4 d en SNA. F) Fiálides observados a 100x a los 4 d en SNA. H) Sinanamorfo *Verticillium* a los 4 d en SNA. I) Fiálide intercalado visto a 100x a los 4 d en SNA. J) Fiálide con característica del género *Pachybasium* a los 4 d en SNA. K) Conidias observadas a 100x a los 5 d en SNA, y L) Clamidosporas observadas con el microscopio compuesto a 20x a los 7 d en CMD.

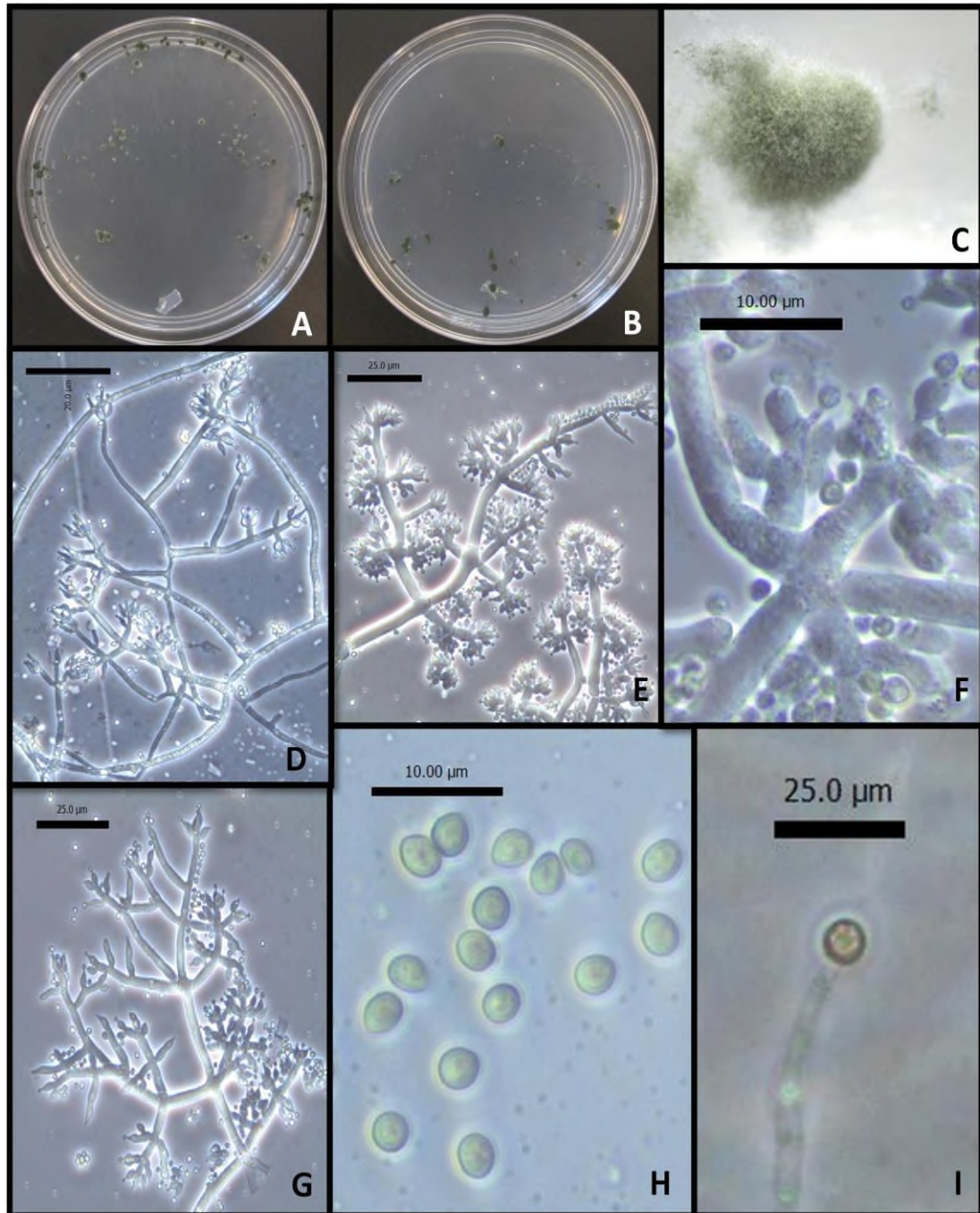
### 2.1.1. VSL 127

El aislado fue crecido en los medios CMD y SNA a 25-27 °C durante 7 d. El micelio cubrió la superficie de los medios de cultivos en 5 d. La colonia no produjo pigmentos difundidos, y tampoco olor a coco en ningún medio de cultivo. En ambos medios de cultivo se generaron pústulas de las cuales primero presentaron un color blanco y después un color verde oscuro, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula (Figura 19C). Los conidióforos presentaron características de la sección *Pachybasium* (Figura 19E) con un eje longitudinal central, las ramas laterales generalmente en pares, las fiálides forman cruces bien definidos distribuidos regularmente y con hifas fértiles, además de que se formaron conidióforos sinanamorfos con características similares a *Gliocladium-Verticillium* (Figura 19D,G). Las conidias presentaron un color verde, de forma subglobosa a anchamente elipsoidal con una ornamentación lisa (Figura 19H). Las fiálides tuvieron formas lageniforme y ampuliforme, curvos y rectos, hubo formación de fiálides intercalados (Figura 19F). Produjo muy pocas clamidosporas de forma globosa a subglobosa, unicelular, terminales y solitarias (Figura 19I). De acuerdo a su morfología y mediciones obtenidas, pertenece a la sección de *Pachybasium*. Al usar la clave interactiva disponible en línea <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> se identificó como *T. ovalisporum*.

El aislado VSL 127 (Figura 19) mostró características típicas de la sección *Pachybasium* (Bissett, 1991; Gams y Bissett, 1998). Con la ayuda de la clave interactiva disponible en línea <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>, este aislado correspondió a *T. ovalisporum*, la cual produce conidias de forma ovoidal, y no produce sinanamorfos como el aislado VSL 127, esta forma conidias subglobosas a anchamente elipsoidal, además produce un sinanamorfo tipo *Gliocladium-Verticillium*. Con las claves descritas por los taxónomos del género no se logra identificar a ninguna especie.

Se deben realizar análisis de secuencias de genes ITS (Intron del Factor de Elongación de la Traducción 1 $\alpha$ ) y TEF (Espaciador Interno Transcrito del rRNA), para corroborar nuestros resultados y también hacer árboles filogenéticos para confirmar las especies identificadas. En el caso de las cepas que no se llegaron a identificar a nivel especie, es necesario complementar los estudios morfológicos con el crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas y medios de cultivo, además secuenciar y analizar los genes ITS,

TEF, Calmodulina y Actina. Con toda esta información ya podemos afirmar si son nuevas especies.



**Figura 19.** Aislado VSL 127. A) Sobre CMD a los 7. B) Sobre SNA a los 7 d. C) Pústula observada con el microscopio estereoscópico a 35x a los 6 d en CMD. D) Sinanamorfo *Gliocladium-Verticillium* a los 4 d en SNA. E y G) Conidióforos observados con el microscopio compuesto a 40x a los 4 d en CMD. F) Fiálide intercalado observados a 100x a los 4 d en CMD. H) Conidias observadas a 100x a los 6 d en CMD, y I) Clamidospora observada en el microscopio compuesto a 20x a los 10 d en CMD.

**Tabla 5** Mediciones de conidias, fiálides y clamidosporas de aislados presentes en el agro-ecosistema cultivado con caña de azúcar, crecidas en medios CMD y SNA

<b>Cepas de <i>Trichoderma</i></b>								
	VSL 4	VSL 97	VLS 99	VSL 100	VSL 104	VSL 105	VSL 106	VSL 107
<b>Origen</b>								
	Suelo cultivado con caña de azúcar en PinachoTuxtepec	Suelo cultivado con caña de azúcar en PinachoTuxtepec	Suelo cultivado con caña de azúcar en el tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Suelo cultivado con caña de azúcar en el tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Suelo cultivado con caña de azúcar en el tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Suelo cultivado con caña de azúcar en el tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Suelo cultivado con caña de azúcar en el tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Suelo cultivado con caña de azúcar en PinachoTuxtepec
<b>Especies identificadas</b>								
	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. asperelloides</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. gamsii</i>	<i>T. asperelloides</i>
<b>Características de Conidias</b>								
Largo $\mu\text{m}$	(2.87-3.08-3.45(-3.75)	(3.0-3.14-3.56(-3.93)	2.16-2.57-2.99(-3.23)	(3.01-3.14-3.46(-3.64)	(2.79-2.93-3.36(-3.73)	(2.42-2.66-3.03(-3.22)	(3.90-4.09-5.14(-5.81)	(2.40-) 3.12-3.58 (-3.78)
95 % IC	3.22-3.31	3.29-3.4	2.70-2.86	3.24-3.36	3.07-3.22	2.78-2.91	4.43-4.80	3.28-3.41
n	30	30	30	30	30	30	30	30
Ancho $\mu\text{m}$	(2.63-2.8-3.03(-3.21)	(2.59-2.83-3.21(-3.65)	(2.12-2.43-2.76(-2.97)	(2.69-2.77-2.99(-3.09)	(2.32-2.67-2.99(-3.13)	(2.25-2.29-2.56(-2.91)	(2.27-2.59-3.44(-4.71)	(2.74-) 2.87-3.14 (-3.25)
95 % IC	2.89-2.95	2.96-3.07	2.54-2.65	2.84-2.92	2.77-2.89	2.37-2.47	2.87-3.17	2.97-3.04
n	30	30	30	30	30	30	30	30
L/A $\mu\text{m}$	(1.0-1.05-1.18(-1.32)	(0.85-1.01-1.20(-1.28)	(1.01-1.02-1.11(-1.15)	(1.02-1.07-1.21(-1.29)	(0.99-1.03-1.19(-1.29)	(1.01-1.09-1.25(-1.32)	(0.90-1.32-1.78(-2.07)	(0.77-) 1.03-1.19 (-1.30)
95 % IC	1.1-1.13	1.08-1.14	1.05-1.08	1.12-1.17	1.08-1.14	1.14-1.20	1.46-1.63	1.09-1.13
n	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>Características de Fiálides</b>								
Largo $\mu\text{m}$	(5.94-6.63-10.26(-14.35)	(5.68-6.79-9.77(-12.24)	(5.35-7.00-12.08(-14.36)	(2.80-4.81-9.06(-11.64)	(5.73-6.84-12.36(-17.36)	(4.52-4.70-10.37(-14.76)	(6.10-7.13-10.46(-11.90)	(10.0-) 11.41-15.35 (-18.16)
95 % IC	8.02-8.87	7.87-8.7	8.63-10.45	6.17-7.70	8.61-10.59	6.52-8.55	8.20-9.39	12.83-13.93
n	30	30	30	30	30	30	30	30
Ancho $\mu\text{m}$	(1.8-2.20-2.99(-3.48)	(2.09-2.28-2.87(-3.35)	(2.16-2.33-2.97(-3.33)	(1.72-1.84-2.19(-2.35)	(2.36-2.58-3.19(-3.50)	(1.49-1.80-2.75(-3.41)	(2.35-2.64-3.36(-4.06)	(3.12-) 3.50-4.13 (-4.68)
95 % IC	2.5-2.69	2.49-2.66	2.53-2.76	1.95-2.08	2.78-2.99	2.10-2.44	2.88-3.13	3.73-3.90
n	30	30	30	30	30	30	30	30
L/A $\mu\text{m}$	(1.78-2.28-4.46(-6.83)	(2.09-2.42-4.14(-5.72)	(2.04-2.37-5.05(-6.54)	(1.23-2.30-4.62(-6.20)	(1.63-2.17-4.66(-6.31)	(1.85-1.89-5.10(-7.87)	(1.90-2.28-3.65(-4.31)	(2.13-) 2.86-4.22 (-5.35)
95 % IC	3.11-3.63	3.04-3.52	3.23-4.19	3.07-3.90	2.97-3.86	2.92-4.07	2.72-3.21	3.35-3.73
n	30	30	30	30	30	30	30	30
Base $\mu\text{m}$	(1.14-1.48-1.91(-2.20)	(1.32-1.55-2.08(-2.52)	(1.08-1.50-2.17(-2.43)	(0.91-1.19-1.74(-2.02)	(1.22-1.64-2.36(-3.00)	(1.11-1.11-2.03(-3.19)	(1.29-1.51-2.23(-2.58)	(1.75-) 2.21-3.13 (-3.94)
95 % IC	1.65-1.75	1.74-1.89	1.72-1.96	1.37-1.56	1.87-2.13	1.41-1.73	1.74-2.00	2.54-2.80
n	30	30	30	30	30	30	30	30
Eje $\mu\text{m}$	(1.91-2.09-2.79(-3.63)	(2.08-2.28-2.71(-3.02)	(1.88-2.22-2.81(-3.17)	(1.43-1.64-2.04(-2.29)	(2.08-2.44-3.06(-3.42)	(1.44-1.61-2.34(-3.29)	(1.48-2.44-3.41(-3.78)	(3.01-) 3.42-4.09 (-4.42)
95 % IC	2.36-2.52	2.44-2.56	2.41-2.62	1.77-1.91	2.64-2.86	1.85-2.11	2.75-3.10	3.66-3.84
n	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>Características de Clamidosporas</b>								
Largo $\mu\text{m}$	(7.85-10.47-15.11(-18.68)	(6.69-7.27-9.08(-14.46)	(9.81-10.85-14.76(-17.1)	(3.99-3.85-8.74(-11.88)	(1.00-8.58-10.36(-11.57)	(4.41-5.35-7.10(-9.14)	(6.30-7.20-10.73(-13.01)	(5.39-) 6.76-9.10 (-11.09)
95 % IC	12.24-13.34	7.92-8.42	12.11-13.50	5.42-7.17	9.15-9.79	5.91-6.54	8.33-9.60	7.60-8.25
n	30	30	30	30	30	30	30	30
Ancho $\mu\text{m}$	(7.31-10.09-14.49(-17.95)	(5.90-6.44-8.26(-9.98)	(8.42-9.93-13.35(-15.32)	(3.99-3.55-8.26(-11.57)	(7.19-7.81-9.56(-10.32)	(4.62-5.21-6.76(-7.48)	(5.97-7.06-10.73(-13.66)	(4.96-) 5.89-7.82 (-8.88)
95 % IC	11.77-12.81	7.10-7.60	11.03-12.25	5.06-6.75	8.37-9.00	3.84-8.13	5.24-9.55	6.58-7.12
n	30	30	30	30	30	30	30	30
L/A $\mu\text{m}$	(0.77-0.91-1.18(-1.40)	(0.98-1.0-1.22(-1.40)	(1.00-1.01-1.18(-1.33)	(1.00-1.00-1.13(-1.29)	(7.93-1.03-1.14(-1.23)	(0.88-0.93-1.15(-1.28)	(0.84-0.93-1.08(-1.18)	(0.90-)0.98-1.35(-1.97)
95 % IC	1.01-1.08	1.08-1.14	1.07-1.13	1.04-1.09	1.07-1.11	1.00-1.08	0.98-1.03	1.11-1.22
n	30	30	30	30	30	30	30	30

## Continuación de la Tabla 5

Cepas de <i>Trichoderma</i>					
	VSL 110	VSL 116	VSL 117	VSL 118	VSL 127
<b>Origen</b>					
	Suelo cultivado con caña de azúcar en el tramo Tux-Cerro Tepezcuintle	Suelo cultivado con caña de azúcar en Camelia Roja	Suelo cultivado con caña de azúcar en Camelia Roja	Suelo cultivado con caña de azúcar en Camelia Roja	Suelo cultivado con caña de azúcar en Camelia Roja
<b>Especies Identificadas</b>					
	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
<b>Características de Conidias</b>					
Largo $\mu\text{m}$	(2.42-) 2.54-2.88 (-3.08)	(2.37-)2.89-3.34(-3.44)	(2.73-)2.84-3.31(-3.57)	(1.91-)1.96-2.18(-2.30)	(3.03-)3.10-3.66(-4.11)
95 % IC	2.67-2.76	3.03-3.19	2.99-3.16	2.03-2.11	3.28-3.48
n	30	30	30	30	30
Ancho $\mu\text{m}$	(2.04-) 2.21-2.48 (-2.73)	(2.48-)2.62-2.92(-3.14)	(2.47-)2.56-2.84(-3.10)	(1.77-)1.82-2.00(-2.10)	(2.66-)2.74-3.14(-3.40)
95 % IC	2.31-2.39	2.72-2.82	2.65-2.75	1.88-1.94	2.86-3.01
n	30	30	30	30	30
L/A $\mu\text{m}$	(1.0-) 1.08-1.22 (-1.32)	(0.90-)1.02-1.22(-1.30)	(1.00-)1.06-1.21(-1.33)	(1.00-)1.03-1.13(-1.22)	(1.01-)1.07-1.23(-1.36)
95 % IC	1.13-1.17	1.09-1.16	1.11-1.16	1.06-1.10	1.12-1.18
n	30	30	30	30	30
<b>Características de Fialides</b>					
Largo $\mu\text{m}$	(3.10-) 4.12-7.76 (-9.78)	(2.88-)5.97-12.47(-19.99)	(6.22-)7.21-11.70(-14.77)	(3.78-)4.38-9.23(-14.24)	(4.57-)5.00-10.76(-18.68)
95 % IC	5.44-6.44	8.05-10.38	8.65-10.26	5.94-7.67	6.85-8.91
n	30	30	30	30	30
Ancho $\mu\text{m}$	(1.41-) 1.60-2.20 (-2.43)	(2.02-)0.78-5.30(14.89)	(2.26-)2.43-2.85(3.08)	(1.31-)1.51-2.10(-2.31)	(3.01-)3.28-3.82(-4.08)
95 % IC	1.81-1.98	2.23-3.85	2.56-2.71	1.70-1.91	3.45-3.65
n	30	30	30	30	30
L/A $\mu\text{m}$	(1.60-) 2.15-4.17 (-6.20)	(0.19-)1.83-5.38(-9.86)	(2.01-)2.57-4.70(-6.00)	(1.67-)2.10-5.88(-9.51)	(1.68-)1.91-2.74(-3.43)
95 % IC	2.88-3.44	2.97-4.24	3.25-4.02	3.31-4.67	2.18-2.48
n	30	30	30	30	30
Base $\mu\text{m}$	(0.83-) 0.90-1.64 (-2.03)	(1.26-)1.40-2.03(-2.37)	(1.23-)1.53-2.14(-2.50)	(0.75-)1.05-1.50(-1.64)	(2.61-)3.03-3.82(-4.11)
95 % IC	1.17-1.37	1.60-1.83	1.72-1.95	0.82-1.74	3.28-3.56
n	30	30	30	30	30
Eje $\mu\text{m}$	(1.29-) 1.46-2.16 (-2.67)	(1.92-)2.20-2.96(-3.51)	(2.25-)2.44-3.10(-3.65)	(1.35-)1.58-2.12(-2.35)	(1.20-)1.31-3.18(-5.99)
95 % IC	1.72-1.91	2.45-2.72	2.65-2.89	1.75-1.95	1.91-2.58
n	30	30	30	30	30
<b>Características de Clamidosporas</b>					
Largo $\mu\text{m}$	(4.80-) 5.97-9.21 (-10.69)	(6.04-)7.23-11.29(-13.34)	(6.48-)7.25-9.54(-10.45)	(4.34-)4.97-6.74(-7.95)	(7.69-)7.24-9.63(-9.81)
95 % IC	7.14-8.04	8.53-9.99	7.99-8.80	5.54-6.17	7.09-9.78
n	30	30	30	30	30
Ancho $\mu\text{m}$	(3.92-) 5.19-8.54 (-10.43)	(5.48-)6.37-10.54(-12.65)	(5.63-)6.92-9.29(-10.14)	(3.97-)4.70-6.69(-7.97)	(6.61-)6.67-9.14(-9.06)
95 % IC	6.40-7.33	7.71-9.20	7.68-8.52	5.34-6.05	6.51-9.30
n	30	30	30	30	30
L/A $\mu\text{m}$	(0.98-) 1.02-1.20 (-1.33)	(1.01-)1.03-1.16(-1.24)	(0.94-)0.96-1.11(-1.28)	(0.88-)0.93-1.13(-1.32)	(0.97-)0.97-1.16(-1.16)
95 % IC	1.09-1.14	1.08-1.12	1.01-1.06	1.00-1.07	0.96-1.18
n	30	30	30	30	30

Los datos son reportados de acuerdo a los seguimientos que se dan en las claves taxonómicas reportadas en la literatura (ver Apéndice B). Se siguen de la siguiente manera: (valor mínimo-) (resultado de la media - desviación estándar)-(resultado de la media + desviación estándar) (-valor máximo) y con intervalo de confianza (IC) del 95%. n es igual al número de unidades medidas y L/A es la razón a longitud/ancho.

Las medias y desviaciones estándar se encuentran en el apéndice C.

## 7. CONCLUSIONES

- Los tres aislados (VSL 185, VSL 186 y VSL 188) del agro-ecosistema banano se identificaron como *T. koningiopsis*, mediante estudios morfológicos.
- De los aislados del agro-ecosistema caña de azúcar: cuatro (VSL 4, VSL 97, VSL105 y VSL 107) se identificaron como *T. asperelliodes* y uno (VSL 106) como *T. gamsii*, siendo el primer reporte de estas dos especies para México.
- Siete aislados (VSL 99, VSL 100, VSL 104, VSL 110, VSL 116, VSL 117 y VSL 118) se identificaron como miembros de la sección *Trichoderma*, y un aislado (VSL 127) como miembro de la sección *Pachybasium*, siendo insuficiente su identificación a nivel especie mediante los estudios morfológicos empleados.
- No se encontraron las especies *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* y *T. viride* en ningún agro-ecosistema estudiado, por lo tanto se rechaza la hipótesis.

## 8. PERSPECTIVAS

1. Realizar la extracción de ADN, amplificación, secuenciación de los genes ITS y TEF así como el análisis filogenético de cada cepa, para confirmar la identificación morfológica.
2. Para aquellas cepas que se consideren nuevas especies, será necesario secuenciar y analizar otros dos genes (Calmodulina y Actina), además determinar sus condiciones de crecimiento en varios medios de cultivo.
3. Realizar estudios para conocer el potencial biotecnológico de cada cepa, tales como agentes de biocontrol, como productor de metabolitos, o en la remediación de ambientes contaminados.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aquino-Martínez J.G., Vázquez-García L.M., Reyes-Reyes B.G. **2007**. Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. dianthi (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:127-137.
- Argumedo-Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Peña-Cabriales J.J. **2009**. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient* 25:257-269.
- Arzate-Vega J., Michel-Aceves C., Domínguez-Márquez V.M., Santos-Eméstica O.A. **2006**. Antagonismo de *Trichoderma spp.* sobre *Mycosphaerella fijiensis* morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*musa sp.*) in vitro e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:98-104.
- Benítez T., Rincon A.M., Limón M.C., Codón A. **2004**. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. Vol. 7:249-260.
- Bissett J. **1984**. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. nov. *Can J Bot*, 62:924-931.
- Bissett J. **1991**. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69:2373–2417.
- Bissett J., Szakacs G., Nolan C. A., Druzhinina I., Gradinger C., Kubicek C.P. **2003**. New species of *Trichoderma* from Asia. *Can. J. Bot.* 81:570-586.
- Chaverri P., Castlebury L.A., Overton B.E., Samuels G. J. **2003**. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophores elongations and green conidia. *Mycologia*, 95:1100-1140.
- Collins R.P., Halim A.F. **1972**. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *J Agric Food Chem* 20:437-438.
- Cuervo-Parra J.A., Ramírez-Suero M., Sánchez-López V., Ramírez-Lepe M. **2012**. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cacao (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology* 10:10657-10663.
- De Marco J.L., Valadares-Inglis M.C., Feliz C.R. **2003**. Production of hydrolytic enzyme by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the

- causal agent of witches' Broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:33-38.
- Del Olmo-Ruiz M., Cifuentes-Blanco J., Vidal-Gaona G., Rosique-Gil E. **2010**. Micromicetos del suelo de una plantación de plátano (*Musa paradisiaca*) en Teapa, Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81:97-102.
- Druzhinina I.S., Kopchinshiy A.G., Kubicek C.P. **2006**. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64.
- Galante Y.M., De Conti A., Monteverdi R. **1998**. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries, In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*, Taylor and Francis, London, 2:327-342.
- Gams W., Bissett J. **1998**. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*, Taylor and Francis, London, 2:3-34.
- Gómez J.L., Ortiz L. E. **2012**. Estudio de la interacción entre *Trichoderma* y plantas de tomate saladette en condiciones de invernadero. Informe técnico de residencia profesional. ITCP.
- Guigón L.C., y González G.P. **2004**. Selección de cepas nativas de *Trichoderma spp.* con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici leoniana* y promotoras de crecimiento en el cultivo del chile (*Capsicum annuum L.*). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22:117-124.
- Guigón L.C., Guerrero P.V., Vargas A.F., Carvajal M.E., Ávila Q.G., Bravo L.L., Ruocco M., Lanzuise S., Woo S., Lorito M. **2010**. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma spp.* su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:87-96.
- Hernández-Mendoza J.L., Sánchez-Pérez M.I., García-Olivares J.G., Mayek-Pérez N., González-Prieto J.M., Quiroz-Velásquez J. **2011**. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma spp* nativos del noreste de México. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 8:176-185.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. **2004**. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43-56.
- Ibarra-Medina V.A., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Lara-Hernández M.E., y Valdez-Carrasco J.M. **2010**. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to

- Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. Revista Mexicana de Micología 31:53-63.
- Jaklitsch W.M., Samuels G.J., Dodd S.L., Lu B.S., Druzhinina I.S. **2006**. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. Studies Mycol. 55:137-177.
- Kulkarni S., Sagar S.D. **2007**. *Trichoderma* – A potential biofungicide of the millennium. Bulletin published by the Dept. of Plant Pathology, U.A.S., Dharwad 1-20.
- Larralde-Corona C.P., Santiago-Mena M.R., Sifuentes-Rincón A.M., Rodríguez-Luna I.C., Rodríguez-Pérez M.A., Shirai K., Narváez-Zapata J.A. **2008**. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. Appl Microbiol Biotechnol 80:167-177.
- Lieckfeldt E., Kullnig C.M., Kubicek C.P., Samuels G.J., Borner T. **2001**. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. Mycol. Res. 105: 313-322.
- Malathi P., Viswanathan R., Padmanoban P., Mohanraj D., Ramesh A. **2002**. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. Plant Pathology section, Corimstore-641007, 4:131-136.
- Mei L., Zong-xio S., Jie Z., Tong X., Gary E.H., Lorito M. **2003**. Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. Journal of Zhejiang University Science 5:133-136.
- Michel-Aceves A.C., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R., Ochoa-Moreno M.E., Mesina-Escamilla J.C., Samuels G.J. **2001**. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de Bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19:154–160.
- Nirenberg H.I. **1976**. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landund Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 169:1–117.
- Oh S.U., Yun B.S., Lee S.J., Kim J.H., Yoo I.D. **2002**. Atroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride*. F80317. The Journal of Antibiotic 55:557-564.

- Paredes-Escalante J.E., Carrillo-Fasio J.A., Garcia-Estrada R.S., Allende-Molar R., Sañudo-Barajas J.A., Valdez-Torres J.B. **2008**. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:27-35.
- Paulitz T.C., Bélanger R.R. **2001**. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39:103–133.
- Persoon C.H. **1794**. Neuer Veersuch einer systematischen Einteilung der Schwamme (Dispositio methodica fungorum). *Romer's News Mag. Bot.* 1:63-128.
- Ploetz R.C. **2000**. Black sigatoka. *Pesticide Outlook* 1. 1:19-23.
- Quiroz-Sarmiento V.F., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Lara-Hernández M.E. **2008**. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología* 26:27-34.
- Reino J.L., Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I.G. **2008**. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry* 7:89-123.
- Rifai M.A. **1969**. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116:1-56. Schuster A. y M. Schmoll (2010). *Biology and biotechnology of Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:787-799.
- Samaniego-Gaxiola J.A., Chew-Madinaveitia Y. **2007**. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78:383-390.
- Samuels G.J. **2006**. *Trichoderma*: systematic, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96:195-206.
- Samuels G.J., Dodd S.L., Gams W., Castlebury L.A., Petrini O. **2002**. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94:146.
- Samuels G.J., Dodd S.L., Lu B.S., Petrini O., Schroers H.J., Druzhinina J. **2006a**. *Trichoderma koningii* aggregate species. *Stud Mycol.* 56:67-133.
- Samuels G.J., Ismaiel A., Bon M.C., Respini S., Petrini O. **2010**. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102:944-66.

- Samuels G.J., Ismaiel A., Mulaw T.B., Szakacs G., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., Jaklitsch M.W. **2012**. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity* 55:77-108.
- Samuels G.J., Pardo-Schultheiss R., Hebbar K.P., Lumsden R.D., Bastos C.N., Costa J.C., Bezerra J.L. **2000**. *Trichoderma stromaticum* sp. Nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.* 104:760-764.
- Samuels G.J., Lieckfeldt E., Nirenberg H.I. **1999**. Description of *T. asperellum* sp. nov. and comparison to *T. viride*. *Sydowia* 51:71–88.
- Samuels G.J., Lu B.S., Cheverri P., Candoussau F., Fournier J., Rossman A.Y. **2009**. *Cynnnectria* a new genus for *Nectria cyanostoma* and its *Fussarium* anamorpho. *Mycological Progress* 8:49-58.
- Samuels G.J., Suarez C., Solis K., Holmes K.A., Thomas S.E., Ismaiel A., Evans C. **2006b**. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South. *El Sevier* 10:381-392.
- Sánchez V., Martínez L., Zavala E.A., Ramírez M. **2012**. Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. *Revista Mexicana de Micología* 36:17-26.
- Sánchez V., Rebolledo O. **2010**. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista Mexicana de Micología* 32:11-18.
- Sánchez V., Rebolledo O., Picaso R.M., Cárdenas E., Córdova J., González O., Samuels G.J. **2007**. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia* 163:49–58.
- Schuster A., Schmoll M. **2010**. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. Invited review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:787-99.
- Seyis I., Aksoz N. **2004**. Production of Lactase by *Trichoderma* sp. *Food Technol. Biotechnol.* 42:121-124.
- Tulasne L.R., Tulasne C. **1865**. *Selecta fungorum carpología*. Jussu, Paris.
- Vicente M.F., Cabello A., Platas G., Basilio A., Diez M.T., Dreikom S., Giacobbe R.A., Onishi J.C., Mainz M., Kurtz M.B., Rosenbach M., Thompson J., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Tsipouras A., Wilson K.E., Pelaez F. **2001**. Antimicrobial

activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. J Appl Microbiol 91:806-813.

Xia X., Lie T.K., Qian X., Zheng Z., Huang Y., Shen Y. **2010**. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. Microb Ecol, Springer Science 10:s00248-010-9770.

Zamir D., Chet I. **1985**. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. Can J Bot 31:578-580.

## APÉNDICE A

### VOCABULARIO

**Ampuliforme:** Cistidio en la parte media y basal ventricoso, y en el ápice con un apéndice de morfología variable.

**Anamorfo:** Forma imperfecta o forma conidial en los hongos inferiores, en los que la reproducción sobrevive por conidias (esporas asexuales).

**Anastomosis:** Unión de dos órganos, o partes de otros, que se juntan dando lugar a uno solo.

**Antibiosis:** Inhibición o muerte de un microorganismo por metabolitos, incluyendo moléculas tóxicas, volátiles y enzimas líticas.

**Árbol filogenético:** Diagrama que representa líneas evolutivas de diferentes especies, organismos o genes desde un antecesor común. Reconstruir/Inferir la historia evolutiva de las especies.

**Células conidiógenas:** Célula implicada en la producción de esporas asexuales en Ascomycetes y Basidiomycetes.

**Clamidospora:** Célula hifal, encerrada por una gruesa pared celular, finalmente se separa de la hifa madre y se comporta como espora de resistencia.

**Conidia :** Esporas especializadas mediante las cuales se reproducen asexualmente la mayoría de los Ascomycetes y Basidiomycetes.

**Conidióforo:** Extremo de las hifas modificadas de donde se separan las células conidiógenas.

**Cosmopolita:** Aclimatado a todos los países o que puede vivir en todos los climas.

**Efuso:** Como derramado o desparramado, sobre todo hacia un lado.

**Endofítico:** Microorganismo que vive en el interior de una planta, sin ser parásito de ella.

**Fascículo:** Pequeño haz.

**Fiálide:** Célula terminal de conidióforos, en forma de botella que se une por su base en la célula. Constituye el soporte de las conidias.

**Fitopatógeno:** Hongos que atacan a las plantas.

**Flocoso:** Órgano que tiene una capa de pelos cortos, suaves y entrelazados, formando copos algodonosos. También es llamado Floconoso y Floculento.

**Hialino:** Transparente, translúcido, incoloro. Esporas que en masa tienen color blanco.

**Hifa:** Célula alargada, a menudo muy alargada, normalmente de 10 micras de espesor y que es el elemento constituyente del cuerpo de los hongos. Las que aparecen generalmente con unos tabiques se denominan hifas septadas, las que carecen de tabiques, se denominan hifas aceptadas.

**Lageniforme:** En forma de frasco o botella, elíptico y con un cuello largo.

**Micelio:** Parte vegetativa (talo) del hongo, formado por una densa serie de filamentos ramificados (hifas) que se entremezclan entre sí, de estructura y composición variables. Puede ser de formas muy diversas; constituye masas filamentosas entrelazadas de modo laxo (plecténquima) o bien forma agregados compactos con aspecto de verdaderos tejidos.

**Micoparasitismo:** Se define como el ataque directo de un microorganismo sobre el talo (hifa) del hongo, seguido por la absorción de sus nutrientes

**Pústula:** Pequeña ampolla epidérmica que se halla en las fructificaciones de ciertos hongos. Al desarrollarse la pústula, se rompe la epidermis y las esporas quedan en contacto directo con el exterior.

**Saprófitos:** Degradan la materia orgánica muerta.

**Septa:** Tabique transversal de una hifa.

**Teleomorfo:** Término para definir la forma perfecta de las setas inferiores.

## APÉNDICE B

### Claves para las secciones de *Trichoderma* (Bissett 1991)

- 1(a) Conidiation effuse, conidia not green; conidiophores with few or no lateral branches; phialides borne in simple terminal verticils, cylindrical to lageniform, “*Cephalosporium*”-like . . . . . **section *Hypocreanum***
- 1(b) Conidiation effuse or fasciculate to pustulate, conidia often green; conidiophores with frequent lateral branches; phialides mostly lageniform to ampulliform . . . . . 2
- 2(a) Conidiophore main axes long with short secondary branches, not extensively rebranching; branches and phialides frequently arising singly, particularly the terminal ones; conidia smooth but sometimes with conspicuous, sinuate, wing-like or bullate ornamentation . . . . . **section *Longibrachiatum***
- 2(b) Conidiophores repeatedly rebranching; branches and phialides paired or verticillate, also those in terminal position; conidia smooth-walled or verrucose . . . . 3
- 3(a) Conidiophores and branches relatively broad (main axis to 10  $\mu\text{m}$  wide); phialides in verticils of 2–7, ampulliform to lageniform; conidia green, brownish or hyaline . . . . . **section *Pachybasium***
- 3(b) Conidiophores and branches narrow and flexuous (main axis to 6  $\mu\text{m}$  wide); phialides mostly in verticils of 2 or 3(–5), lageniform to subulate; conidia always green . . . . . **section *Trichoderma***

### Clave de la sección *Trichoderma*

- 1(a) Colonies slow-growing, reaching less than 6 cm diam. in 7 days at 20°C . . . . . 2
- 1(b) Colonies faster growing . . . . . 3
- 2(a) Colonies yellow-green, floccose; phialides slender, almost *Verticillium*-like but curved; conidia obovoid with truncate base, 3.0–5.0  $\times$  2.0–3.2  $\mu\text{m}$  . . . . . 2. *Trichoderma aureoviride* anam. of *Hypocrea aureoviridis*
- 2(b) Colonies green, granular, tardily sporulating; phialides flask-shaped; conidia ellipsoid, 3.5–5.0  $\times$  2.0–2.6  $\mu\text{m}$  . [*Trichoderma* anam. of *Podostroma alutaceum*]
- 3(a) Conidia cylindrical, 3.0–4.8  $\times$  1.9–2.8  $\mu\text{m}$  . . . . . 4. *T. koningii* aggregate
- 3(b) Conidia subglobose to short-ellipsoidal or ovate . . . . . 4
- 4(a) Conidia ovate with truncate base, 3.5–5.0  $\times$  2.5–3.2  $\mu\text{m}$  . . . . . 5. *Hypocrea vinosa*
- 4(b) Conidia subglobose to short-ellipsoidal . . . . . 5
- 5(a) Fully mature conidia pale green, 2.5–3.5  $\times$  2.1–3.0  $\mu\text{m}$  . . . . . 3. *T. harzianum* aggregate
- 5(b) Fully mature conidia becoming dark green . . . . . 6
- 6(a) Fully mature conidia more or less roughened, 3.6–4.5  $\mu\text{m}$  diam. or 4.0  $\times$  3.5–4.0  $\mu\text{m}$  . . . . . 6. *T. viride* aggregate
- 6(b) Fully mature conidia smooth-walled, usually 2.6–3.8  $\times$  2.2–3.4  $\mu\text{m}$  . . . . . 1. *T. atroviride*

## Clave de la sección *Pachybasium*

(modificado por Bissett, 1991b)

- 1(a) Conidiation entirely effuse, or conidiophores arranged in loosely organized flat pustules or small irregular fascicles; conidiophores sparingly branched with principal branches most often arising singly or paired [if conidia are hyaline, see 9(b)] . . . . . 2
- 1(b) Conidiophores organized in compact, hemispherical to cushion-shaped pustules; conidiophores usually highly branched with branches 2–4-verticillate . . . . . 8
- 2(a) Conidiophores arranged in fascicles up to 2 mm diam. . . . . 3
- 2(b) Conidiophores effuse, or loosely arranged in flat pustules . . . . . 4
- 3(a) Colonies less than 4 cm diam. after 4 days at 20°C; aerial hyphae more than 1.5  $\mu\text{m}$  wide; phialides convergent; chlamydozoospores infrequent; conidia 2.5–4.5  $\times$  2.0–3.1  $\mu\text{m}$  . . . . . 12. *Trichoderma* anam. of *Hypocrea gelatinosa*
- 3(b) Colonies more than 4 cm diam. after 4 days; aerial hyphae mostly less than 1.5  $\mu\text{m}$  wide; phialides divergent; chlamydozoospores abundant in older mycelium; conidia 2.9–4.0  $\times$  2.0–2.9  $\mu\text{m}$  . . . . . 9. *T. fasciculatum*
- 4(a) Conidia subglobose to obovoid, smaller than 3.5  $\times$  2.5  $\mu\text{m}$ , rather pale green . . . . . 5
- 4(b) Conidia broadly ellipsoidal, larger than 3.5  $\times$  2.5  $\mu\text{m}$ , of other colour . . . . . 6
- 5(a) Conidiation usually diffuse; phialides flask-shaped, 5.5–7.5 (in terminal position) 10  $\times$  2.5–3.2  $\mu\text{m}$ , in divergent clusters of 3–5; conidia subglobose to shortobovoid, 2.5–3.5  $\times$  2.1–3.0  $\mu\text{m}$  . . . . . see 3. *T. harzianum* aggregate
- 5(b) Conidiation more or less pustular but lacking sterile appendages; phialides broadly flask-shaped, 4–5(–7)  $\times$  2.3–3.0  $\mu\text{m}$ ; conidia subglobose, 2.3–3.0  $\times$  2.0–2.6  $\mu\text{m}$  . . . . . 14. *T. inhamatum*
- 6(a) Conidia pale brown, 3.0–5.3  $\times$  2.4–4.3  $\mu\text{m}$  . . . . . 11. *T. flavofuscum*
- 6(b) Conidia dark green . . . . . 7
- 7(a) Conidiophores aggregated into flat pustules on MA, usually with sterile apical elongations; phialides divergent; conidia 3.7–5.3  $\times$  2.6–3.7  $\mu\text{m}$  . . . . . 7. *T. crassum*
- 7(b) Conidiation entirely effuse, or conidiophores lacking sterile apical elongations; phialides convergent in penicillate manner; conidia 3.5–6.0  $\times$  2.8–4.1  $\mu\text{m}$ . . . . . 26. *T. virens*
- 8(a) (1) Conidiation white to buff . . . . . 9
- 8(b) Conidiation eventually green to grey . . . . . 10
- 9(a) Conidiophores with spiral, sterile apical elongations; phialides divergent; conidia ellipsoidal, 2.3–3.6  $\times$  1.4–2.2  $\mu\text{m}$  . . . . . 19. *T. polysporum*
- 9(b) Conidiophores lacking sterile elongations; phialides more or less convergent; conidia subglobose, 2.5–3.5  $\mu\text{m}$  diam. . . . . 18. *T. piluliferum*
- 10(a) Conidiophores with conspicuously roughened, spiral, sterile apical elongations; conidiation bright greenish-yellow or rosy-buff; conidia 2.8–4.0  $\times$  1.8–2.5  $\mu\text{m}$  . . . . . 8. *T. croceum*
- 10(b) Conidiophores lacking sterile elongations or elongations not roughened; conidiation in various green or grey shades . . . . . 11
- 11(a) Conidiophores arranged in pustules up to 2 mm diam., glaucous to greyish; and conidiophore main axis 4.5–7  $\mu\text{m}$  wide over the fertile part; conidia 3.0–4.6  $\times$  1.8–2.7  $\mu\text{m}$  . . . . . 21. *Trichoderma* anam. of *Hypocrea semiorbis*
- 11(b) Conidiophore pustules larger, usually in definite green shades; or conidiophores main axis not exceeding 5.5  $\mu\text{m}$  wide over the fertile part . . . . . 12
- 12(a) Conidia consistently less than 3.5  $\mu\text{m}$  long and 2.5  $\mu\text{m}$  wide . . . . . 13

12(b) Conidia mostly longer and/or wider . . . . .	15
13(a) Conidia subglobose to broadly obovoid . . . . .	see 5
13(b) Conidia ellipsoidal, $2.5\text{--}3.4 \times 1.8\text{--}2.3 \mu\text{m}$ . . . . .	14
14(a) Conidiogenous areas bright green to yellow-green, conidiophore main axis branched and fertile to apex . . . . .	16. <i>T. minutisporum</i>
14(b) Conidiogenous areas grey-green, conidiophore main axis with conspicuous spiral sterile apical elongations . . . . .	25. <i>T. tomentosum</i>
15(a) Colony reverse conspicuously in pigmented yellow to reddish-brown shades; conidiophore main axis very stout, $4\text{--}6.5 \mu\text{m}$ wide at base of sterile elongation . . . . .	16
15(b) Colony reverse colourless to pale dull yellowish; conidiophore main axis usually $3.5\text{--}5 \mu\text{m}$ wide at base of sterile elongation . . . . .	17
16(a) Conidiophore main axis relatively straight throughout, the upper part unbranched and nonfertile to near the apex, which is terminated by a single phialide or more often by 2–3 short fertile branches; conidia $3.0\text{--}4.5 \times 1.9\text{--}2.5 \mu\text{m}$ . . . . .	10. <i>T. fertile</i>
16(b) Conidiophore main axis with a spiral, sterile apical elongation, never with fertile branches near the apex; conidia $3.0\text{--}4.4 \times 1.8\text{--}2.7 \mu\text{m}$ . . . . .	22. <i>T. spirale</i>
17(a) Conidia strictly cylindrical, frequently longer than $4.5 \mu\text{m}$ , never shorter than $3.5 \mu\text{m}$ . . . . .	18
17(b) Conidia cylindrical to ellipsoid, rarely longer than $4.5 \mu\text{m}$ , often shorter than $3.5 \mu\text{m}$ . . . . .	19
18(a) Conidiophore main axis with undulate to spiral sterile elongation which is highly branched and anastomosing to within $100 \mu\text{m}$ of the acute apex; conidia $3.9\text{--}5.7 \times 2.0\text{--}3.0 \mu\text{m}$ . . . . .	15. <i>T. longipile</i>
18(b) Conidiophore main axis with a straight to flexuous sterile elongation which is sparingly branched with a bluntly rounded apex; conidia $3.5\text{--}5.0 \times 1.7\text{--}2.8 \mu\text{m}$ . . . . .	17. <i>T. oblongisporum</i> [if conidia broadly ellipsoidal, $3.7\text{--}5.3 \times 2.6\text{--}3.7 \mu\text{m}$ , see also 7(a)]
19(a) Conidiophore main axis with straight to flexuous sterile elongation . . . . .	20
19(b) Conidiophore main axis with undulate to coiled or circinate, sterile elongation. . . . .	21
20(a) Conidiogenous pustules bluish green, appearing spiny due to the presence of stiff, javelin-like sterile conidiophore apices; conidia $3.0\text{--}4.8 \times 1.8\text{--}2.5 \mu\text{m}$ . . . . .	24. <i>T. strigosum</i>
20(b) Conidiogenous pustules dull-green, appearing hairy due to presence of very long, straight or flexuous sterile conidiophore apices; conidia $2.8\text{--}4.0 \times 2.2\text{--}3.0 \mu\text{m}$ . . . . .	23. <i>T. strictipile</i>
21(a) Conidiogenous pustules bluish-green . . . . .	22
21(b) Conidiogenous pustules bright-green, surface appearing downy due to the presence of branched, undulate, thin, sterile conidiophore apices; conidia $3.1\text{--}4.7 \times 2.0\text{--}2.9 \mu\text{m}$ . . . . .	20. <i>T. pubescens</i>
22(a) Conidiogenous pustules appearing velvety due to presence of strongly undulate or hamate, sterile conidiophore apices; conidia $3.0\text{--}4.5 \times 2.1\text{--}2.8 \mu\text{m}$ . . . . .	13. <i>T. hamatum</i>
22(b) Conidiogenous pustules appearing woolly due to presence of coarse, spiral conidiophore apices; conidia $3.0\text{--}4.4 \times 1.8\text{--}2.7 \mu\text{m}$ . . . . .	22. <i>T. spirale</i>

**KEY TO SPECIES OF THE *TRICHODERMA KONINGII* AGGREGATE SPECIES BASED ON THE PHENOTYPE**

1. 95 % CI L/W of conidia 1.1–1.3.....	2
1. 95 % CI L/W of conidia > 1.3.....	3
2. 95 % CI L/W of conidia 1.2–1.3; known only from ascospore-derived cultures.....	6. <i>T. intricatum</i>
2. 95 % CI L/W of conidia 1.1–1.2; known only as an endophyte of <i>Theobroma</i> species and woody tissue infected with <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	9. <i>T. ovalisporum</i>
3. 95 % CI L/W of conidia 1.6–1.7; colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness 50–60 mm; primarily Europe and North America.....	7. <i>T. koningii</i>
3. 95 % CI L/W of conidia L/W ≤ 1.5.....	4
4. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness ≤ 50 mm.....	5
4. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness > 50 mm.....	11
5. Europe and North and Central America, Caribbean Region, Thailand; sporulating well on PDA; known from teleomorph and isolated directly from substratum.....	6
5. Australia and New Zealand; often sporulating poorly on PDA; known only from teleomorph.....	9
6. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness 33–40 mm; North and Central America, Caribbean Region, West Africa, Europe .....	7
6. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness > 40 mm; North America, Europe, Taiwan.....	8
7. North and Central America and Europe; conidia lacking yellow colour at any time, cultures on PDA with several conspicuous concentric rings.....	10. <i>T. petersenii</i>
7. Central and South America, Caribbean region, Africa (Ghana), United Kingdom; on stromata of pyrenomycetes, found as an endophyte in woody tissue; PDA cultures often with a diffusing yellow pigment and conidia yellow-green at least at first.....	12. <i>T. stilbohypoxyli</i>
8. Taiwan; distal part-ascospores 3–4 × (2.5–)3.0–3.5(–4.0) µm; proximal part-ascospores (3.0–)3.5–4.5(–5.2) × 2.5–3.0(–3.2) µm.....	13. <i>T. taiwanense</i>
8. Eastern North America and Europe; distal part-ascospores (3.0–)3.5–4.5(–5.2) × (2.5–)3.2–4.0(–5.0) µm; proximal part-ascospores (3.2–)4.2–5.2(–5.9) × (2.5–)2.7–3.0(–3.2) µm .....	11. <i>T. rogersonii</i>
9. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness ca. 40 mm; 95 % CI of conidia 4.0–4.1 × 2.8–3.0 µm, L/W = 1.2–1.3 .....	5. <i>T. dorotheae</i>
9. L/W of conidia 1.3–1.4; slower growing .....	10
10. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness 33–35 mm, 95 % CI of conidia 3.7–3.9 × 2.5–2.6 µm; cosmopolitan.....	1. <i>T. austrokingii</i>
10. Colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness 25–30 mm; 95 % CI of conidia 4.1–4.3 × 3.1–3.2 µm; New Zealand.....	4. <i>T. dingleyae</i>
11. Colony radius on PDA and SNA after 72 h at 30 °C in darkness < 10 mm; known only as an endophyte of cacao .....	3. <i>T. caribbaeum</i> var. <i>aequatoriale</i>
11. Colony radius on PDA after 72 h at 30 °C ≥ 30 mm.....	12
12. Colony radius on PDA after 72 h at 25 and 30 °C in darkness 50–60 mm; known only from ascospore isolations made in Puerto Rico and Guadeloupe .....	2. <i>T. caribbaeum</i> var. <i>caribbaeum</i>
12. Faster growing, colony radius on PDA after 72 h at 25 °C in darkness 55–70 mm; known primarily from direct isolations from substrata, rarely from ascospore isolations .....	8. <i>T. koningiopsis</i>

## APÉNDICE C

Datos de la Media y Desviación Estándar

AISLAMIENTOS DEL CULTIVO DE BANANO			
	VSL 185	VSL 186	VSL 188
Conidias			
	Media – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.
Largo $\mu\text{m}$	3.94 – 0.43	5.82 – 0.34	3.65 – 0.22
Ancho $\mu\text{m}$	2.44 – 0.18	4.08 – 0.28	2.61 – 0.13
Largo/Ancho $\mu\text{m}$	1.62 – 0.20	1.43 – 0.09	1.40 – 0.10
Fiálides			
	Medias – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.
Largo $\mu\text{m}$	11.92 – 4.64	8.26 – 2.52	8.89 – 2.57
Ancho $\mu\text{m}$	3.80 – 0.59	2.38 – 0.40	2.41 – 0.29
Largo/Ancho $\mu\text{m}$	3.39 – 1.96	3.64 – 1.57	3.85 – 1.62
Base $\mu\text{m}$	2.43 – 0.40	1.70 – 0.26	1.74 – 0.26
Eje $\mu\text{m}$	3.22 – 0.36	2.26 – 0.30	2.19 – 0.22
Clamidosporas			
	Medias – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.
Largo $\mu\text{m}$	8.26 – 1.35	10.85 – 1.79	8.48 – 1.35
Ancho $\mu\text{m}$	7.29 – 1.21	9.66 – 1.62	7.41 – 1.27
Largo/Ancho $\mu\text{m}$	1.14 – 0.14	1.12 – 0.08	1.15 – 0.12

AISLAMIENTOS DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR				
	VSL 4	VSL 97	VSL 105	VSL 107
Conidias				
	Media – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.
Largo $\mu\text{m}$	3.26 – 0.18	3.35 – 0.21	2.84 – 0.18	3.35 – 0.22
Ancho $\mu\text{m}$	2.92 – 0.11	3.02 – 0.18	2.42 – 0.13	3.00 – 0.13
L/A $\mu\text{m}$	1.11 – 0.06	1.11 – 0.09	1.17 – 0.07	1.11 – 0.08
Fiálides				
	Medias – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.
Largo $\mu\text{m}$	8.45 – 1.81	8.28 – 1.49	7.54 – 2.83	13.38 – 1.97
Ancho $\mu\text{m}$	2.59 – 0.39	2.58 – 0.29	2.27 – 0.47	3.82 – 0.31
L/A $\mu\text{m}$	3.37 – 1.09	3.28 – 0.85	3.49 – 1.60	3.54 – 0.68
Base $\mu\text{m}$	1.70 – 0.21	1.82 – 0.26	1.57 – 0.45	2.67 – 0.46
Eje $\mu\text{m}$	2.44 – 0.35	2.50 – 0.21	1.98 – 0.36	3.75 – 0.33
Clamidosporas				
	Medias – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.	Media – D.E.
Largo $\mu\text{m}$	12.79 – 2.32	8.17 – 0.90	6.22 – 0.87	7.93 – 1.16
Ancho $\mu\text{m}$	12.29 – 2.19	7.35 – 0.90	5.98 – 0.77	6.85 – 0.96
L/A $\mu\text{m}$	1.04 – 0.13	1.11 – 0.10	1.04 – 0.10	1.16 – 0.18

AISLAMIENTOS DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR					
	VSL 99	VSL 100	VSL 110	VSL 104	VSL 117
Conidias					
Largo $\mu\text{m}$	Media – D.E. 2.78 – 0.21	Media – D.E. 3.30 – 0.16	Media – D.E. 2.71 – 0.16	Media – D.E. 3.14 – 0.21	Media – D.E. 3.08 – 0.23
Ancho $\mu\text{m}$	2.60 – 0.16	2.88 – 0.11	2.35 – 0.13	2.83 – 0.15	2.70 – 0.13
L/A $\mu\text{m}$	1.07 – 0.04	1.14 – 0.06	1.15 – 0.07	1.11 – 0.08	1.13 – 0.07
Fiálides					
Largo $\mu\text{m}$	Medias – D.E. 9.54 – 2.53	Media – D.E. 6.94 – 2.12	Media – D.E. 5.94 – 1.81	Media – D.E. 9.60 – 2.76	Media – D.E. 9.45 – 2.24
Ancho $\mu\text{m}$	2.65 – 0.32	2.01 – 0.17	1.90 – 0.30	2.88 – 0.30	2.64 – 0.20
L/A $\mu\text{m}$	3.71 – 1.34	3.49 – 1.16	3.16 – 1.01	3.41 – 1.24	3.63 – 1.06
Base $\mu\text{m}$	1.84 – 0.33	1.46 – 0.27	1.27 – 0.36	2.00 – 0.36	1.84 – 0.30
Eje $\mu\text{m}$	2.52 – 0.29	1.84 – 0.20	1.81 – 0.34	2.75 – 0.30	2.77 – 0.33
Clamidosporas					
Largo $\mu\text{m}$	Medias – D.E. 12.80 – 1.95	Media – D.E. 6.30 – 2.44	Media – D.E. 7.59 – 1.62	Media – D.E. 9.47 – 0.89	Media – D.E. 8.39 – 1.14
Ancho $\mu\text{m}$	11.64 – 1.71	5.90 – 2.35	6.87 – 1.67	8.68 – 0.87	8.10 – 1.18
L/A $\mu\text{m}$	1.10 – 0.08	1.07 – 0.06	1.11 – 0.08	1.09 – 0.05	1.04 – 0.07

AISLAMIENTOS DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR				
	VSL 106	VSL 116	VSL 118	VSL 127
Conidias				
Largo $\mu\text{m}$	Media – D.E. 4.62 – 0.52	Media – D.E. 3.11 – 0.22	Media – D.E. 2.07 – 0.11	Media – D.E. 3.38 – 0.28
Ancho $\mu\text{m}$	3.02 – 0.42	2.77 – 0.14	1.91 – 0.08	2.94 – 0.20
L/A $\mu\text{m}$	1.55 – 0.23	1.12 – 0.09	1.08 – 0.05	1.15 – 0.08
Fiálides				
Largo $\mu\text{m}$	Medias – D.E. 8.79 – 1.66	Media – D.E. 9.22 – 3.25	Media – D.E. 6.81 – 2.42	Media – D.E. 7.88 – 2.88
Ancho $\mu\text{m}$	3.00 – 0.35	3.04 – 2.26	1.80 – 0.29	3.55 – 0.27
L/A $\mu\text{m}$	2.97 – 0.68	3.60 – 1.77	3.99 – 1.88	2.24 – 0.93
Base $\mu\text{m}$	1.87 – 0.36	1.72 – 0.31	1.28 – 0.22	2.33 – 0.41
Eje $\mu\text{m}$	2.92 – 0.48	2.58 – 0.37	1.85 – 0.27	3.42 – 0.39
Clamidosporas				
Largo $\mu\text{m}$	Medias – D.E. 8.96 – 1.76	Media – D.E. 9.26 – 2.03	Media – D.E. 5.85 – 0.88	Media – D.E. 8.43 – 1.19
Ancho $\mu\text{m}$	8.89 – 1.83	8.45 – 2.08	5.69 – 0.99	7.90 – 1.23
L/A $\mu\text{m}$	1.01 – 0.07	1.10 – 0.06	1.03 – 0.09	1.07 – 0.09



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC**

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 29 de Octubre del 2013 a las 16:00 hr. se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Identificación morfológica de aislamientos del genero *Trichoderma* presentes en suelos cultivados con banano y caña de azúcar** presentado por la alumna Nancy Cruz Velasco, con número de matrícula 07090009, aspirante al grado de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 30 de Octubre del 2013.

**ATENTAMENTE,  
LA COMISIÓN REVISORA**

Director de Tesis

Dr. Vladimir Sánchez López  
Profesor-Investigador UNPA

Presidente

Dr. Oscar Muñoz Gama  
Profesor-Investigador UNPA

Vocal

Dra. Blanca Estela Barraza Figueroa  
Profesor-Investigador UNPA

Codirector de Tesis

Dr. Mario Ramírez Dene  
Profesor-Investigador UNDA

Secretario

Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño  
Profesor-Investigador UNPA