



**UNIVERSIDAD MICHOACANANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos
proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp.
sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum*
resistentes a fungicidas químicos”**

TESIS

que presenta

I.B.Q. Enrique Soto Suárez

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director: D.C. Homero Reyes de la Cruz

Codirector: D.C Mauricio Nahuam Chávez Avilés

Morelia, Michoacán, Noviembre de 2023

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
1.1 Berries	3
1.2 Generalidades de las berries	3
1.2.1 Arándano (<i>Vaccinium</i> spp.).....	3
1.2.2 Zarzamora (<i>Rubus ulmifolius</i>).....	3
1.3 Importancia económica de las berries en México	4
1.4 Enfermedades que afectan a las berries.....	4
1.5 Control químico de las enfermedades.....	6
1.6 Resistencia a los fungicidas químicos.....	7
1.7 Control biológico	9
2. Antecedentes.....	10
3. Justificación	15
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos	15
5.1 General.....	15
5.2 Específicos.....	15
6. Metodología	16
6.1 Cepas y condiciones de cultivo	16
6.2 Preparación de los medios de cultivo	16
6.2.1 Medio agar papa dextrosa (PDA).....	16
6.2.2 Caldo papa dextrosa (PD).....	16
6.3 Propagación de las cepas en medio PDA.....	16
6.4 Obtención y cuantificación de esporas de <i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.....	16
6.5 Desactivación del micelio de <i>F. oxysporum</i> F6 y Zar	17
6.6 Inducción de la producción de compuestos proteicos con actividad antifúngica	17
6.6.1 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry	17
6.6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	17
6.6.3 Preparación de soluciones	18
6.7 Construcción del fenograma	19

6.8	Análisis de la actividad antifúngica de las fracciones proteicas	19
6.9	Efecto de la concentración de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> spp. (TRVA1 y TRVA2)	19
6.10	Pruebas de los extractos crudos sobre la germinación de las esporas de <i>F. oxysporum</i>	20
6.11.	Análisis de la patogenicidad de las cepas de <i>F. oxysporum</i> expuestas a los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre hojas de arándano y zarzamora ex vivo	20
6.11.1	Desinfección de hojas de arándano y zarzamora	20
6.11.2	Clareo de tejidos	20
6.12	Análisis microscópico del tejido vegetal infectado	21
7.	Resultados	22
7.1	Producción de proteínas extracelulares de <i>Trichoderma</i> sp.	22
7.1.1	Producción de proteínas extracelulares de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) en presencia del micelio desactivado de <i>F. oxysporum</i> (F6 o Zar)	22
7.1.2	Producción de proteínas extracelulares de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1) en presencia del micelio desactivado de <i>F. oxysporum</i> (F6 o Zar)	23
7.1.3	Producción de proteínas extracelulares de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2) en presencia del micelio desactivado de <i>F. oxysporum</i> (F6 o Zar)	24
7.1.4	Análisis de los perfiles de proteínas extracelulares de <i>Trichoderma</i> sp.	25
7.2	Selección de proteínas extracelulares con potencial antifúngico de <i>Trichoderma</i> sp. sobre el crecimiento y desarrollo de <i>F. oxysporum</i>	30
7.2.1	Antibiograma de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040)	30
7.2.2	Antibiograma de los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2)	32
7.2.3	Efecto de la concentración de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento y desarrollo de <i>F. oxysporum</i> (F6)	36
7.2.4	Efecto de la concentración de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento y desarrollo de <i>F. oxysporum</i> (Zar)	39
7.2.5	Efecto de los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2) sobre la germinación de conidios de <i>F. oxysporum</i> (F6 y Zar)	42
7.3.	Evaluación de la capacidad de infección de <i>F. oxysporum</i> (F6 y Zar) tratado con los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2) sobre hojas de arándano y zarzamora ex vivo	45
8.	Discusión	49
9.	Conclusión	55

10. Perspectivas	55
11. Anexos	56
11.1 Curva de calibración de albumina de suero bovino	56
11.2 Antibiograma	56
12. Referencias	58

Índice de Figuras

Figura 1. Berries.....	3
Figura 2. Producción de berries por entidad en el periodo 2020.....	4
Figura 3. Enfermedades que afectan a las berries	5
Figura 4. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	10
Figura 5. Monitoreo de la producción de PE producidas por <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) en presencia de micelio desactivado de <i>F. oxysporum</i> (F6-Zar)	22
Figura 6. Monitoreo de la producción de PE producidas por <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1) en presencia de micelio desactivado de <i>F. oxysporum</i> (F6-Zar).....	24
Figura 7. Monitoreo de la producción de proteínas extracelulares producidas por cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2) en presencia de micelio desactivado de <i>F. oxysporum</i> (F6-Zar)	25
Figura 8. Fenograma de correlación de los perfiles proteicos obtenidos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> spp. (TRVA1 y TRVA2) en condiciones basales	26
Figura 9. Fenograma de correlación de los perfiles proteicos obtenidos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> spp. (TRVA1 y TRVA2) obtenidos con el inductor <i>F. oxysporum</i> (F6)	27
Figura 10. Fenograma de correlación de los perfiles proteicos obtenidos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> spp. (TRVA1 y TRVA2) en condiciones con el inductor <i>F. oxysporum</i> (Zar)	29
Figura 11. Antibiograma de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) ..	31
Figura 12. Efecto de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> (F6 y Zar)	32
Figura 13. Antibiograma de los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2)	33
Figura 14. Antibiograma de los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2)	34
Figura 15. Efecto de los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> (F6 y Zar).....	35
Figura 16. Efecto de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> (F6) ..	37
Figura 17. Efecto de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> (F6).....	38

Figura 18. Efecto de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> (F6) ..	40
Figura 19. Efecto de los extractos crudos de <i>T. atroviride</i> (TIMI206040) y <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> (Zar) ...	41
Figura 20. Germinación de microconidios de <i>F. oxysporum</i> (F6) tratados con extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2).....	43
Figura 21. Germinación de microconidios de <i>F. oxysporum</i> (Zar) tratados con extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2).....	44
Figura 22. Evaluación de la capacidad de infección de los microconidios de <i>F. oxysporum</i> (F6 o Zar) tratados con los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2) sobre hojas de arándano o zarzamora <i>ex vivo</i>	46
Figura 23. Evaluación microscópica de la capacidad de infección de los microconidios de <i>F. oxysporum</i> (F6 y Zar) tratados con los extractos crudos de <i>Trichoderma</i> sp. (TRVA2) sobre hojas de arándano y zarzamora <i>ex vivo</i>	48
Figura 24. Cinética de germinación de microconidios de <i>F. oxysporum</i> (F6 y Zar)	55

índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los fungicidas químicos	7
Tabla 2. Porcentaje de crecimiento de las cepas de <i>F. oxysporum</i> en presencia de agroquímicos	11
Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las cepas de <i>F. oxysporum</i> resistentes a los agroquímicos generados por las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas de Los Azufres, Michoacán.....	13
Tabla 4. Componentes de los geles de poliacrilamida	18

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS, DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ.

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, No. DE BECARIO 772077, CVU 1084980

Agradecimiento

Al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIBQ)** por darme la oportunidad de formarme profesionalmente

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (**CONAHCYT**) por otorgarme la beca para la realización de este trabajo de investigación.

Al **Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM)** del **Tecnológico Nacional de México Campus Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo (ITSCH)** por abrirme las puertas para realizar el trabajo experimental y darme la confianza suficiente para formarme profesionalmente.

Al **D.C Homero Reyes de la Cruz** por aceptarme como alumno de maestría, darme la oportunidad de formarme como un investigador y el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Al **D.C Mauricio Nahum Chavéz Avilés** por su apoyo incondicional dentro y fuera de la institución, observaciones y sugerencias a este proyecto, por abrirme una ventana de oportunidades para ser mejor investigador, sobre todo agradezco la amistad y la calidez humana con la que me ha tratado a lo largo de estos años.

A mis sinodales **D.C Josué Altamirano Hernández, D.C Jesús Salvador López Bucio** y **D.C Jesús Campos García** por sus aportaciones para mejorar este trabajo de investigación.

A mis **compañeros de laboratorio** que me han apoyado durante este largo viaje lleno de buenos y malos momentos, que me han demostrado el apoyo incondicional, muchas gracias.

Dedicatoria

A **Dios** por darme salud, fuerza y fe para cumplir este sueño que se veía muy lejano.

A mis padres **Ma. Ofelia Suárez Arcos** y **Sergio Soto García** por el apoyo que me han brindado durante este proceso.

En especial quiero dedicar este trabajo a la familia que me ha apoyado durante toda esta travesía: **Mauricio Nahum Chavéz Avilés, Paula Itzel Bautista Ortega e Irving Hernández Hernández**, por abrirme las puertas de su corazón, hogar, el apoyo incondicional que me han dado, sin su apoyo este trabajo no se hubiera realizado, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí durante estos tres años. Estoy eternamente agradecido con ustedes. Los Quiero Mucho.

A **Carla Teresa Mejía Martínez** por ser mi apoyo durante este tiempo, gracias a ti las nubes de tormenta se volvieron días soleados y pude ver que siempre hay esperanza inclusive cuando todo está perdido. Te Quiero Mucho.

Resumen

La marchitez o secadera de los cultivos es una enfermedad causada por *Fusarium spp.*, la cual provoca pérdidas de hasta el 100% de los mismos; para el control de dicha enfermedad se usan agroquímicos como azoxystrobin con tebuconazol y tiabendazol. Sin embargo, el uso excesivo de éstos induce el desarrollo de organismos multirresistente, lo cual vuelve ineficaz el control de los fitopatógenos. Una alternativa para el manejo de estos organismos consiste en explorar las fuentes de biomoléculas producidas por los agentes de control biológico. En este sentido, se evaluó la producción de proteínas extracelulares (PE) de tres cepas de *Trichoderma* spp. (TIMI206040, TRVA1 y TRVA2), así como los obtenidos en respuesta a los inductores (micelio desactivado térmicamente de *Fusarium oxysporum* F6 y Zar). Se determinó que la adición de los inductores moduló la producción diferencial de PE de las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas. Con base en su perfil proteico diferencial se seleccionaron 18 extractos para analizar su potencial antifúngico. Los fenotipos microscópicos ocasionados por los extractos TRVA2-5d y TF2-8d fueron adelgazamiento, vacuolización, hinchamiento y lisis de hifas de ambas cepas de *F. oxysporum*. Sin embargo, éstos promovieron la pigmentación de *F. oxysporum* F6 a $450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que en la cepa de *F. oxysporum* Zar inhibieron su pigmentación. Este análisis mostró que los extractos crudos son específicos para cada cepa de *F. oxysporum*. Con base en los resultados anteriormente descritos, se analizó el efecto de los extractos TRVA2-5d y TF2-8d sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum*, los cuales fueron evaluados a $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se observó que ambos extractos alteraron la arquitectura del tubo germinativo. Estas alteraciones sugieren que su capacidad infectiva se comprometió, razón por la cual se analizó la infectividad de las esporas de las cepas de *F. oxysporum* F6 y Zar, tratados con los extractos crudos sobre hojas de arándano y zarzamora, respectivamente. Se observó que las esporas de *F. oxysporum* F6 tratadas con los extractos, así como con azoxystrobin con tebuconazol indujeron el crecimiento dimórfico de la cepa, lo cual modula su capacidad patogénica, mientras que las esporas de *F. oxysporum* Zar desarrollaron micelio denso; en ambas cepas los porcentajes de infección de la superficie de las hojas fueron entre el 10% y 30%.

Los resultados de este estudio revelan que las PE producidas por *Trichoderma* TRVA1 y TRVA2 en respuesta al micelio desactivado térmicamente de *F. oxysporum* F6 y Zar, afectan la germinación de las esporas, el desarrollo y estructura de las hifas, así como la producción de pigmentos y la capacidad infectiva de estas cepas multirresistentes a fungicidas químicos, de la misma manera que lo hacen los fungicidas químicos convencionales y esto podría ser una alternativa para el control de *F. oxysporum*.

Palabras clave: Marchitez, resistencia química, control biológico, proteínas antifúngicas.

Abstract

Crop wilt is a disease caused by *Fusarium* spp. which causes losses of up to 100% of crops; agrochemicals such as azoxystrobin with tebuconazole and thiabendazole are used to control this disease. However, the excessive use of these agrochemicals induces the development of multiresistant organisms, which makes the control of phytopathogens ineffective. An alternative for the management of these organisms is to explore the sources of biomolecules produced by biological control agents. In this sense, the production of extracellular proteins (EP) from three *Trichoderma* spp. strains (TIMI206040, TRVA1 and TRVA2) was evaluated, as well as those obtained in response to inducers (thermally inactivated mycelium of *Fusarium oxysporum* F6 and Zar). It was determined that the addition of the inducers modulated the differential PE production of the *Trichoderma* spp. strains tested. Based on their differential protein profile, 18 extracts were selected to analyze their antifungal potential. The microscopic phenotypes caused by TRVA2-5d and TF2-8d extracts were thinning, vacuolization, swelling, and hyphal lysis of both *F. oxysporum* strains. However, these promoted pigmentation of *F. oxysporum* F6 at 450 µg-mL⁻¹, whereas in *F. oxysporum* Zar strain they inhibited its pigmentation. This analysis showed that the crude extracts are specific for each *F. oxysporum* strain. Based on the results described above, the effect of TRVA2-5d and TF2-8d extracts on *F. oxysporum* spore germination was analyzed, which were evaluated at 150 µg-mL⁻¹. It was observed that both extracts altered the germ tube architecture. These alterations suggest that their infective capacity was compromised, which is why the infectivity of the spores of *F. oxysporum* F6 and Zar strains treated with the crude extracts on blueberry and blackberry leaves, respectively, was analyzed. It was observed that *F. oxysporum* F6 spores treated with the extracts as well as with azoxystrobin + tebuconazole induced dimorphic growth of the strain, which modulates its pathogenic capacity, while *F. oxysporum* Zar spores developed dense mycelium; in both strains the infection percentages of the leaf surface were between 10% and 30%.

The results of this study reveal that the EPs produced by *Trichoderma* TRVA1 and TRVA2 in response to thermally deactivated mycelium of *F. oxysporum* F6 and Zar affect spore germination, hyphal development and structure, as well as pigment production and infective capacity of these multi-resistant strains to chemical fungicides, in the same way that conventional chemical fungicides do, and this could be an alternative for the control of *F. oxysporum*.

Key words: wilt, chemical resistance, biological control, antifungal proteins.

1. Introducción

1.1 Berries

Los frutos denominados berries (término en inglés), también llamados frutas finas, frutillas o frutos del bosque, son un conjunto de pequeños frutos que se caracterizan por sus colores brillantes de tonalidades rojizas, azules o moradas. Entre los frutos que componen a este grupo se incluye el arándano (*Vaccinium* spp.) y la zarzamora (*Rubus ulmifolius*) (FIRA, 2016).

1.2 Generalidades de las berries

1.2.1 Arándano (*Vaccinium* spp.)

El arándano es un tipo de arbusto caducifolio de 20 hasta 60 cm de altura que se cultiva fundamentalmente por el fruto. Pertenece a la familia de las *ericáceas*; esta baya de forma esférica mide de 1 a 2 cm de diámetro, de color azul intenso a suave, tiene una epidermis cerosa que le confiere mayor durabilidad en postcosecha a diferencia de otras berries (Fig. 1A) (SIAP, 2021), el arándano contiene ácido hipúrico, el cual aporta propiedades antibióticas, desinflamatorias y antioxidantes (InfoAgro, 2022).

1.2.2 Zarzamora (*Rubus ulmifolius*)

La zarzamora es una planta arbustiva que pertenece a la familia de las rosáceas con tallos de 3 a 4 metros de largo. Crecen erectos al principio; sin embargo, con el peso de los frutos éstos terminan sobre el suelo. Son angulosos y espinosos. Las flores son rosadas o blancas con cinco pétalos (SIAP, 2021). Los frutos son carnosos y están formados por numerosos frutillos esféricos apiñados cada uno con un huesillo rojizo el cual cuando madura completamente se torna negro (Fig. 1B). Su sabor es dulce y aromático (SAGARPA, 2017).

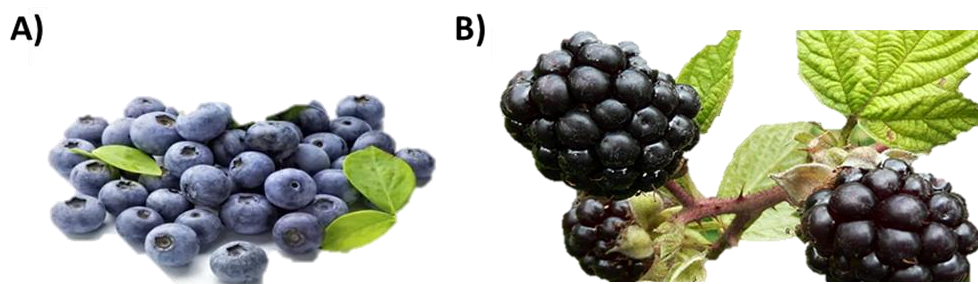


Figura 1. Berries. Imágenes representativas de **A)** Arándanos (destacan beneficios de los arándanos, 2018) y **B)** Zarzamora (Zarzamora, s/f). Elaboración propia.

Las berries han cobrado gran relevancia en el mercado debido a sus propiedades antivirales, antibacteriales, anticancerígenos y antiinflamatorios (Berrys, 2011); además, han incursionado a nivel de mercado agroalimentario, ya que se ha aprovechado la ventana de oportunidad que representan los consumidores de ingresos medios y altos, que están dispuestos a pagar un precio relativamente alto

por productos acordes a los nuevos estilos de vida: familias pequeñas y con poco tiempo para la preparación de alimentos (Fuentes Rojas, 2001).

1.3 Importancia económica de las berries en México

Entre 2004 y 2013, la producción mundial de berries presentó un crecimiento promedio anual del 3.3%. En 2013 dicha producción se situó en 11.2 millones de toneladas, lo que representó un aumento del 5.3% anual con respecto al año anterior; los principales productores de berries en el mundo fueron: China (27.3%), Estados Unidos (19%), Rusia (6.8%), Polonia (5.4%) y México (4.9%). En conjunto estos países participaron con el 63.5% de la producción mundial (Panorama Agroalimentario | Berries, 2016, s/f).

En México el destino comercial principal de la exportación de berries se sitúa en Estados Unidos, la cifra de exportación se traduce en \$2,725,187,291 dólares, de la cual el 14.75% y 13.75% pertenecen a la zarzamora y arándano, respectivamente (SIAP, 2021).

En el año 2021 la producción de zarzamora fue de 209,028 t entre las principales entidades productoras de este fruto fueron: Michoacán (196,627 t), Jalisco (11,238 t), Colima (1,496 t) y Baja California (873 t); mientras que la producción de arándano la lideran los estados de Jalisco (31,912 t), Michoacán (15,490 t) y Sinaloa (9,130 t), con una producción total de arándano de 66,482 t (Fig. 2) (FIRA, 2022).

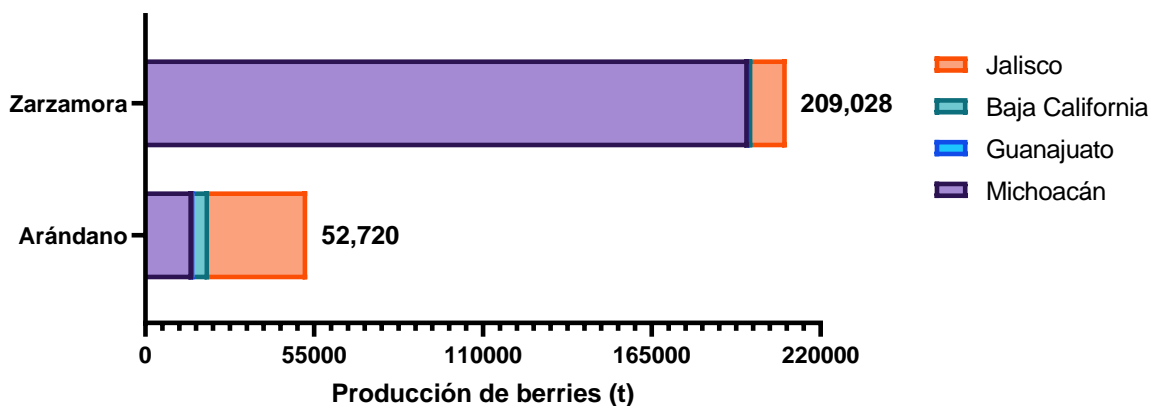


Figura 2. Producción de berries por entidad en el periodo 2020. Datos obtenidos de SIAP, 2022.

En el periodo comprendido del 2020 al 2021, la producción de arándano y la zarzamora han disminuido en un 2.6% y 2.1% del volumen total de producción, respectivamente, debido a pérdidas en el rendimiento de los cultivos, así como a una menor zona de siembra (FIRA, 2022).

1.4 Enfermedades que afectan a las berries

El cultivo de berries supone en la actualidad una enorme importancia en México, tanto a nivel social como económico, el cual ha mantenido un crecimiento constante

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

en la producción de dichos frutos con el paso de los años (InfoAgro, 2022). Sin embargo, la producción de zarzamora es afectada por la presencia de distintas especies fúngicas, las cuales causan mermas en el rendimiento y pérdidas económicas de hasta un 25% equivalente a \$2,540 millones de pesos anuales (Contreras-Pérez *et al.*, 2019). Las enfermedades comunes que afectan al cultivo de zarzamora que se han reportado son: el moho gris provocado por *Botrytis cinerea* (Fig. 3A), la antracnosis cuyo agente causal es *Colletotrichum gloeosporioides* (Fig. 3B) y la pudrición de la raíz provocado por *Fusarium* sp. (Fig. 3C) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). La pudrición de los cultivares de arándano es provocada por diferentes fitopatógenos como: *Alternaria* sp. (Fig. 3D), *B. cinerea* (Fig. 3E) y *Fusarium* sp. (Fig. 3F) lo cual genera deterioro y pérdidas durante la poscosecha, de hasta el 65% del total de los frutos (Figuroa *et al.*, 2010). La marchitez o secadera se considera la enfermedad más destructiva, debido a su incidencia, distribución y difícil control, ya que origina la muerte gradual de la planta (Bárcenas-Santana *et al.*, 2019).

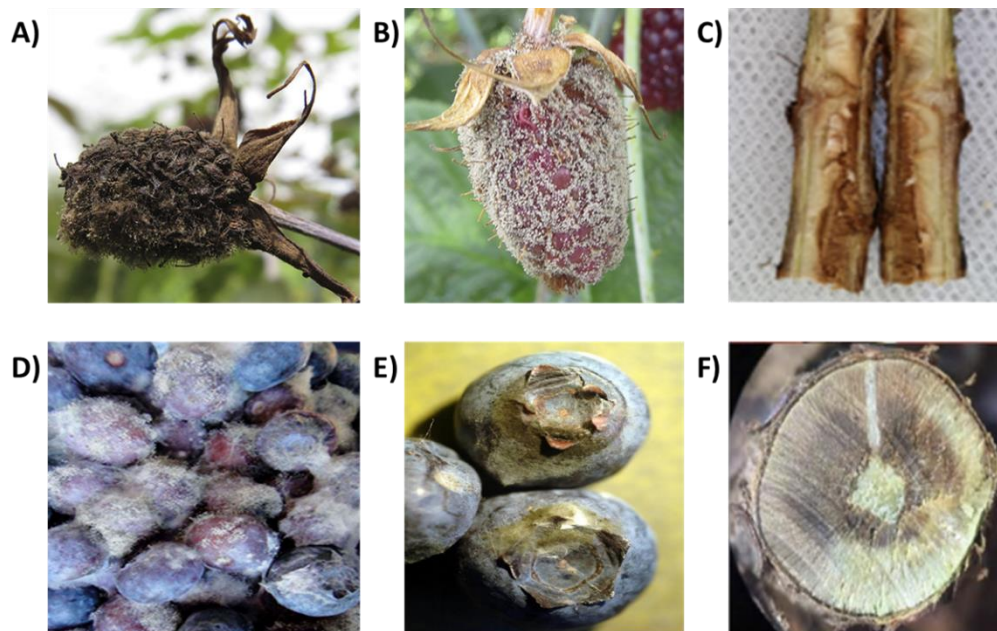


Figura 3. Enfermedades que afectan a las berries. Fotografías representativas de enfermedades las enfermedades que afectan a la zarzamora (A-C) y arándano (D-F): **A)** moho gris provocado por *B. cinerea* (Botrytis en mora, 2020); **D)** moho blanco provocado por *A. alternata* (Así puedes salvar tus cultivos de arándanos de la Alternaria, 2018); **B-E)** antracnosis provocada por *C. gloeosporioides* (Antracnosis en mora, 2020) y **C-F)** marchitez o secadera provocado por *F. oxysporum* (Integrado, n.d.) y **B)** Moho gris provocado por *Botrytis* spp. en frambuesa. Elaboración propia.

El patógeno oportunista que tiene relevancia a nivel mundial es *F. oxysporum* el cual ocupa el quinto lugar entre los 10 principales agentes fúngicos de las plantas transmitidos por el suelo, el cual es el agente causal de la enfermedad conocida como la marchitez o secadera de la raíz en más de 100 especies de plantas, esto

se ha convertido en una amenaza para los agricultores de todo el mundo, lo cual reduce la producción de los cultivos de importancia económica (Husaini *et al.*, 2018). La secadera de la raíz en el cultivo de fresa es provocada por *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fof), el cual ha sido identificado en varios países como: Japón, Corea del Sur, Australia y Estados Unidos de Norteamérica (California) (Pincot *et al.*, 2021). La infección en la planta inicia en las puntas de la raíz, seguido por el crecimiento longitudinal dentro del xilema inmaduro, esta sintomatología incluye a la marchitez vascular y la pudrición de la raíz (Yuan *et al.*, 2020).

Las condiciones ambientales pueden favorecer la propagación de los agentes etiológicos de las enfermedades mencionadas anteriormente con lo cual se incrementa la severidad con que afecta un fitopatógeno. García *et al.*, (2021) analizaron 174 unidades de producción (UP) de fresa distribuidas en el estado de Guanajuato, de las cuales 154 UP (88%) fueron casos positivos de la fusariosis, ya que se aislaron cepas de *F. oxysporum* del tejido infectado de la raíz. Dada la incidencia de esta enfermedad, este hongo presenta la mayor aptitud parasítica debido a la alta frecuencia de aparición y a la formación de estructuras de resistencia que permanecen en el suelo durante mucho tiempo (InfoAgro, 2022), lo cual representa un potencial problema para la producción agroalimentaria.

1.5 Control químico de las enfermedades

Debido a la evolución acelerada de los fitopatógenos (lo cual dificulta el control de las enfermedades), se deben de implementar estrategias de control basados en tres principios básicos: (1) identificar la fuente de la infección primaria, (2) identificar el mecanismo de dispersión de la enfermedad en el cultivo, así como el papel del ambiente en el desarrollo de la enfermedad y (3) aplicar un protocolo preventivo desde la preparación del terreno y la fase del pre-transplante (InfoAgro, 2021).

El control químico es usado como un tratamiento para las enfermedades en los cultivos, los fungicidas son sustancias químicas que han sido empleadas en décadas recientes desde que se estimó que las infecciones fúngicas reducen los rendimientos de los cultivos a nivel mundial en alrededor del 20%. Los fungicidas se han convertido en la primera línea de defensa para el control de enfermedades fúngicas debido a su bajo costo, su uso facilitado y eficacia. Además, hay tres razones principales para usar fungicidas: el control de la infección durante el establecimiento y crecimiento del cultivo, la mejora de la productividad y la disminución de los defectos de las plantas. Como resultado de la infección las plantas sufren daño en los tejidos fotosintéticos, lo cual afecta su desarrollo, esto a su vez afecta la calidad de los productos y su vida de anaquel (Baibakova *et al.*, 2019).

Los agroquímicos mostrados en la Tabla 3 se utilizan para el control de diferentes fitopatógenos tales como *C. gloeosporioides*, *B. cinerea*, *Phytophthora* spp. y *Fusarium* spp. Los principales compuestos activos que se utilizan para el control de *Fusarium* spp. son tiabendazol y tiofanato metílico en el cultivo de las berries,

seguido del captan y, por último, azoxystrobin; sin embargo, el uso de los demás agroquímicos en los diferentes cultivos puede provocar la resistencia de las cepas fúngicas debido a que no se tiene una estrategia óptima para el control de *Fusarium* spp. (Aneberries, 2021).

1.6 Resistencia a los fungicidas químicos

Los organismos poseen la habilidad para adaptarse a los cambios de las condiciones ambientales, este fenómeno se aplica también al uso constante de fungicidas. Se define como “resistencia a fungicidas” a la adaptación estable y heredable (en este caso de un hongo a un fungicida), que resulta en una sensibilidad menor de la normal de ese fungicida. Este término se utiliza generalmente para las cepas de una especie sensible que han cambiado, generalmente por mutación para hacer significativamente menos sensible al compuesto activo (CA) (Dekker *et al.*, 2018).

Los hongos tienen varios mecanismos que los hacen resistentes a los fungicidas, los cuales son: un acceso reducido a los sitios de acción (disminución en la acumulación del CA, detoxificación por descomposición metabólica o adsorción) o acceso normal al sitio de acción (cambio de sitio de acción, lo cual resulta en una menor afinidad al CA, cambios a otras vías metabólicas o pasar por alto el sitio de acción) y mediante el aumento de la producción de enzimas inhibitorias para compensar los efectos de inhibición de los fungicidas (Dekker *et al.*, 2018).

Los fungicidas azoxystrobin, captan, tebuconazol y tiabendazol que se utilizan para el control de *Fusarium* son inhibidores de un solo sitio de acción, los cuales interrumpen procesos celulares particulares y se unen a dianas proteicas específicas; la insensibilidad a los fungicidas de un solo sitio puede ocurrir como resultado de un cambio en una proteína de un solo objetivo (Tabla. 1). Después de la aplicación de los fungicidas, la mayoría de los individuos son eliminados o inhibidos al completar su ciclo reproductivo, lo que resulta en una selección de los individuos resistentes, algunos fitopatógenos tienen tasas de reproducción cortas y rápidas, lo cual produce individuos que obtienen mutaciones raras que alteran la sensibilidad a los fungicidas (Lucas *et al.*, 2015).

La eficacia del control de *Fusarium* spp. depende significativamente del correcto tiempo de aplicación y las condiciones ambientales. Sin embargo, el excesivo uso de los fungicidas favorece el desarrollo de cepas resistentes (Liu *et al.*, 2011). La resistencia natural a los fungicidas en cepas silvestres de *Fusarium* spp. ha sido documentada en China, Europa y Estados Unidos. Recientemente se reportó un aislado de *Fusarium graminearum* que es menos sensible a tebuconazol, el cual además es más agresivo (Sun *et al.*, 2014).

Tabla 1. Clasificación de los fungicidas químicos. Elaboración propia tomado de FRAC, España, 2019.

Agroquímicos	MdA	PdA	Grupo
Azoxystrobin	Respiración	Complejo III: Citocromo bc1 sitio Q ₀	Inhibidor externo de Quinona
Tebuconazol	Biosíntesis de Esterol	C14-demetilasas en la biosíntesis de esterol	Inhibidores de la desmetilación
Tiabendazol	Proteínas motoras y citoesqueleto	Ensamblaje de la β -tubulina en mitosis	Fungicida metil benzimidazol
Tiofanato metílico			
Captan	Químico multisitio		Inorgánico

Notas: MdA= Modo o mecanismo de acción y PdA= punto de acción

Se ha descrito que el gen *CYP51* que codifica para la 14 α -desmetilasa se asocia con la reducción a la sensibilidad de los fungicidas de tipo azoles, los cuales intervienen en la síntesis de ergosterol. Al igual, algunos genes requeridos para la patogenicidad como los transportadores ABC (desintoxicación de moléculas de respuesta vegetal) son sobreexpresados durante los tratamientos de azoles y se ha propuesto como un factor que contribuye a dicha resistencia (Rojas *et al.*, 2018).

Malandrakis *et al.*, (2018), analizaron el potencial del hongo no patógeno *Fusarium solani* como un agente de biocontrol en combinación con nueve fungicidas selectos (tiofanato metílico, difenoconazol, procloraz, fenhezamida, piraclostrobin, fluidioxonil, ciprodinil, boscalid y mancozeb), en el cultivo de jitomate. La concentración efectiva 50 (EC₅₀, la cual es la concentración que reduce el 50% del crecimiento micelial del hongo) se estimó en el rango de los 0.035 a >100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, estos resultados demostraron que *F. solani* es altamente insensible al tiofanato metílico, fenhexamida, ciprodinil, boscalid y mancozeb por arriba de la concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Adicionalmente, se evaluó el efecto de *F. solani* en la raíz de la planta de jitomate, con la adición de los cinco agroquímicos (tiofanato metílico, fenhexamida, ciprodinil, boscalid y mancozeb) a las dosis recomendadas por los proveedores, 10 días después de la inoculación se aisló *F. solani* de las plantas con y sin tratamientos, esto sugiere que una vez que se establece la relación hongo-raíz, la raíz protege al hongo de los efectos del CA de los agroquímicos.

Las estrategias para reducir el desarrollo de poblaciones de patógenos resistentes incluyen la limitación de la cantidad aplicada del fungicida, la reducción del número de dosis aplicadas, así como mezclar o alternar tratamientos con fungicidas que tengan otros mecanismos de acción (Lucas *et al.*, 2015). Por tal motivo, se han buscado alternativas que no involucren el empleo de compuestos químicos, como el uso de metabolitos producidos por organismos (Keller, 2019).

1.7 Control biológico

El interés en el uso del control biológico ha incrementado en años pasados. Esta técnica puede reemplazar o complementar las medidas actuales en los planes de gestión integrada de enfermedades. Este enfoque también es atractivo, ya que tiene el potencial de ser utilizado durante el desarrollo de las plantas, cuando el uso de fungicidas es ineficaz (Rojas *et al.*, 2018).

Los agentes de control biológico (ACB) interactúan con la planta y los patógenos, con la finalidad de suprimir el crecimiento del patógeno mediante mecanismos directos e indirectos que intervienen en el funcionamiento del antagonista, dichos mecanismos incluyen el hiperparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, la inducción de la resistencia del huésped, la producción de antibióticos, enzimas líticas, productos de desecho no regulados (cianuro de hidrógeno, amoníaco y dióxido de carbono) e interferencia física/química que conduce al biocontrol de los patógenos parasitarios de las plantas (Ghazanfar *et al.*, 2018). El agente de biocontrol más utilizado es *Trichoderma* spp. (Fig. 4) el cual fue aislado por primera vez en 1794 del suelo y de materia en descomposición. En todo el mundo, actualmente más del 60% de los biofungicidas eficaces se obtiene de *Trichoderma* spp. pero en comparación con el control biológico, los agricultores dependen en mayor medida de los fungicidas químicos (Sood *et al.*, 2020).

Los principales mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* son: (1) el micoparasitismo el cual consiste en el reconocimiento e invasión hacia especies fúngicas patógenas por medio de la producción de líticas a través de la ruptura de su pared celular y la absorción de nutrientes, (2) la inducción de la resistencia de la planta hacia las enfermedades por la alteración de la arquitectura de la raíz durante la interacción con los patógenos y (3) el ataque a los huevecillos, larvas y algunos nematodos adultos. Estos mecanismos directos e indirectos pueden responder efectivamente durante el biocontrol, lo cual depende de la cepa de *Trichoderma* utilizada, el patógeno a tratar, el crecimiento del cultivo y las condiciones climatológicas además del pH, la temperatura, la salinidad y la disponibilidad de los nutrientes (Zin & Badaluddin, 2020).

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

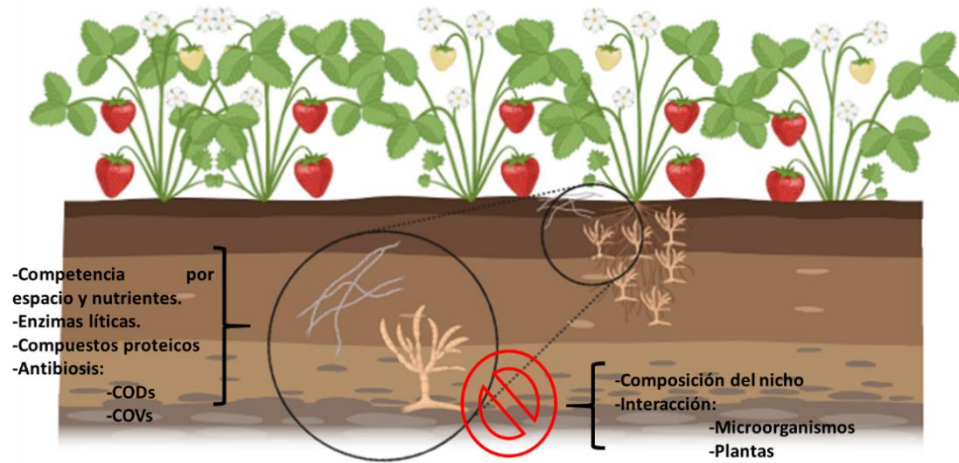


Figura 4. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. Elaborado a partir de Carmona-Hernández *et al.*, 2019.

2. Antecedentes

La marchitez de la raíz o secadera provocada por *F. oxysporum* puede ocasionar pérdidas importantes en los rendimientos de diversos cultivos, razón por la cual se han desarrollado fungicidas efectivos para el control de la enfermedad. Sin embargo, el éxito del tratamiento depende no solo del fungicida utilizado sino de realizar el control en el momento adecuado. El manejo de la enfermedad está limitado por las condiciones de precipitaciones al momento de la aplicación, los costos y la preocupación por la presencia de residuos en el producto final (Olivet *et al.*, 2013).

Además de lo anteriormente descrito, el uso repetitivo de estos compuestos da como resultado el desarrollo de poblaciones resistentes a los fungicidas (Asmekash *et al.*, 2022), razón por la cual el control de los hongos fitopatógenos se ha vuelto una tarea complicada. En este sentido, Coronel (2022) evaluó la toxicidad de captan, mancozeb, clorotalonil y benomilo sobre el crecimiento de *F. solani* aislado de un cultivo de fresa. De acuerdo con la escala establecida por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB), la toxicidad de un producto se clasifica según el porcentaje de inhibición generado (<30% inofensivo, 30-75% ligeramente tóxico, 75-90% moderadamente tóxico y >90% tóxico). En este sentido, Captan resultó ligeramente tóxico en un rango de 450-1,350 ppm; mancozeb no inhibió el crecimiento de *F. solani* a 600 ppm, pero al triplicar la concentración, éste resultó sólo ligeramente tóxico; el clorotalonil fue inofensivo a 450 ppm, pero éste se volvió moderadamente tóxico al aumentar la concentración a 1,350 ppm. Por último, el benomilo limitó completamente el crecimiento de *F. solani* en el rango de concentración de 250 a 750 ppm; estos resultados demuestran la capacidad de resistencia y adaptación de *F. solani*.

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

Del mismo modo, Herrera-Arteaga *et al.*, (2020) evaluaron cepas de *F. oxysporum* aisladas de berries las cuales resultaron resistentes a diferentes agroquímicos a 1,000 y 1,500 ppm (Tabla 2), de las cuales las cepas denominadas Zarcamora CIDIIR y Zarcamora Grutas fueron capaces de crecer en todas las condiciones analizadas con porcentajes de crecimiento que van del 15% hasta el 100%, esto demuestra la capacidad de resistencia de *Fusarium* y la creciente problemática sobre el uso de agroquímicos.

Tabla 2. Porcentaje de crecimiento de las cepas de *F. oxysporum* en presencia de agroquímicos (Herrera-Arteaga, *et al.*, 2020)

Agroquímico (p.p.m.)		Crecimiento de las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> aisladas de berries (%)						
		Arándano F6 CIDIIR	Arándano F7 CIDIIR	Frambuesa follaje	Frambuesa a raíz	Fresa	Zarcamora CIDIIR	Zarcamora Grutas
Azoxyestrobil con tebuconazol	1,000	57.5±3.9	19.9±1.9	28.9±2.3	30.5±2	0±0	66.7±4.5	19.7±1.2
	1,500	20.6±3.7	0±0	20±1.2	30±1	0±0	50.6±15.5	15±1.9
Azufre elemental con oxiclóruo de cobre	1,000	90±2.8	31.9±2.1	76.7±3	100±0	22.2±3.2	66.7±21.3	93.1±2.3
	1,500	68.2±4.2	68.6±1.1	71.9±2.7	100±0	0±0	73.6±1.1	79.4±3.5
Tiabendazol	1,000	0±0	0±0	0±0	0±0	66.7±3.2	52.4±19.4	26.9±2.3
	1,500	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	21±2.8	28.1±1
Captan	1,000	84.6±4.3	100±0	78.7±2.7	100±0	100±0	100±0	100±0
	1,500	85.1±10.6	95.3±2.5	96.3±2.5	100±0	89.7±2.5	97.2±2.3	100±0
Tiofanato metílico	1,000	68.9±6.1	95.8±2.1	89.9±2	27.6±6.9	86.7±1.9	92.5±7	100±0
	1,500	88.5±1.9	95.8±2.1	57.2±2.7	0±0	78.9±2.7	83.6±1.7	100±0

Debido al fenómeno de resistencia inducida por fungicidas en hongos fitopatógenos, se buscan nuevas alternativas para lograr el uso sostenible de los fungicidas, dentro de estas acciones se incluye reducir su nivel de aplicación y la cantidad de compuesto activo, así como encontrar sustancias de bajo riesgo para utilizar en su lugar (Coninck *et al.*, 2020). En este sentido, los ACB y/o los productos derivados de su metabolismo son una alternativa apropiada y amigable con el ambiente para sustituir el uso de los fungicidas.

La interacción típica entre *Trichoderma* y *Fusarium* incluye: atracción, fijación, enrollamiento y lisis por enzimas hidrolíticas o metabolitos secundarios (Sharma, 2020). En recientes estudios, en la interacción entre *Fusarium* y *Trichoderma* está involucrado el parasitismo directo sobre *Fusarium* vía producción de enzimas extracelulares y compuestos orgánicos volátiles por parte de *Trichoderma harzianum* TE5; las hidrolasas tienen la característica de ser inducidas y sobreproducidas en presencia de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Zhang *et al.*, 2014).

Las especies de *Trichoderma* producen metabolitos volátiles (MVs) y no-volátiles (MNVs) con actividad antibiótica (Dennis & Webster, 1971a, b), estas moléculas no son esenciales para el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma*, en algunos casos son importantes para la supervivencia del organismo, para la eliminación de competidores microbianos, por consiguiente, aumentan la disponibilidad de nutrientes. La plétora de metabolitos producidos consiste en una mezcla de compuestos resultado del metabolismo primario o secundario; entre los compuestos

del metabolismo primario se encuentran los polisacáridos, ácidos grasos y ácidos nucleicos. Los metabolitos secundarios (MS) son producidos durante la fase estacionaria y en menor cantidad que los primarios, los MS engloban una clase diversificada de sustancias de bajo peso molecular que son producidos bajo ciertos estímulos como la interacción con otros organismos, proceso durante el cual se pueden producir moléculas con actividad antibiótica, dentro de éstas encontramos las gliotoxinas, policétidos, peptaiboles, terpenoides/esteroides, pironas y daucanos (Zeilinger *et al.*, 2016).

En este sentido, Asmekash *et al.*, (2022) analizaron el efecto antagonista de los MNVs producidos por cepas de *Trichoderma* designadas como AUT131, AUT136, AUT14 y AUT7, sobre *Fusarium* AAUFcot04 aislado de una planta de algodón enferma; los cuales dieron como resultado que las cepas de *Trichoderma* AUT136 y AUT131 generaron los mejores porcentajes de inhibición con 52.89% y 49.58%, respectivamente, mientras que AUT14 sólo generó un 38.84% de inhibición sobre *Fusarium* AAUFcot04, lo cual demuestra que los ACB son una fuente de compuestos (de naturaleza diversa) con actividad antifúngica variable, los cuales podrían emplearse para lograr el control de las enfermedades de manera sustentable.

Adicionalmente, Dubey *et al.*, (2007) evaluaron la capacidad de biocontrol de ocho cepas de *Trichoderma viride* y dos cepas de *T. harzianum* aisladas de la rizosfera de plantas sanas de garbanzo de Nueva Delhi, India, contra cuatro aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC). Los MNVs producidos por las cepas de *T. harzianum* (T₇) y *T. viride* (T₁) causaron el mayor porcentaje de inhibición (50%) sobre FOC (F₄), mientras que el aislado más resistente fue F₂ con un rango de inhibición entre 8% y 25%. Todas las cepas de *Trichoderma* probadas en este estudio tienen la capacidad de biocontrolar a FOC en diferentes niveles. Sin embargo, las diferencias entre los porcentajes de inhibición podrían deberse a la producción diferencial de los MNVs de cada cepa analizada.

En este sentido, Marques *et al.*, (2018) analizaron el efecto de los MNVs de ocho cepas de *Trichoderma* aisladas de diferentes cultivos como maíz, tomate, col rizada y cassava, para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *V. dahliae* y *Cylindrocladium* sp.; el extracto crudo de las cepas de *Trichoderma* se adicionó al medio agar papa dextrosa (PDA) en una proporción del 25% (v/v). Los resultados mostraron que los MNVs producidos por las cepas de *Trichoderma brevicompactum* CEN1245 y CEN1274 (aisladas del tomate y col rizada, respectivamente) fueron capaces de inhibir a todos los fitopatógenos probados en el estudio con un rango del 5.7% al 10.2%. Los porcentajes de inhibición generados sobre *F. oxysporum* fueron del 8.2% y 7.7%, respectivamente. Esto indica que *T. brevicompactum* produce MNVs con actividad inhibitoria cuya eficiencia podría depender del metabolismo activo asociado al nicho de donde fue aislado el organismo, así como del organismo blanco.

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

Es por ello por lo que, Herrera-Arteaga, *et al.*, (2020) aislaron cepas de *Trichoderma* spp. de Los Azufres, Michoacán; y evaluaron su resistencia a varios compuestos agroquímicos. Dichas cepas crecieron diferencialmente en presencia de los agroquímicos azoxystrobin con tebuconazol, captan, azufre elemental o tiofanato metílico a 1,000 y 1,500 ppm. Las cepas de *Trichoderma* TPA1, TPA2, TPA3, TSAA1 y TSAA2 fueron capaces de crecer en todas las condiciones probadas con porcentajes de crecimiento que van del 18-100% (datos no mostrados). Razón por la cual se evaluó el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp., resistentes a agroquímicos sobre el crecimiento de las cepas de *F. oxysporum*. En los ensayos de confrontación se observó que las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*; el confrontamiento entre *Trichoderma* TSAA1 vs. *F. oxysporum* aislado del follaje de la frambuesa fue el que generó mayor porcentaje de inhibición del crecimiento (71.02%), mientras que el enfrentamiento que presentó menor efecto inhibitorio fue *Trichoderma* TPA3 vs. *F. oxysporum* F6 aislada de arándano (47.07%) (Tabla 3). Estos resultados sugieren que estas cepas podrían producir potenciales compuestos para el tratamiento de cepas de *F. oxysporum* resistentes a compuestos agroquímicos.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las cepas de *F. oxysporum* resistentes a los agroquímicos generados por las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de Los Azufres, Michoacán (Herrera-Arteaga *et al.*, 2020)

Cepa aislada de Los Azufres, Michoacán	Inhibición de las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> aisladas de berries (%)						
	Arándano F6 CIDIIR	Arándano F7 CIDIIR	Frambuesa follaje	Frambuesa raíz	Fresa	Zarzamora CIDIIR	Zarzamora Grutas
<i>Trichoderma</i> TRVA1	69.1±2.2	62.5±2.5	58.9±3.3	67.1±1.8	64.8±4.5	65.2±3.3	53.3±2.3
<i>Trichoderma</i> TRVA2	51.9±1.9	54±0.9	54±1.6	70.4±0.8	54.3±1.9	50.9±1	50.3±4.2
<i>Trichoderma</i> TPA1	54±3.4	58.6±2.8	51.3±2.6	65.3±0.8	50.8±2.1	52.1±0.5	50.4±0.7
<i>Trichoderma</i> TPA2	64.1±2.8	55.1±1.3	54.9±2.9	67.7±2.9	57±3.6	56±1.7	52±1.5
<i>Trichoderma</i> TPA3	63.5±0.9	52.4±1.7	56.2±2.7	61.8±2.1	57.9±2.2	56.4±2	47.1±2.9
<i>Trichoderma</i> TSAA1	52.2±1.4	71±2.3	54.7±3.3	64.4±1.4	58.7±1.1	54.2±1.7	62.8±2.2
<i>Trichoderma</i> TSAA2	66.2±1.6	52±1.1	55±1.96	60.2±1.4	49.7±3.5	51±0.8	56±3.9

La combinación de cepas de *Trichoderma* resistentes a los fungicidas junto con éstos, puede ser usada como parte de las estrategias del manejo integral de las enfermedades. La aplicación sinérgica de difenoconazol-propiconazol y *T. harzianum* SH2303 controló el 60% de la enfermedad del tizón de la hoja del maíz causada por *Cochliobolus heterostrophus* en condiciones de campo, por lo que se obtuvieron resultados de control similares a los generados por los tratamientos con los fungicidas químicos (Wang *et al.*, 2019). Sin embargo, la efectividad de los ACB depende de varios factores entre los que se encuentran los factores ambientales, la edad del hospedero, la morfología de la planta, la química de la superficie y el estado metabólico de la planta. Como lo demostró Savita & Sharma, (2019) quien determinó que *T. harzianum* T39 tiene mayor capacidad de control contra el moho gris en *Cucumis sativus* (pepino) bajo condiciones de temperatura superiores a 20

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

°C en comparación con las condiciones de humedad y temperaturas por debajo de 20 °C.

Los hongos son fuentes abundantes de MSs, la liberación de estos compuestos se desencadena a menudo por los estímulos químicos o ambientales; además de coordinar el desarrollo y morfogénesis del organismo productor. Sin embargo, en algunos casos la producción puede ser estimulada o reprimida en asociación con otros organismos (Bills & Gloer, 2016). En este sentido, Emanuel *et al.*, (2020) evaluaron la producción de metabolitos antimicrobianos (MAs) de un cultivo dual de *Trichoderma* sp. (T1, T2 y T3) con *Bacillus subtilis* (Bs) en presencia de un inductor (micelio desactivado de *C. gloeosporioides*). Los compuestos producidos en los tres sistemas fueron: butanoato de etilo, acetato de butilo (con mayor abundancia en los tres sistemas), ácido acético, 2-butoxietanol, 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldehído, 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzil alcohol, ácido hexadecanoico y ácido octadecanoico. El sistema T1-Bs mostró mayor producción de los compuestos: acetato de butilo (66.59%), ácido acético (6.16%) y 2-butoxietanol (15.37%), el sistema T2-Bs produjo butanoato de etilo, 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldehído, 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzil alcohol con abundancia relativa del 18.90%, 11.77% y 11.81%, respectivamente. Por último, el sistema T3-Bs produjo ácido hexadecanoico (3.31%) y ácido octadecanoico (7.29%). La producción diferencial de estos compuestos es modulada por la interacción entre los organismos y el inductor, estos resultados sugieren que el uso de micelio desactivado de los fitopatógenos es una buena estrategia para identificar MAs novedosos.

3. Justificación

Las frutillas han ganado importancia económica en los últimos años en México. Sin embargo, las enfermedades fúngicas como la marchitez o secadera provocada por *Fusarium* spp. generan pérdidas económicas para los agricultores. Los agroquímicos son la opción más utilizada para tratar estas enfermedades. No obstante, el uso excesivo de estos compuestos ha provocado la emergencia de patógenos resistentes y su acumulación en el ambiente, así como deterioro a la salud de productores y consumidores. Es por ello por lo que se ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas, como los compuestos de origen proteico cuya producción podría ser estimulada mediante el uso de un inductor, los cuales podrían garantizar el control de cepas de *F. oxysporum* resistentes a fungicidas químicos.

4. Hipótesis

El micelio desactivado de *F. oxysporum* induce la producción de compuestos proteicos diferenciales de cepas de *Trichoderma* sp. con actividad antifúngica sobre cepas de *F. oxysporum* resistentes a fungicidas químicos.

5. Objetivos

5.1 General

Evaluar el potencial antifúngico de los compuestos de origen proteico de cepas de *Trichoderma* spp., inducidos con el micelio desactivado de *F. oxysporum* sobre el desarrollo de cepas de *F. oxysporum* resistentes a fungicidas químicos.

5.2 Específicos

- Evaluar la producción de compuestos proteicos inducidos por el micelio desactivado de *F. oxysporum* en *Trichoderma* spp.
- Analizar el efecto de los compuestos proteicos obtenidos de *Trichoderma* spp. sobre la germinación y el desarrollo de esporas de *F. oxysporum* resistente a fungicidas químicos.
- Analizar la patogenicidad de las esporas de *F. oxysporum* expuestas a los compuestos proteicos producidos por *Trichoderma* spp. en hojas de arándano y zarzamora *ex vivo*.

6. Metodología

6.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Trichoderma atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) empleadas en este trabajo se obtuvieron del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM) del Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad Hidalgo. Las cepas de *F. oxysporum* denominadas como F6 y Zar fueron donadas del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán (CIIDIR-IPN Michoacán). Estos hongos fueron crecidos en medio agar papa dextrosa (PDA), los cuales fueron sembrados en cajas Petri y se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h en condiciones de oscuridad hasta su uso.

6.2 Preparación de los medios de cultivo

6.2.1 Medio agar papa dextrosa (PDA)

Se rehidrataron 39 g de medio PDA DIBICO® en 1 L de agua destilada, el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min.

6.2.2 Caldo papa dextrosa (PD)

El caldo papa dextrosa (PD) se preparó con 200 g de papas, los cuales se hirvieron durante 20 minutos en 500 mL de agua destilada, se dejó en reposo hasta enfriar a temperatura ambiente y se filtró para eliminar el exceso de impurezas. Posteriormente, se disolvieron 20 g de glucosa en 500 mL de agua destilada en un matraz de 1 L, se agregó el filtrado de papa y se aforó a 1 L, asimismo, se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min.

6.3 Propagación de las cepas en medio PDA

Las cepas de *F. oxysporum* F6 y Zar, así como las cepas de *T. atroviride* TIMI206040, *Trichoderma* spp. TRVA1 y TRVA2 fueron reactivadas al inocular un propágulo de 0.8 cm de diámetro en una caja Petri de 9 cm de diámetro en medio PDA. Las cepas de *F. oxysporum* se incubaron durante 15 d, mientras que las cepas de *Trichoderma* spp. se incubaron durante 6 d en oscuridad a 26 ± 1 °C.

6.4 Obtención y cuantificación de esporas de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.

En matraces Erlenmeyer de 125 mL se vertieron 20 mL de medio PDA y se inocularon por picadura las cepas de *F. oxysporum* y *Trichoderma* spp. a partir de un cultivo fresco de 15 y 6 d de crecimiento, respectivamente; los cuales fueron incubados durante 15 d. Posteriormente, se recolectaron las esporas resuspendiéndolas en agua destilada estéril con ayuda de un agitador magnético a 120 r.p.m. durante 5 min. Las esporas se filtraron y centrifugaron a 5,000 r.p.m.; a partir de esta solución de esporas se prepararon diluciones 1:10 para cuantificar las esporas de las distintas cepas (F6, Zar, TIMI206040, TRVA1 y TRVA2) en una cámara Neubauer.

6.5 Desactivación del micelio de *F. oxysporum* F6 y Zar

En matraces con 200 mL de caldo PD se inocularon de 10 a 20 propágulos de 0.8 cm de diámetro de cultivos de ambas cepas de *F. oxysporum* crecidos en medio PDA durante 15 d, individualmente. Los matraces se incubaron 15 d con agitación constante a 180 r.p.m. a 27 °C, una vez transcurrido el periodo de incubación, el micelio se filtró con manta cielo y se lavaron tres veces con agua destilada estéril, posteriormente el micelio recolectado se desactivó en agua caliente (aproximadamente a 100 °C) durante 30 minutos y se enfrió a temperatura ambiente, seguido de una filtración con manta cielo para remover el exceso de agua. El micelio desactivado obtenido se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min (Yang *et al.*, 2009).

6.6 Inducción de la producción de compuestos proteicos con actividad antifúngica

Se inocularon 1×10^7 esporas de las cepas de *Trichoderma* TIMI206040, TRVA1 o TRVA2 en caldo Luria-Bertani (LB) (10 g de peptona de caseína, 15 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio) suplementado con 1% (p/v) de micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6 o Zar), el cultivo se incubó durante 14 d con agitación constante a 160 r.p.m a 26 ± 1 °C (Yang *et al.*, 2009). Se tomó 1 mL de muestra de los cultivos en caldo LB cada 24 h, de esta muestra se obtuvieron las proteínas extracelulares, para lo cual las muestras se precipitaron con acetona fría durante 12 h a -20 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 5 min a 13,000 r.p.m, se lavó la pastilla con el amortiguador de fosfatos sin Mg^{+2} y Ca^{+2} , se centrifugó durante 5 min y se disolvieron en agua destilada estéril (Bhaduri S. y Demchick P. H., 1983).

6.6.1 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Para determinar la concentración de las proteínas se prepararon las siguientes soluciones: (A) Na_2CO_3 al 3% (p/v) en NaOH 0.1 M, (B) citrato de sodio al 4% (p/v), (C) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 2% (p/v) y una solución D que se preparó al momento de la determinación al mezclar en orden las soluciones B, C y A en una proporción 1:1:48 en volumen, respectivamente. Se pipetearon 20 μ L de extracto crudo y 980 μ L de solución D, se homogeneizaron y la mezcla se dejó en oscuridad durante 10 min. Posteriormente, se añadió 50 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) diluido $\frac{1}{4}$, y se dejó reposar la muestra durante 20 min, posteriormente se centrifugaron a 5,000 r.p.m. durante 3 min y se midió la absorbancia a 640 nm en el espectrofotómetro Multiskan GO 100-240 V, 50/60 Hz ThermoFischer Scientific. La curva de calibración se preparó con albumina de suero bobino (BSA) (Sigma-Aldrich) a $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ como se muestra en el ANEXO (Lowry *et al.*, 1951).

6.6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para analizar la producción de proteínas extracelulares de *Trichoderma* sp. en ausencia y presencia del micelio desactivado térmicamente de *F. oxysporum* se prepararon geles de poliacrilamida de acuerdo con el método de Laemmli (1970),

en todos los casos se utilizó el 18% de acrilamida (Tabla. 4), para cada muestra de extracto crudo se ajustó a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, los geles se corrieron en una cámara mini-protean Bio-Rad con voltaje constante de 110 volts y 30 mA durante 2 h. Las soluciones se emplearon como se describe a continuación:

Tabla 4. Componentes de los geles de poliacrilamida

Componente	Gel concentrador 4%	Gel Separador 18%
H ₂ O destilada (mL)	2.033	1.33
Acrilamida 30% (mL)	0.446	6.0
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (mL)	-	2.5
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (mL)	0.833	-
SDS 10% (μL)	30	0.1
Persulfato de amonio 10% (μL)	16.6	40
TEMED (μL)	3.3	8.5

6.6.3 Preparación de soluciones

6.6.3.1 Amortiguador de corrida (Tris-Glicina)

Se preparó 1 L de amortiguador a una concentración final de 25 mM Trizma-base (3.0285 g), 192 mM glicina (14.4113 g) y 3.46 mM de SDS (1 g), se homogeneizó la solución y se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

6.6.3.2 Amortiguador reductor (carga de muestra)

Se prepararon 8 mL de amortiguador de una mezcla de: 3.8 mL de H₂O destilada, 0.5 mL de amortiguador Tris-0.5 M HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol, 1.6 mL de SDS al 10% (p/v), 0.4 mL de 2-β-mercaptoetanol y 0.4 mL de azul de bromofenol 0.005% (p/v). Se alicuoteó el amortiguador en tubos Eppendorf y se almacenó a -20 °C.

6.6.3.3 Solución de tinción

Se preparó 1 L de solución en la siguiente proporción: 500 mL de metanol, 100 mL de ácido acético, 0.5 g de azul de Coomassie R-250 y 400 mL de H₂O destilada.

6.6.3.4 Solución de desteñido

Se preparó 1 L de disolución para lo cual se mezclaron 400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de H₂O destilada.

6.6.3.5 Preparación de muestras

Los extractos crudos y el amortiguador de carga reductor se mezclaron en una relación 1:4 para geles desnaturizantes, las muestras se calentaron en baño María a 95 °C durante 10 min, las muestras fueron rehidratadas con el amortiguador de corrida.

6.6.3.6 Tinción de azul de Coomassie

Al terminar el corrimiento electroforético, se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 durante 12 h con agitación constante, se hicieron recambios de la solución de teñido cada 4 h. Posteriormente, el gel de poliacrilamida se desteñó durante 1 h para visualizar las proteínas.

6.7 Construcción del fenograma

Basado en las 42 muestras de los geles de poliacrilamida se usó el programa GelQuest versión 3.5.5.0, para la digitalización de las imágenes y el programa ClusterVis versión 1.9.3.0 para generar la matriz binaria resultante (Dominik Hepperle, 2005). Se usó el programa Past3 versión 3.22 para la construcción del fenograma, se utilizó el Método de grupos de pares no ponderados con medias aritméticas (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means, UPGMA por sus siglas en inglés) e índice de similaridad de Jaccard con 1,000 réplicas Bootstrap (Hammer *et al.*, 2001).

6.8 Análisis de la actividad antifúngica de las fracciones proteicas

Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos, se usaron dos controles: un control con medio PDA inoculado con esporas de *F. oxysporum* (F6 o Zar) y dos controles con medio PDA suplementado con azoxystrobin con tebuconazol (Azimut 320 SC®) o tiabendazol (Tecto 60®) a 1,000 ppm para *F. oxysporum* F6 y Zar, respectivamente. Los extractos crudos se probaron en medio PDA suplementado con 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del extracto, el cual fue inoculado con 750 esporas de *F. oxysporum* (F6 o Zar), la placa de ELISA se incubó a 25 °C durante 72 h en una incubadora IKA® KS 4000 ic control (Frąc *et al.*, 2016). Las placas con PDA se tiñeron con una solución de tinción azul de Coomassie (0.063% azul de Coomassie R-250 (p/v), 50% metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v)) por 1 h, transcurrido el tiempo la solución se cambió gentilmente, las placas fueron desteñidas con una solución de desteñido (12.5% isopropanol (v/v), 10% ácido acético glacial (v/v) y 77.5% agua destilada (v/v)) durante 72 h, se cambió la solución tres veces (Troskie *et al.*, 2012). El crecimiento del hongo fue documentado con una cámara fotográfica NIKON® D5600 y se analizó mediante densitometría para la cual se empleó el programa ImageJ versión 1.53K (Schneider *et al.*, 2012). Las muestras teñidas se analizaron con el microscopio VELAB™ Prime modelo VE-B50 con los objetivos 10X y 40X.

6.9 Efecto de la concentración de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* spp. (TRVA1 y TRVA2)

El efecto de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* spp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum* (F6 y Zar) fueron evaluados en medio PDA suplementado con los extractos crudos a una concentración de 150, 300 y 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se inocularon 750 esporas de *F. oxysporum* en un papel filtro de 6.35 mm de diámetro previamente esterilizado. Las placas con medio PDA se incubaron durante 7 d a 26 ± 1 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo se midió el crecimiento radial de las colonias y se obtuvo el porcentaje de inhibición. Se tomó una muestra de la colonia para su visualización en el microscopio, para lo cual se utilizó una solución de euroglaucina al 1% (1 mL de sal disódica de euroglaucina, 10 mL ácido acético glacial, 15 mL glicerina y 75 mL agua destilada (v/v)) (Sunčica *et al.*, 2011).

6.10 Pruebas de los extractos crudos sobre la germinación de las esporas de *F. oxysporum*

Se evaluó el efecto de los extractos crudos de *Trichoderma* spp. sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum*, para lo cual se inocularon 1,000 esporas de *F. oxysporum*, como control se utilizó caldo PD y caldo PD suplementado con los agroquímicos anteriormente descritos a 1,000 ppm y los extractos crudos a 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en caldo PD, se tomaron muestras cada 4 h durante 12 h de cada ensayo y se analizaron en el microscopio con el objetivo 40X para evaluar el desarrollo de tubos germinativos (modificado de Pei *et al.*, 2020).

6.11. Análisis de la patogenicidad de las cepas de *F. oxysporum* expuestas a los extractos crudos de *Trichoderma* spp. sobre hojas de arándano y zarzamora ex vivo

Para analizar la patogenicidad de las esporas expuestas a los tratamientos químicos y biológicos, éstas fueron incubadas en caldo PD (suplementado con los agroquímicos a 1,000 ppm o con 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los extractos crudos) durante 12 h a 26 °C con agitación constante a 120 r.p.m. Después del periodo de incubación se inocularon 1×10^5 esporas de *F. oxysporum* F6 o Zar sobre un círculo de papel filtro de 6.35 mm de diámetro previamente esterilizado y colocado en el envés de las hojas de arándano o zarzamora, respectivamente. Se aplicaron tres controles distintos: un control de hojas no inoculadas, un control de hojas inoculadas con esporas sin tratamiento y un control de hojas inoculadas con esporas tratadas con los fungicidas químicos, así como, hojas inoculadas con las esporas tratadas con los extractos crudos. Las hojas se incubaron en cámara húmeda (cajas Petri con papel Whatman No. 5 con 5 mL de agua destilada estéril) a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 d para las hojas de zarzamora y 10 d para las hojas de arándano, transcurrido el tiempo se documentaron las lesiones de las hojas y el tejido fue clareado como se describe a continuación (Bae *et al.*, 2016).

6.11.1 Desinfección de hojas de arándano y zarzamora

Se seleccionaron hojas aparentemente sanas de arándano y zarzamora, las cuales fueron desinfectadas de la siguiente manera: se lavaron con agua corriente, posteriormente las hojas se remojaron en una solución de Triton X-100 al 1%, durante 5 min con agitación suave, pasado el tiempo las hojas se transfirieron a etanol al 70% durante 1 min en agitación suave; al término las hojas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% durante 10 min; al finalizar las hojas se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril (Saint-Vincent *et al.*, 2020).

6.11.2 Clareo de tejidos

Para observar los efectos de la inoculación de las esporas tratadas sobre el tejido vegetal se clarearon las hojas de arándano y zarzamora, para la cual se tomaron las hojas y se sumergieron en la solución de clareo (ácido acético glacial/etanol al 95% en una relación 1:4 (v/v)) con agitación continua, la solución de clareo fue reemplazada cada 2 h hasta que la solución fue translúcida. Las hojas clareadas se

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de Trichoderma spp. sobre el desarrollo de cepas de Fusarium oxysporum resistentes a fungicidas químicos”

transfirieron a una solución de etanol al 70% y se incubaron a 4 °C durante 12 h, posteriormente las hojas se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril, después las hojas se incubaron con 0.5 M de ácido etilendiaminotetraacético hasta su evaluación.

6.12 Análisis microscópico del tejido vegetal infectado

Se analizó el envés y el haz de las hojas previamente clareadas, las cuales se tiñeron con una solución de euroglauцина al 1% para observar el tejido fúngico, para la cual se colocó la muestra en un portaobjetos en un microscopio VELAB™ Prime modelo VE-B50 y se observó con los objetivos 10X y 40X.

7. Resultados

7.1 Producción de proteínas extracelulares de *Trichoderma* sp.

7.1.1 Producción de proteínas extracelulares de *T. atroviride* (TIMI206040) en presencia del micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6 o Zar)

Se analizó la producción de proteínas extracelulares (PE) de *T. atroviride* (TIMI206040) tanto de forma basal como en presencia del inductor (micelio desactivado de *F. oxysporum* [F6 o Zar]) en medio líquido; mediante electroforesis. Se observó que la producción de PE de TIMI206040 de manera basal comenzó al 2° día de incubación, el perfil proteico se mantuvo hasta el 6° día, con proteínas de peso molecular con rangos de 27 a 42 kDa y de 11 a 17 kDa; sin embargo, al cabo del 7° día la producción de proteínas se atenuó, del 8° al 14° día se observaron proteínas con un peso molecular de ~57.48, ~50.29 y ~25.24 kDa (Fig. 5, Columna A). La adición del micelio desactivado de *F. oxysporum* F6 moduló la producción de las PE, se observó un perfil similar al control durante los primeros 7 días con proteínas de peso molecular alrededor de 10 a 15 kDa, el inductor promovió la producción de tres PE con pesos moleculares de 26.70, 38.35 y 42.47 kDa al 7° día; del 8° al 14° día el perfil proteico se mantuvo constante con proteínas de peso molecular de ~29 a ~72 kDa, comparado con el control (Fig. 5, Columna B). De manera similar la adición del micelio desactivado de *F. oxysporum* Zar al cultivo de TIMI206040 cambió la producción de las PE, a diferencia del inductor F6 y el control basal, la producción de PE comenzó desde el 1^{er} día de incubación, al cabo del tercer día hubo mayor producción de PE, se observó una banda diferencial de ~45.37 kDa, y una de ~49.24 kDa del 8° al 14° día (Fig. 5, Columna C). Con base en lo anterior se concluye que la adición de un inductor modula la producción de PE diferenciales de TIMI206040 como respuesta a la presencia de la pared celular de *F. oxysporum* (F6 o Zar).

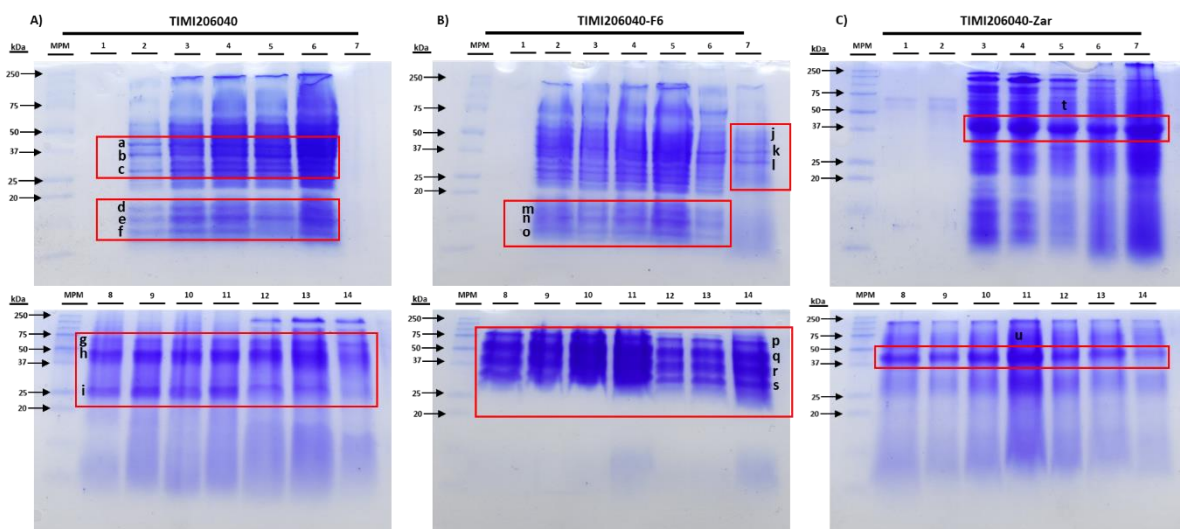


Figura 5. Monitoreo de la producción de PE producidas por *T. atroviride* (TIMI206040) en presencia de micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6-Zar). El cultivo se muestreó durante 14 días cada 24 h. Fotografías representativas del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 18%. Perfil de proteínas extracelulares producidas por: **A)** TIMI206040; **B)** Sistema TIMI206040-F6 y **C)** Sistema TIMI206040-Zar. Carriles: **MPM** marcador de peso molecular (BioRad), Tiempo de incubación: de 1-14 días en los carriles 1-14, respectivamente. Proteínas extracelulares (**a= 42.14 kDa, b= 35.74 kDa, c= 27.91 kDa, d= 16.68 kDa, e= 14.06 kDa, f= 11.40 kDa, g= 57.48 kDa, h= 50.29 kDa e i= 25.24 kDa**) para TIMI206040; (**j= 42.47 kDa, k= 38.35 kDa, l= 26.70 kDa, m= 14.40 kDa, n= 12.29 kDa, o= 9.98 kDa, p= 71.60 kDa, q= 54.61 kDa, r= 40.50 kDa y s= 29.59 kDa**) para el sistema TIMI206040-F6 y (**t= 45.37 kDa y u= 49.29 kDa**) para el sistema TIMI206040-Zar.

7.1.2 Producción de proteínas extracelulares de *Trichoderma* sp. (TRVA1) en presencia del micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6 o Zar)

El perfil proteico basal de *Trichoderma* TRVA1 fue diferente al producido por *T. atroviride* (TIMI206040), la producción de PE de TRVA1 fue menos abundante. Durante el 3°, 5° y 7° día de incubación se observó una banda diferencial de ~31.56 kDa, al 6° día se produjo una banda de 21.96 kDa, al cabo del 5° y 7° día se observó una banda diferencial de ~12.94 kDa; finalmente, del 8° al 14° día se observó una banda de ~33.42 kDa (Fig. 6, Columna A). La adición del micelio desactivado de *F. oxysporum* F6 al cultivo de *Trichoderma* TRVA1 desencadenó la producción de PE, se obtuvo un perfil proteico más enriquecido (con respecto a la producción basal). Las PE se observaron a partir del 2° día manteniéndose hasta el 7° día con proteínas de peso molecular por encima de los 37 kDa; no obstante, del 2° al 7° día de incubación se observó una banda diferencial de alrededor de los 47.64 kDa; el perfil proteico cambió a partir del 8° al 14° día, se observaron bandas de proteínas diferenciales de ~30.84 y ~37.50 kDa (Fig. 6, Columna B). El perfil proteico de *Trichoderma* TRVA1 producido en presencia del inductor Zar se enriqueció con bandas diferenciales que se observaron del 2° al 5° día con pesos moleculares de ~46.49 kDa; de otro modo, del 2° al 7° día se promovió la producción de proteínas de ~26.38 kDa; finalmente el perfil proteico del 8° al 14° día mantuvo el mismo patrón de bandeado con proteínas de alrededor de 27 a 63 kDa (Fig. 6, Columna C). Por lo tanto, la producción de PE es dependiente del estímulo, esto se demostró al utilizar dos inductores F6 o Zar, en donde se produjo mayor cantidad de PE en presencia del inductor Zar.

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

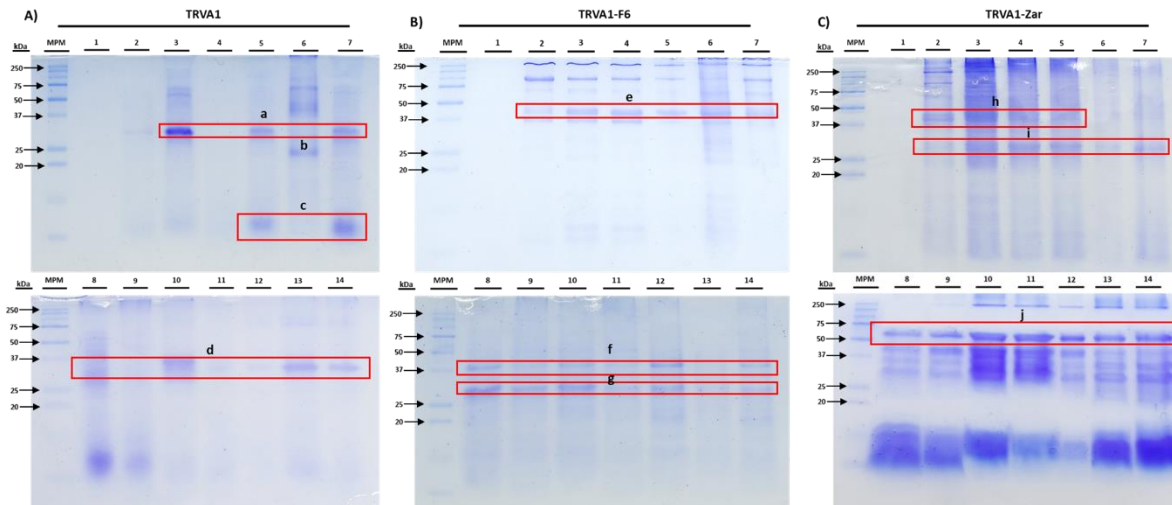


Figura 6. Monitoreo de la producción de PE producidas por *Trichoderma* sp. (TRVA1) en presencia de micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6-Zar). El cultivo se muestreó durante 14 días cada 24 h. Fotografías representativas del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 18%. Perfil de proteínas extracelulares producidas por: **A)** TRVA1; **B)** Sistema TRVA1-F6 y **C)** Sistema TRVA1-Zar. Carriles: **MPM** marcador de peso molecular (BioRad), Tiempo de incubación: de 1-14 días en los carriles 1-14, respectivamente. Proteínas extracelulares (**a= 32.56 kDa**, **b= 21.92 kDa**, **c= 12.94 kDa** y **d= 33.42 kDa**) para TRVA1; (**e= 47.64 kDa**, **f= 37.50 kDa** y **g= 30.84 kDa**) para el sistema TRVA1-F6 y (**h= 46.49 kDa**, **i= 26.38 kDa** y **j= 58.80 kDa**) para el sistema TRVA1-Zar.

7.1.3 Producción de proteínas extracelulares de *Trichoderma* sp. (TRVA2) en presencia del micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6 o Zar)

El perfil proteico basal de *Trichoderma* TRVA2 comenzó a partir del 2° día el cual se mantuvo constante hasta el 14° día de incubación, durante este tiempo se observó una banda diferencial de ~43.26 kDa. A diferencia de TIMI206040 y TRVA1, TRVA2 produce mayor cantidad de PE basalmente (Fig. 7 Columna A). La adición del micelio de F6 moduló la producción de bandas diferenciales de 10.78 y 32.84 kDa durante los primeros 7 días, sin embargo, del 10° al 14° día de incubación se observó una banda diferencial con peso molecular de ~10.34 kDa (Fig. 7 Columna B). Por último, la producción de PE generados por *Trichoderma* TRVA2 en presencia del micelio de Zar se llevó a cabo a partir del tercer día de incubación, durante los primeros 7 días el perfil proteico fue escaso con respecto al control, en el 3° y 4° día de incubación se observó una banda de ~32.56 kDa; y del 5° al 7° día otra banda de 26.38 kDa. La mayor producción de PE se llevó a cabo del 8° al 14° día, donde se observó una banda constante de ~44.74 kDa (Fig. 7, Columna C).

Los resultados sugieren que las cepas de *Trichoderma* empleadas en este estudio producen diferencialmente PE tanto de manera basal como con el uso de inductores, lo cual sugiere que algunas de las proteínas contenidas en los extractos crudos analizados podrían poseer propiedades antifúngicas, aunque dicha propiedad debe de ser demostrada.

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

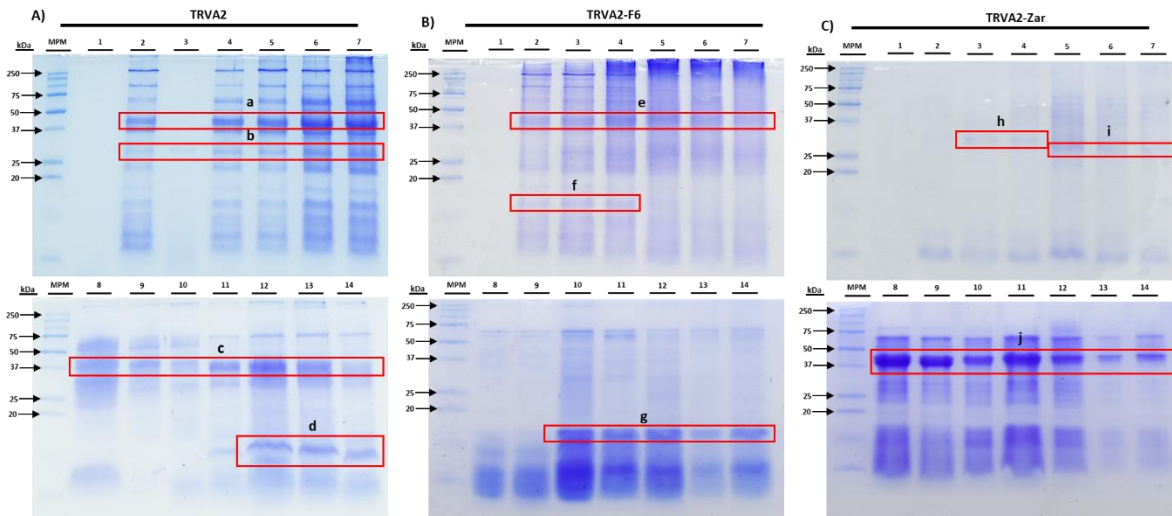


Figura 7. Monitoreo de la producción de PE producidas por *Trichoderma* sp. (TRVA2) en presencia de micelio desactivado de *F. oxysporum* (F6-Zar). El cultivo se muestreó durante 14 días cada 24 h. Fotografías representativas del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 18%. Perfil de proteínas extracelulares producidas por: **A)** TRVA2; **B)** Sistema TRVA2-F6 y **C)** Sistema TRVA2-Zar. Carriles: **MPM** marcador de peso molecular (BioRad), Tiempo de incubación: de 1-14 días en los carriles 1-14, respectivamente. Las proteínas extracelulares (**a= 44.64 kDa**, **b= 31.42 kDa**, **c= 41.89 kDa** y **d=12.23 kDa**) para TRVA2; (**e= 32.84 kDa**, **f= 10.78 kDa** y **g= 10.34 kDa**) para el sistema TRVA2-F6 y (**h= 32.56 kDa**, **i= 28.84 kDa** y **j= 44.74 kDa**) para el sistema TRVA2-Zar.

7.1.4 Análisis de los perfiles de proteínas extracelulares de *Trichoderma* sp.

El análisis de los perfiles proteicos basales producidos por las cepas de *Trichoderma* generó tres grupos (A-C) y cinco subgrupos (A-I, A-II, B-I, B-II y B-III) con un nivel de similitud de 0.087 y 0.375, respectivamente (Fig. 8). En el grupo A se incluyeron los perfiles proteicos de TIMI206040 (IMI) obtenidos del día 8° al 14° (subgrupo A-I) y de TRVA2 del 1° al 7° (subgrupo A-II). En el grupo B se incorporaron los perfiles de TRVA1 del día 1° al 7° (subgrupo B-I), el subgrupo B-II se conformó por los perfiles de TRVA1 del 8° al 14° día y solo el perfil de IMI de 1er día; los perfiles de TRVA2 del 8° al 14° día conformaron el subgrupo B-III. El grupo C conformado por los perfiles proteicos de IMI del 2° al 7° día. El agrupamiento comparativo del perfil proteico basal de *Trichoderma* demostró que hay una producción diferencial de proteínas extracelulares entre TIMI206040, TRVA1 y TRVA2. Sin embargo, hay mayor similitud entre TIMI206040 y TRVA2, mientras que las proteínas de TRVA1 del día 1° al 14° se relacionan con el perfil proteico de TRVA2 del 8° al 14° día.

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

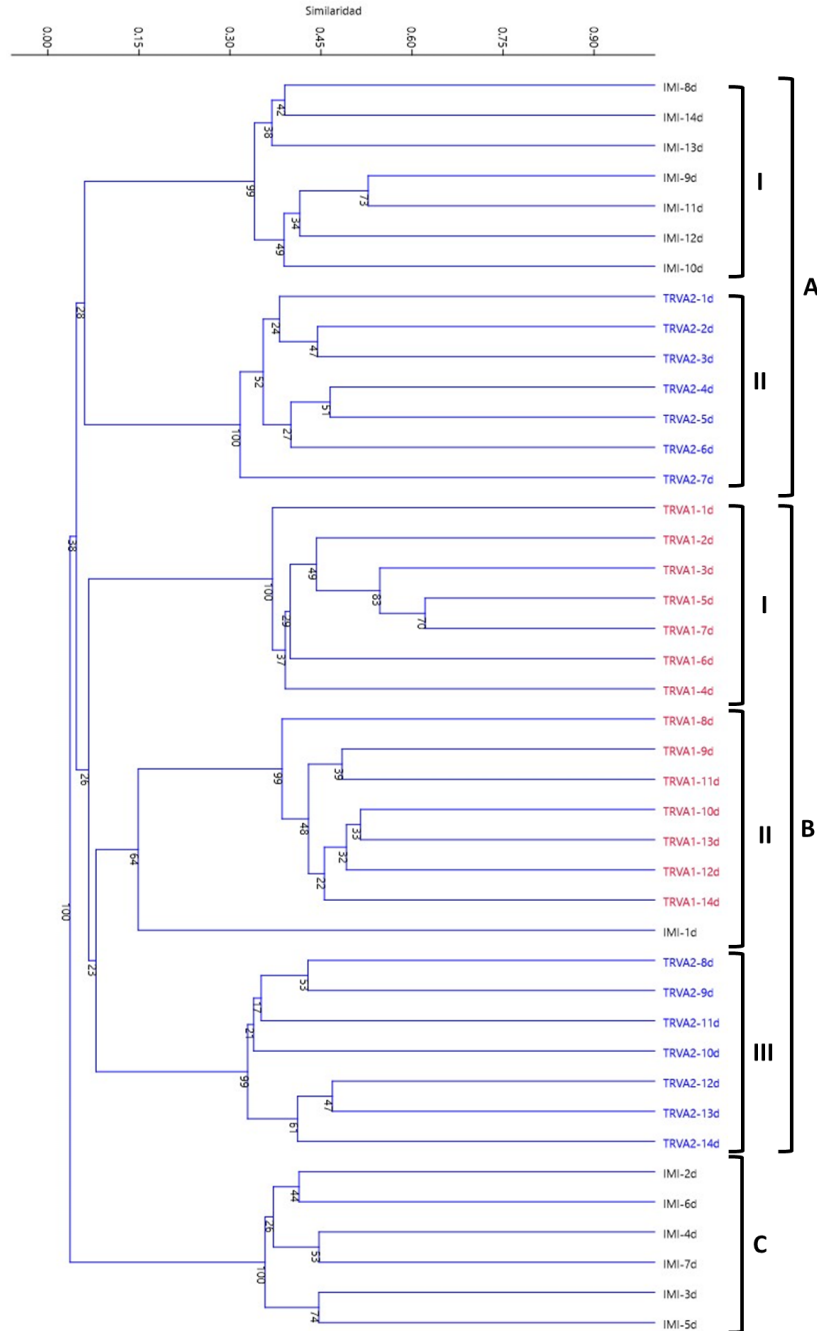


Figura 8. Fenograma de correlación de los perfiles proteicos obtenidos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* spp. (TRVA1 y TRVA2) en condiciones basales. Se utilizó el análisis de agrupamiento (UPGMA) realizado sobre la matriz de similitud entre la ausencia o presencia de proteínas (coeficiente de Jaccard). Coeficiente de correlación cofenética (r)=0.9819. Las cifras de los nodos son los valores del Bootstrap basado en 1,000 réplicas. Nota: las claves negras corresponden a *T. atroviride* (TIMI206040 [IMI]), las claves rojas a *Trichoderma* sp. (TRVA1) y las claves azules a *Trichoderma* sp. (TRVA2).

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

Por otro parte, el análisis de los perfiles proteicos producidos por las cepas de *Trichoderma* sp. en presencia del micelio desactivado de *F. oxysporum* F6 (Fig. 9) generó cinco grupos (A-E) y dos subgrupos (B-I y B-II). El grupo B conformado por los subgrupos B-I (TRVA1 con el inductor F6 [TF1]) y B-II (IMI con el inductor F6 [FM]) de los días 1° al 7° con un nivel de similitud de 0.10. El grupo A incluyó los perfiles de TF2 (TRVA2 con el inductor F6) de los días 1° al 7°, junto con los grupos C (TF1 8° al 14° día), D (TF2 8° al 14° día) y E (FM 8° al 14° día) tienen un nivel de similitud de 0.355.

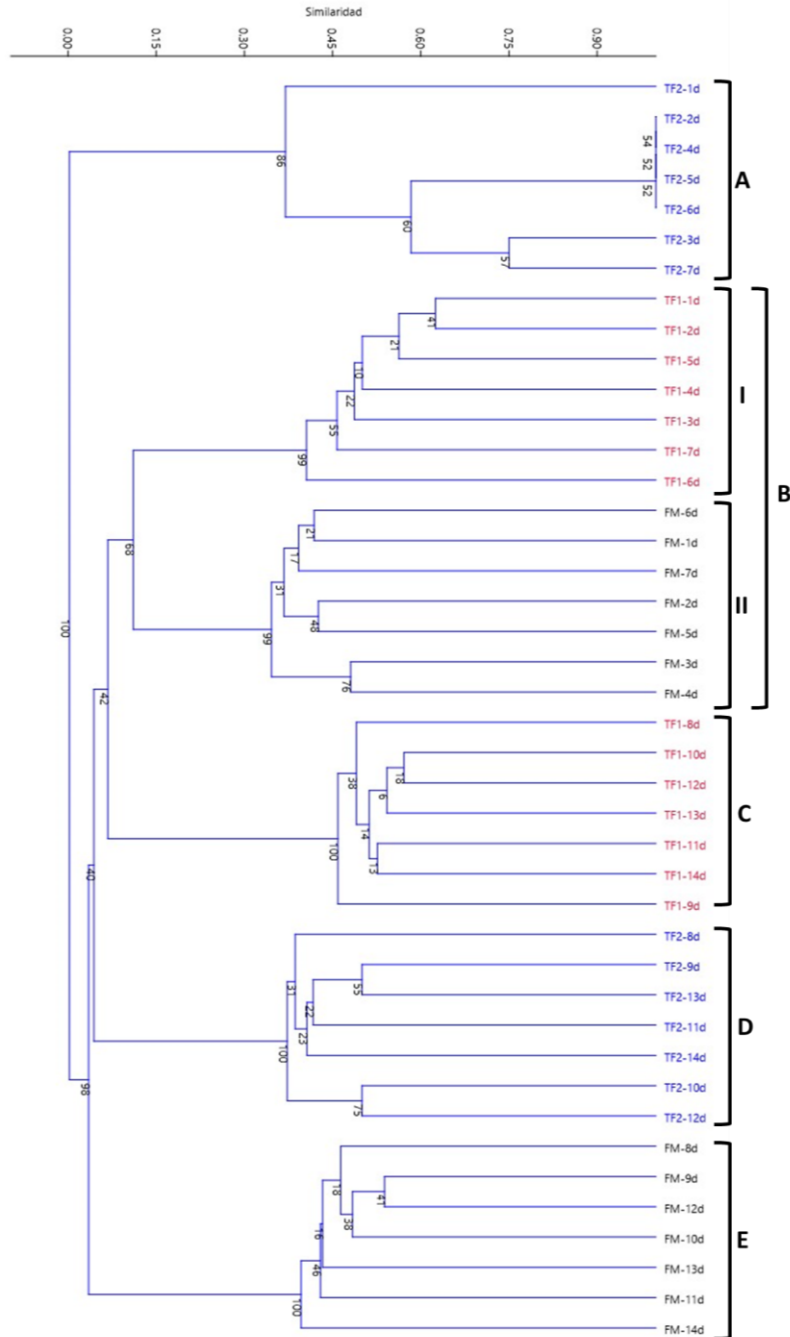


Figura 9. Fenograma de correlación de los perfiles proteicos obtenidos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* spp. (TRVA1 y TRVA2) obtenidos con el inductor *F. oxysporum* (F6). Se utilizó el análisis de agrupamiento (UPGMA) realizado sobre la matriz de similitud entre la ausencia o presencia de proteínas (coeficiente de Jaccard). Coeficiente de correlación cofenética (r)=0.9907. Las cifras de los nodos son los valores del Bootstrap basado en 1,000 réplicas. Nota: las claves negras corresponden a *T. atroviride* (TIMI206040 [IMI]), las claves rojas a *Trichoderma* sp. (TRVA1) y las claves azules a *Trichoderma* sp. (TRVA2).

Por otro lado, en presencia del inductor *F. oxysporum* Zar se generaron tres grupos (A-C) y cuatro subgrupos (A-I, A-II, B-I y B-II) en el fenograma de los perfiles proteicos de *Trichoderma* sp. (Fig. 10). El grupo A se conformó por los subgrupos A-I (el cual consiste en los perfiles proteicos de TRVA1- Zar [TZ1]) y el subgrupo A-II (IMI-Zar [ZM] del día 1° al 7° para ambas cepas de *Trichoderma* sp.). En el grupo B se incluyeron los perfiles de TZ1 del 8° al 14° día (subgrupo B-I) y TZ2 (TRVA2-Zar) del día 1° al 7° (subgrupo B-II), entre estos hay un nivel de similitud del 0.3187. El grupo C se conforma por los perfiles proteicos de TZ2 y ZM de los días 8° al 14°, los cuales tienen un nivel de similitud más cercano a la unidad (~0.99).

Con base en los fenogramas, se demostró que hay una producción diferencial de PE con la adición del micelio desactivado de *F. oxysporum* F6, la cepa TIMI206040 y TRVA1 durante los primeros 7 días de incubación tienen un perfil de proteínas similar en comparación a TRVA2, mientras que con el micelio desactivado de *F. oxysporum* Zar los perfiles de TIMI206040 y TRVA2 del 8° al 14° día tienen un nivel de similaridad del 0.99.

7.2 Selección de proteínas extracelulares con potencial antifúngico de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum*

7.2.1 Antibiograma de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040)

Con base en el perfil diferencial proteico de TIMI206040 inducido por el micelio desactivado de Zar se seleccionaron tres extractos crudos denominados ZM-3d, ZM-4d y ZM-5d, así como sus respectivos controles (los extractos obtenidos de *T. atroviride* sin el inductor con el mismo tiempo de incubación) IMI-3d, IMI-4d e IMI-5d, respectivamente, para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *F. oxysporum* F6 (Fig. 11A-C) y Zar (Fig. 11D-F). El tratamiento de azoxystrobin con tebuconazol inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* F6 (30%), mientras que en el caso de los extractos proteicos se observó tanto estimulación como inhibición del crecimiento. Los extractos crudos IMI-3d, IMI-4d y ZM-4d promovieron el crecimiento (168%, 180% y 195%, respectivamente, con respecto al control [PDA]), mientras que los extractos ZM-3d, IMI-5d y ZM-5d inhibieron el crecimiento (38%, 27% y 57%, respectivamente) (Fig. 11C). Con respecto a *F. oxysporum* Zar los tratamientos que promovieron el crecimiento con respecto al control (PDA) fueron tiabendazol, ZM-3d e IMI-4d (164%, 139% y 195%, respectivamente); mientras que los extractos que inhibieron el crecimiento fueron IMI-3d (42%), ZM-4d (36%), IMI-5d (54%) y ZM-5d (42%) (Fig. 11F).

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

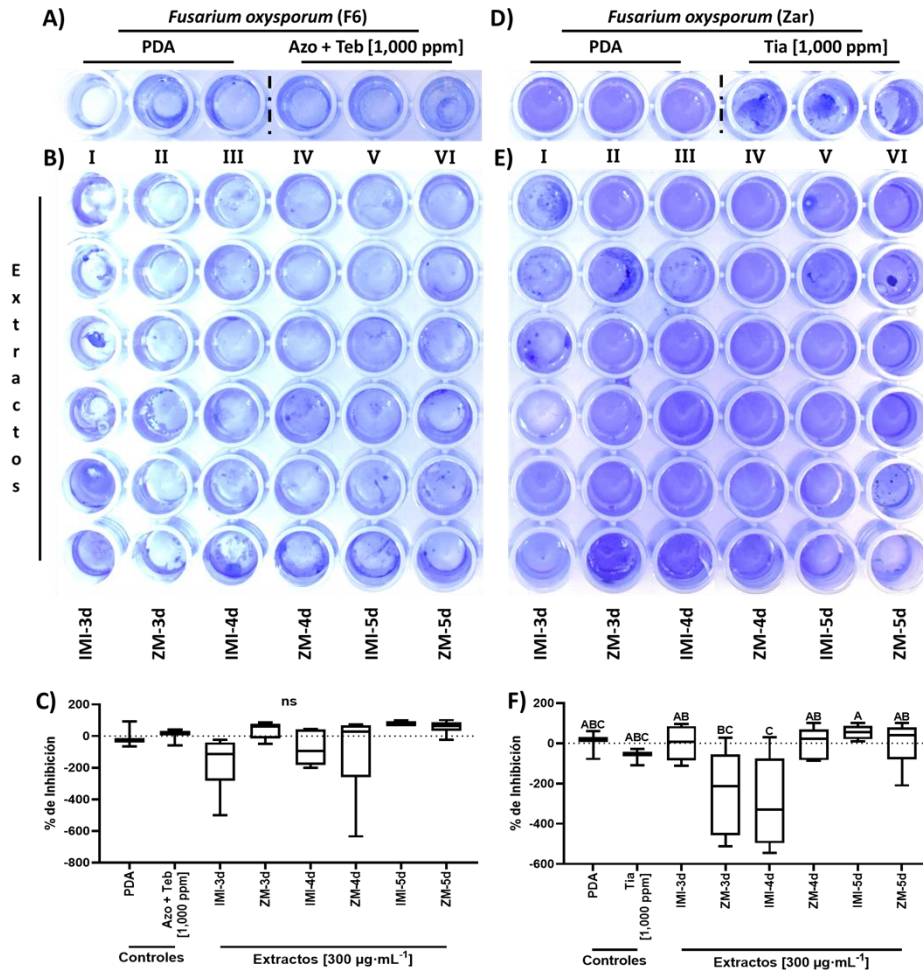


Figura 11. Antibiograma de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040). Imagen representativa de la placa de ELISA: **A y D)** grupos control esporas de *F. oxysporum* (F6 y Zar, respectivamente) en medio PDA y medio PDA suplementado con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (F6) o tiabendazol [1,000 ppm] (Zar); **B y E)** crecimiento de F6 y Zar en presencia de los extractos crudos de TIMI206040 [300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], respectivamente; **C y F)** porcentaje de inhibición del crecimiento de F6 y Zar, respectivamente. Los datos en el gráfico representan el promedio de una $n=6 \pm \text{DE}$. Se realizó un análisis de normalización y varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Las letras mostradas en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes y los datos no significativos se muestran como ns. Las claves son: azoxystrobin con tebuconazol (**Azo + Teb**) y tiabendazol (**Tia**).

El micelio crecido de *F. oxysporum* F6 y Zar con los extractos IMI-3d, IMI-5d, ZM-3d, ZM-4d y ZM-5d no se pudo observar en el microscopio (datos no mostrados). Con base en los resultados se analizó el micelio de *F. oxysporum* (F6 y Zar) crecido en presencia de los extractos IMI-4d e IMI-5d al microscopio (Fig. 12). En el control de *F. oxysporum* F6 se observó micelio sin daños, mientras que a partir del micelio crecido en presencia de azoxystrobin con tebuconazol se observaron microconidios y adelgazamiento de hifas. De forma similar, se observó adelgazamiento de las hifas

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

en el tratamiento con IMI-4d en comparación al control y macroconidios alargados los cuales se tiñeron con el colorante, esto refleja daños en la pared celular; mientras que el micelio crecido en presencia de IMI-5d mostró hifas delgadas y enrolladas entre sí, no se observaron macro o microconidios (Fig. 12A).

Con respecto a *F. oxysporum* Zar en el tratamiento control se observaron hifas íntegras sin daños aparentes, mientras que con los tratamientos con tiabendazol e IMI-4d se observó engrosamiento de las hifas. Por último, en el tratamiento con IMI-5d se observaron hifas lisadas, delgadas y enrolladas, no se observaron conidios (Fig. 12B).

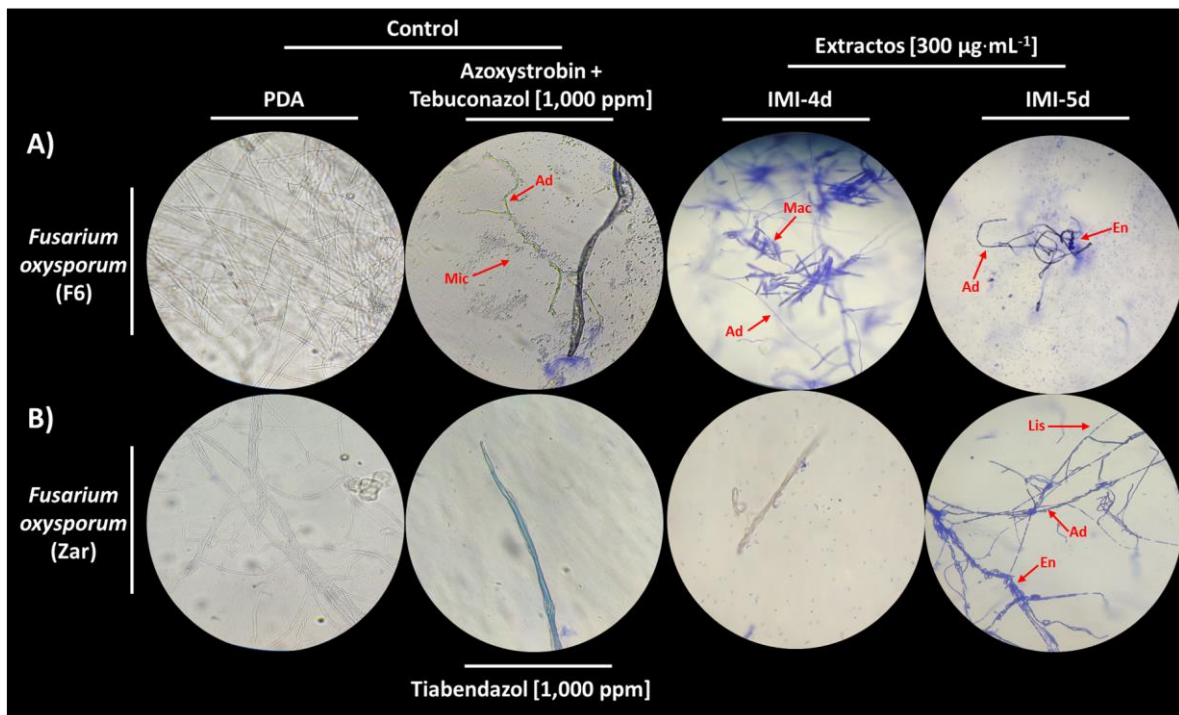


Figura 12. Efecto de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) sobre el desarrollo de *F. oxysporum* (F6 y Zar). **A)** micrografías representativas de *F. oxysporum* F6 del control (PDA) y medio PDA suplementado con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm], y los tratamientos con los extractos crudos de TIMI206040 [300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], extraídos los días 4 y 5; **B)** micrografías representativas de *F. oxysporum* Zar del control (PDA) y medio PDA suplementado con tiabendazol [1,000 ppm], y los tratamientos con los extractos crudos de TIMI206040 [300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] extraídos los días 4 y 5; en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante 48 h, se tomó una muestra de micelio de cada tratamiento, se adicionó una gota de euroglauцина al 1% y se analizó al microscopio con el objetivo 40X. Los indicadores son los siguientes: adelgazamiento (**Ad**), enrollamiento (**En**), lisis (**Lis**), macroconidios (**Mac**) y microconidios (**Mic**).

7.2.2 Antibiograma de los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2)

Con base en el perfil diferencial proteico de TRVA1 y TRVA2 se seleccionaron los siguientes extractos crudos: TRVA1-4d, TF1-4d, TRVA1-12d, TF1-12d, TRVA1-3d,

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

TZ1-3d, TRVA1-13d, TZ1-13d, TRVA2-8d, TF2-8d, TRVA2-5d y TZ2-5d, sobre el crecimiento de *F. oxysporum* F6 (Fig. 13) y Zar (Fig. 14), respectivamente.

Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* F6, el tratamiento con azoxystrobin con tebuconazol inhibió el crecimiento de F6 (20%), solo TRVA1-4d promovió el crecimiento en un 111.50% en comparación al control (PDA), mientras que los porcentajes de inhibición del más alto al más bajo se obtuvieron con los extractos TF2-8d (79%), TRVA2-5d (70%), TF1-12d (69%), TRVA1-13d (58%), TZ1-13d (57%), TF1-4d (54%), TZ2-5d (50%), TRVA1-12d (46%), TZ1-3d (45%), TRVA1-3d (41%) y TRVA2-8d (34%) (Fig. 13D).

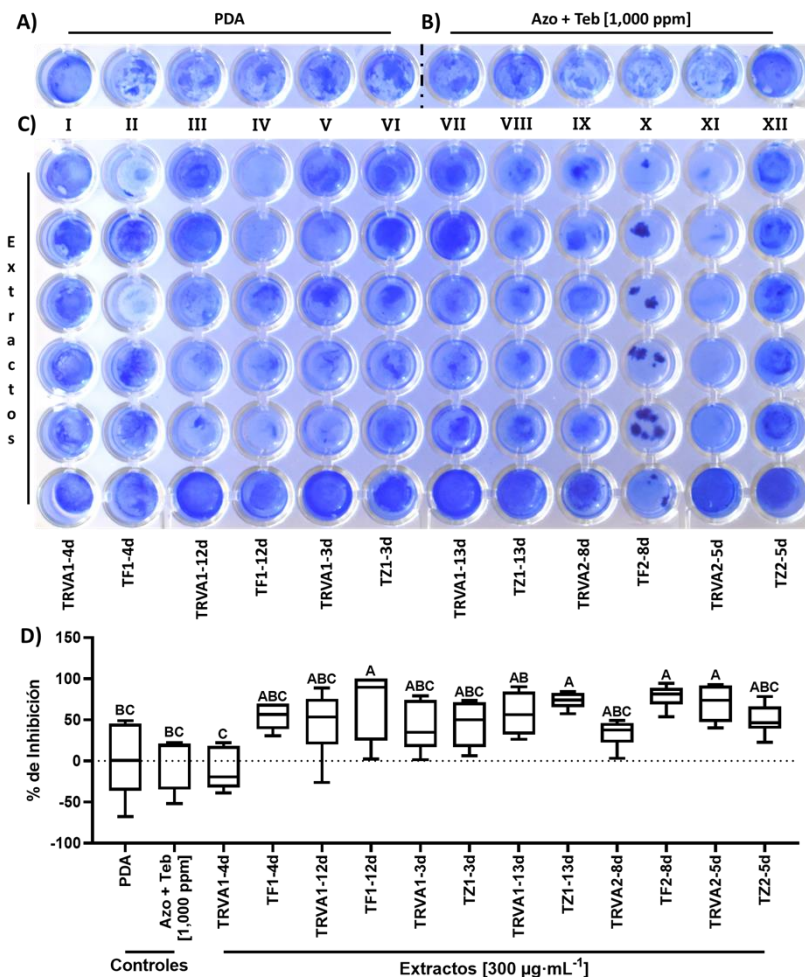


Figura 13. Antibiograma de los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2). Imagen representativa de la placa de ELISA: **A)** Control esporas de *F. oxysporum* F6 en medio PDA; **B)** Medio PDA suplementado con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (**Azo + Teb**); **C)** Antibiograma de los extractos crudos de TRVA1 y TRVA2 [$300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] sobre el crecimiento de F6 y **D)** Porcentaje de inhibición del crecimiento de F6. Los datos en el gráfico representan el promedio de una $n=6 \pm \text{DE}$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Las letras mostradas en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* Zar (Fig. 14D), a diferencia de F6 la mayoría de los extractos promovieron el crecimiento de Zar, TRVA1-4d (339%), TZ1-3d (200%), TRVA1-12d (145%), TRVA2-8d (136%), TF1-4d (106%), TRVA1-3d (52%), TRVA1-13d (42%) y TF1-12d (13%) con respecto al control, mientras que los extractos TZ1-13d, TRVA2-5d, TZ2-5d y TF2-8d inhibieron el crecimiento (53%, 100%, 100% y 100%, respectivamente).

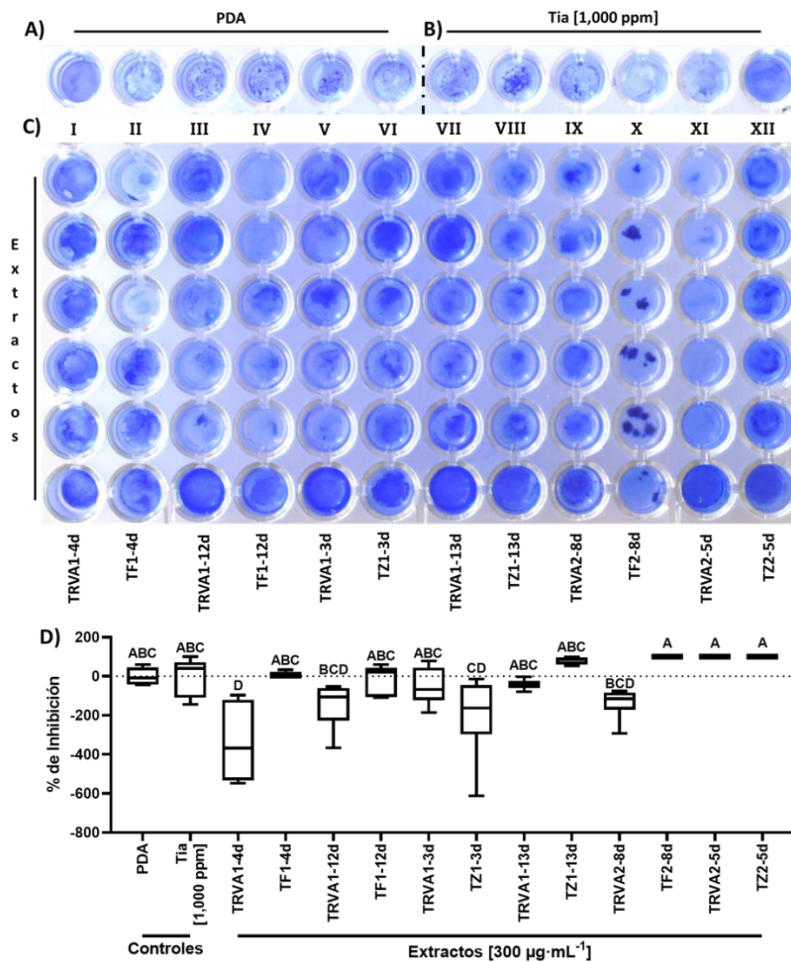


Figura 14. Antibiograma de los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2). Imagen representativa de la placa de ELISA: **A)** Control esporas de *F. oxysporum* Zar en medio PDA; **B)** Medio PDA suplementado con tiabendazol [1,000 ppm] (**Tia**); **C)** Antibiograma de los extractos crudos de TRVA1 y TRVA2 [300 µg·mL⁻¹] sobre el crecimiento de Zar y **D)** Porcentaje de inhibición del crecimiento de Zar. Los datos en el gráfico representan el promedio de una n=6 ± DE. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Las letras mostradas en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

Con base en los porcentajes de inhibición se analizó bajo el microscopio el micelio de *F. oxysporum* (F6 y Zar) crecido en presencia de los extractos TF1-12d, TZ1-13d, TF2-8 d, TRVA2-5d y TZ2-5d (Fig. 15). El micelio control de F6 presentó hifas

“Análisis del potencial antifúngico de los compuestos proteicos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos”

gruesas sin daños estructurales; mientras que azoxystrobin con tebuconazol adelgazó y dañó la pared celular de las hifas, los extractos indujeron los siguientes efectos: TF1-12d provocó la vacuolización, adelgazamiento y deformación de las hifas, se observaron macroconidios; TZ1-13d provocó adelgazamiento de las hifas y vacuolización en los macroconidios; TF2-8d generó hifas ramificadas, con distorsiones e hinchamiento; en presencia de TRVA2-5d se estimuló la producción de microconidios de F6; por último TZ2-5d provocó la lisis de las hifas (Fig. 15).

El micelio control de *F. oxysporum* Zar no presentó daños en su estructura, el tratamiento con tiabendazol causó hinchamiento y lisis de hifas, el extracto TF1-12d provocó la lisis de las hifas, se observó adelgazamiento de las hifas de Zar en presencia de TZ1-13d; en el tratamiento con TF2-8d se observaron hifas delgadas y microconidios, mientras que con TRVA2-5d no se observó desarrollo de tubos germinativos y, por lo tanto, no hubo desarrollo de hifas, sin embargo, se observó aglomeración de macroconidios dañados. Por último, las hifas desarrolladas en presencia del extracto TZ2-5d generaron vacuolas e hinchamiento de hifas.

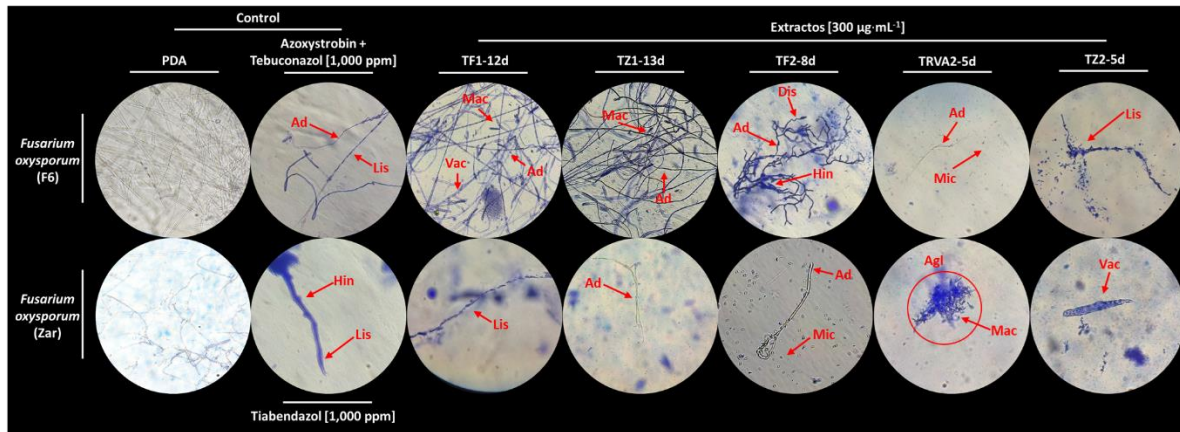


Figura 15. Efecto de los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el desarrollo de *F. oxysporum* (F6 y Zar). Micrografías representativas de *F. oxysporum* (F6 y Zar) del control (PDA) y el medio PDA suplementado con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (F6) y tiabendazol [1,000 ppm] (Zar), y los tratamientos con los extractos crudos de TRVA1 y TRVA2 a [300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]; en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante 48 h, se tomó una muestra de micelio de cada tratamiento, se adicionó una gota de euroglauцина al 1% y se analizó al microscopio con el objetivo 40X. Los indicadores son los siguientes: adelgazamiento (**Ad**), hinchamiento (**Hin**), lisis (**Lis**), vacuolas (**Vac**), aglomeración (**Agl**), macroconidios (**Mac**) y microconidios (**Mic**).

Los extractos analizados afectaron el desarrollo de *F. oxysporum* F6 y Zar, se observaron diferentes alteraciones como adelgazamiento, hinchamiento, lisis y vacuolización de las hifas, dichas alteraciones pueden ser provocadas por enzimas hidrolíticas. Debido a estas alteraciones se seleccionaron los extractos IMI-3d, IMI-4d, TRVA2-5d y TF2-8d para el tratamiento de F6 y Zar, mientras que los extractos TF1-12d y TZ1-13d fueron específicos para el control de F6 y TZ2-5d para Zar.

7.2.3 Efecto de la concentración de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum* (F6)

Se analizó el efecto de la concentración de los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 sobre el crecimiento de *F. oxysporum* F6 (Fig. 16). A nivel macroscópico la cepa control mostró morfología circular, micelio vegetativo rojo brillante, laxo, filamentoso, plano con bordes blancos irregulares; mientras que con el tratamiento de azoxystrobin con tebuconazol se observó morfología circular, micelio vegetativo, laxo, a partir del centro se observó una pigmentación rojiza (Fig. 16A).

De manera general los efectos que generaron los extractos sobre el crecimiento de F6 fueron las siguientes: colonias con micelio vegetativo laxo y rojo, del centro hacia el borde de las colonias fue rojo claro y con bordes irregulares, sin micelio aéreo. Los extractos que indujeron alteraciones en el crecimiento fueron: IMI-4d [$450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] morfología plana, micelio filamentoso blanco con bordes color salmón; TF2-8d [150 a $450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] se observó micelio vegetativo filamentoso y laxo, la zona central presentó pigmentación rosada y en la periferia de la colonia fue rojo intenso; finalmente con TF1-12d [$300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] se desarrolló una colonia con micelio vegetativo filamentoso laxo, rojo intenso con bordes filamentosos rojos; se observó que los extractos IMI-4d e IMI-5d afectaron la pigmentación de las colonias de F6, a mayor concentración menor pigmentación; mientras los extractos TRVA2-5d, TF2-8d, TF1-12d y TZ1-13d tuvieron el efecto contrario (Fig. 16A).

El tratamiento de azoxystrobin con tebuconazol generó el 72% de inhibición, mientras que todos los extractos crudos a $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ promovieron el crecimiento en un rango de 106% a 168%. A $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ los extractos que promovieron el crecimiento fueron TZ1-13d (21%) e IMI-5d (22%) con respecto al control. Por último, a $450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; los extractos IMI-5d (37%) y TZ1-13d (39%) inhibieron el crecimiento del patógeno, e IMI-4d, TRVA2-5d, TF2-8d y TZ1-13d promovieron el crecimiento (135%, 118%, 135% y 102%, respectivamente) (Fig. 16B).

Se evaluaron los efectos microscópicos inducidos sobre el micelio de F6 por los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 (Fig. 17). En el micelio control se observaron hifas sanas (sin daños estructurales) y microconidios; el tratamiento de azoxystrobin con tebuconazol generó hifas delgadas y vacualizadas, además se observaron macro y microconidios dañados.

En general los extractos crudos analizados causaron adelgazamiento, enrollamiento, vacualización y lisis de las hifas. Sin embargo, los extractos IMI-4d y TF1-12d [$300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] generaron hinchamiento de las hifas; solo en respuesta al extracto TF1-12d [$300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] se observó pigmentación en el campo visual. Los extractos IMI-4d [$150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], TRVA2-5d [150 y $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], TF2-8d [150 a $450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], TF1-12d [150 y $450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] y TZ1-13d [150 y $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] indujeron la conidiación y la aglomeración de microconidios (Fig. 17).

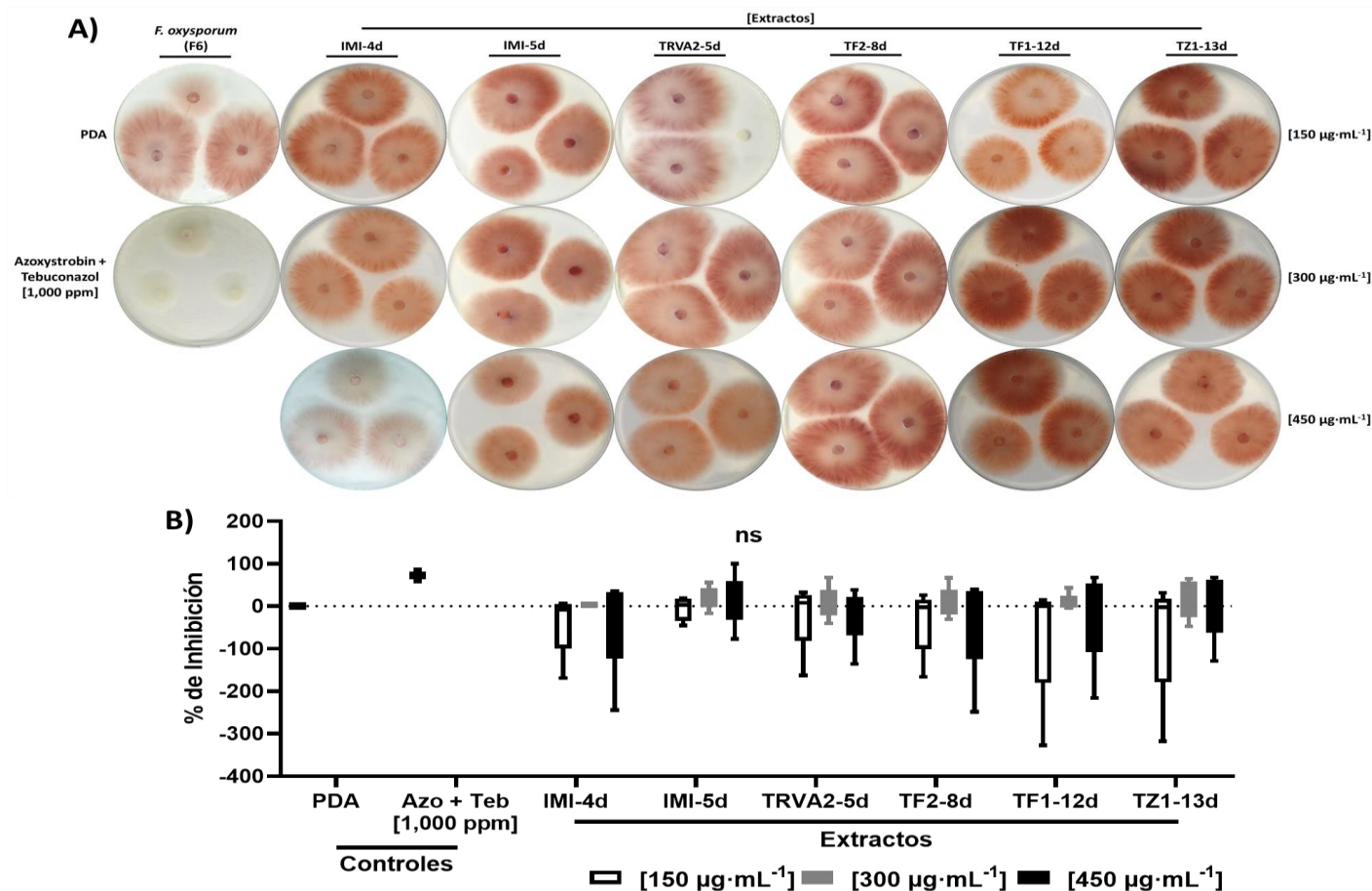


Figura 16. Efecto de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento de *F. oxysporum* (F6). A) Fotografías representativas de los tratamientos realizados en medio PDA adicionado con los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Control Medio PDA + Esporas, control medio suplementado con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] B) Porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* F6. Los datos en el gráfico representan el promedio de una $n=5 \pm \text{DE}$. Se realizó un análisis de normalización y varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Los datos no significativos se muestran como ns.

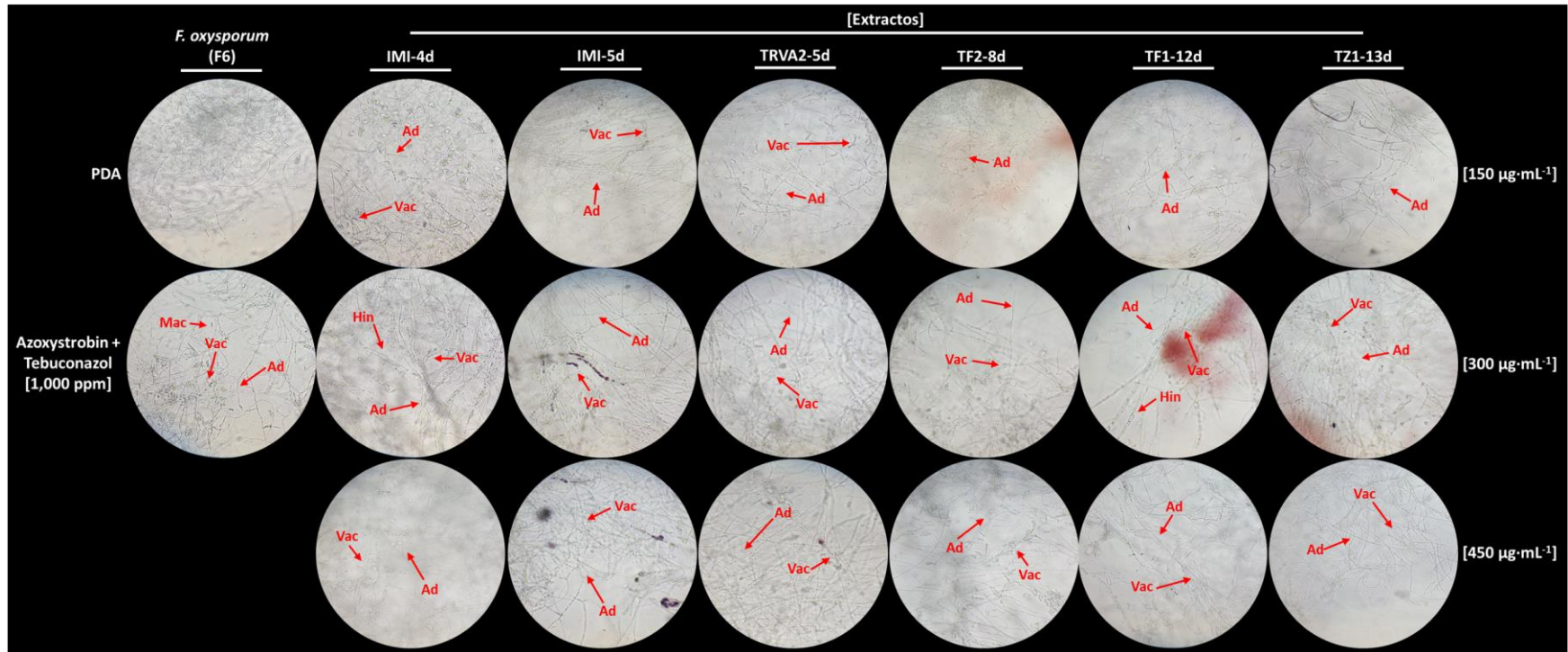


Figura 17. Efecto de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el desarrollo de *F. oxysporum* (F6). Micrografías representativas de los tratamientos realizados en medio PDA adicionado con los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se analizó al microscopio con el objetivo 40X. Los indicadores son los siguientes: adelgazamiento (**Ad**), hinchamiento (**Hin**), vacuolas (**Vac**) y macroconidios (**Mac**).

Los resultados sugieren que los extractos alteran el desarrollo y la pigmentación de *F. oxysporum* F6 probablemente debido a enzimas hidrolíticas.

7.2.4 Efecto de la concentración de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum* (Zar)

Se analizó el efecto de la concentración de los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 sobre el crecimiento de *F. oxysporum* Zar a 150, 300 y 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Fig. 18). La colonia control desarrolló micelio vegetativo filamentososo laxo y rojo brillante con bordes irregulares, mientras que la colonia con tiabendazol desarrolló micelio aéreo algodonoso y blanco; el tratamiento con tiabendazol promovió el crecimiento de Zar (102%); sin embargo, afectó la pigmentación de la colonia.

A diferencia de *F. oxysporum* F6, las colonias de *F. oxysporum* Zar mostraron alteración en su pigmentación, las cepas tratadas con los extractos IMI-4d [150 a 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], IMI-5d [300 y 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] (a mayor concentración mayor pigmentación), TRVA2-5d [150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], TF2-8d [150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] y TZ2-5d [150 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] desarrollaron pigmentación rojiza en su totalidad a menores concentraciones, al aumentar la concentración disminuyó la pigmentación (Fig. 18).

La colonia crecida con IMI-4d [450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] desarrolló micelio aéreo algodonoso alrededor de la colonia; en los tratamientos con IMI-5d [150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] y TRVA2-5d [300 y 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] se observó disminución en la pigmentación de la colonia, finalmente la colonia tratada con TF2-8d [300 y 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] desarrolló micelio filamentososo laxo y blanco (Fig. 18A).

Los extractos crudos que inhibieron el crecimiento fueron IMI-4d [150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] (4%) y TRVA2-5d [450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] (5%) con respecto al control (PDA), mientras que los extractos que promovieron el crecimiento fueron IMI 5 d [150 a 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] (101% a 110%), TRVA2-5d [150 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] 126%, TF2-8d [150 a 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] entre 108% a 128%, por último, TZ2-5d [150 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] fue del 112% en comparación con el control (Fig. 18B).

Se analizaron microscópicamente las colonias crecidas con los extractos crudos (Fig. 19). El control sin tratamiento mostró hifas sin daños estructurales. A pesar de que el tiabendazol no inhibió el crecimiento de la colonia, éste afectó el desarrollo de ésta, se observó adelgazamiento y enrollamiento de las hifas. De manera general el adelgazamiento, vacuolización y distorsiones de las hifas se observaron en todas las concentraciones probadas. Las hifas del micelio de la colonia crecida con el extracto IMI-5d [300 y 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] presentaron hinchamiento y alteraciones en su morfología, solamente los extractos IMI-4d y TF2-8d [300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] promovieron la conidiación (Fig. 19). Los extractos crudos de *Trichoderma* TRVA1 y TRVA2 afectaron la pigmentación de *F. oxysporum* Zar en comparación a F6, esto podría deberse al estrés causado por las PE.

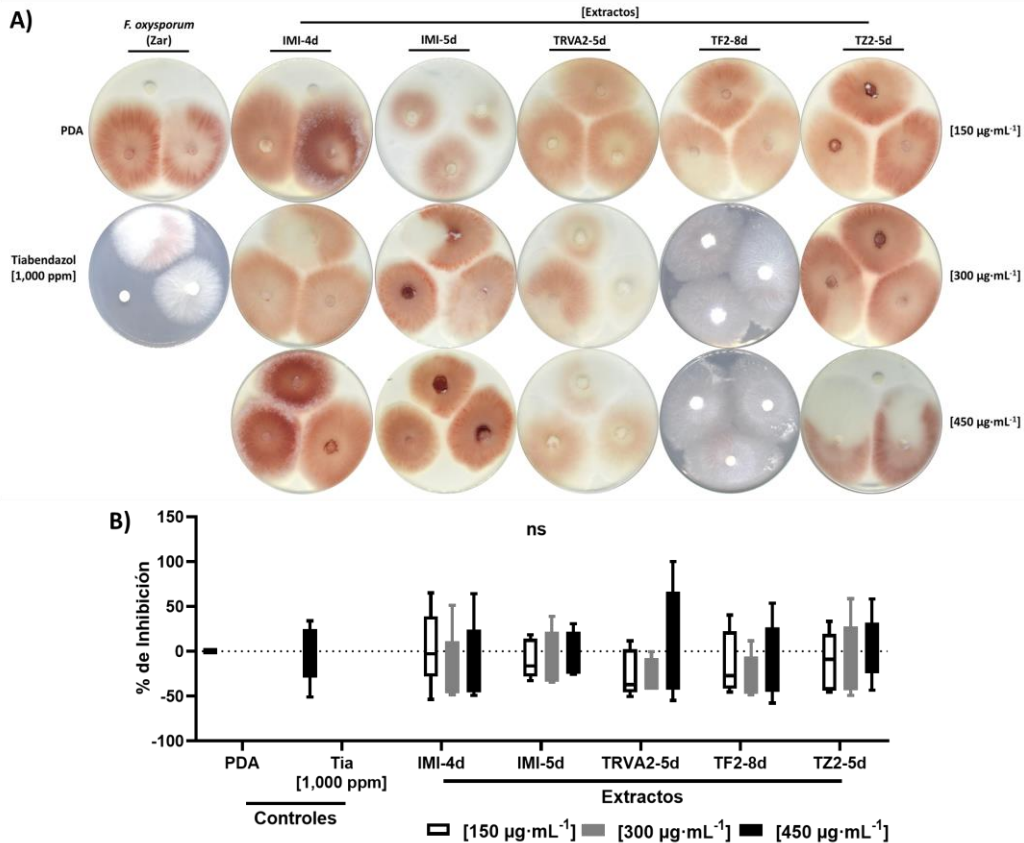


Figura 18. Efecto de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el crecimiento de *F. oxysporum* (Zar). **A)** Fotografías representativas de los tratamientos realizados en medio PDA adicionado con los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Control Medio PDA + Esporas, control medio suplementado con tiabendazol [1,000 ppm]; **B)** Porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* Zar. Los datos en el gráfico representan el promedio de una $n=5 \pm DE$. Se realizó un análisis de normalización y varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Los datos no significativos se muestran como ns.

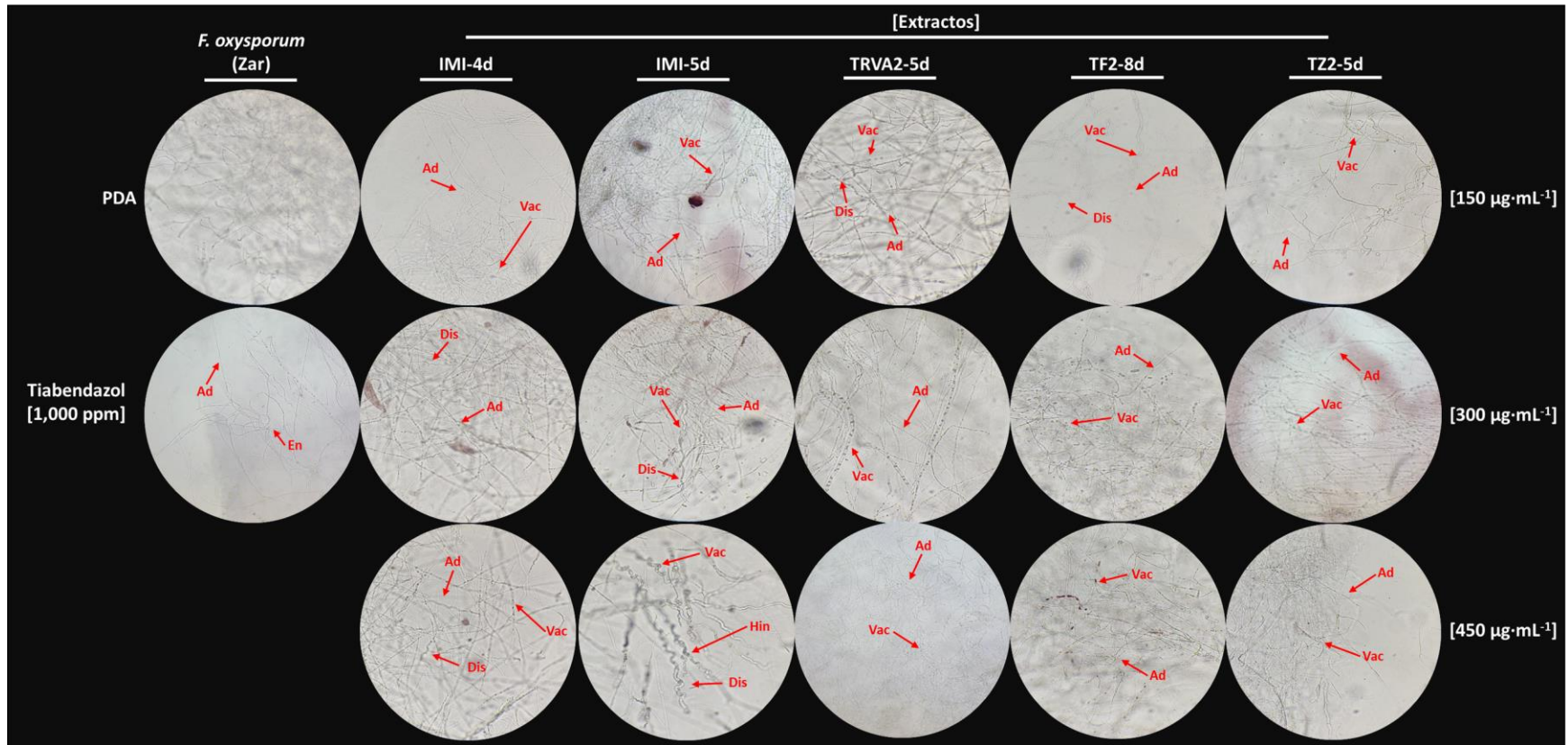


Figura 19. Efecto de los extractos crudos de *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) sobre el desarrollo de *F. oxysporum* (Zar). Micrografías representativas de los tratamientos realizados en medio PDA adicionado con los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se analizó al microscopio con el objetivo 40X. Los indicadores son los siguientes: adelgazamiento (**Ad**), hinchamiento (**Hin**), vacuolas (**Vac**), distorsión (**Dis**) y enrollamiento (**En**).

7.2.5 Efecto de los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA2) sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum* (F6 y Zar)

A partir de los efectos generados por los extractos crudos de TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum*, se seleccionaron los extractos TRVA2-5d y TF2-8d para evaluar su efecto sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum* (F6 y Zar) (Fig. 20 y 21).

La germinación de los microconidios del tratamiento control (caldo PD) de *F. oxysporum* F6 no mostraron alteraciones en su desarrollo, la germinación comenzó al cabo de las primeras 4 h, en tiempos posteriores se observó el crecimiento de éste. Los microconidios incubados con azoxystrobin con tebuconazol causaron vacuolización y distorsiones del tubo germinativo, al cabo de 12 h de incubación (Fig. 20A).

Los tubos germinativos de los microconidios crecidos con el extracto TRVA2-5d se desarrollaron al cabo de 4 h, estos eran cortos con crecimiento apical alterado, conforme pasó el tiempo los tubos germinativos se hincharon, al cabo de 12 h los microconidios desarrollaron múltiples tubos germinativos (Fig. 20A). En el tratamiento con el extracto TF2-8d a las 4 h los microconidios desarrollaron tubos germinativos con malformaciones. Adicionalmente, en tiempos posteriores de incubación la forma de los microconidios se alteró, además se desarrollaron tubos germinativos delgados y alterados, algunos incluso se lisaron (Fig. 20A).

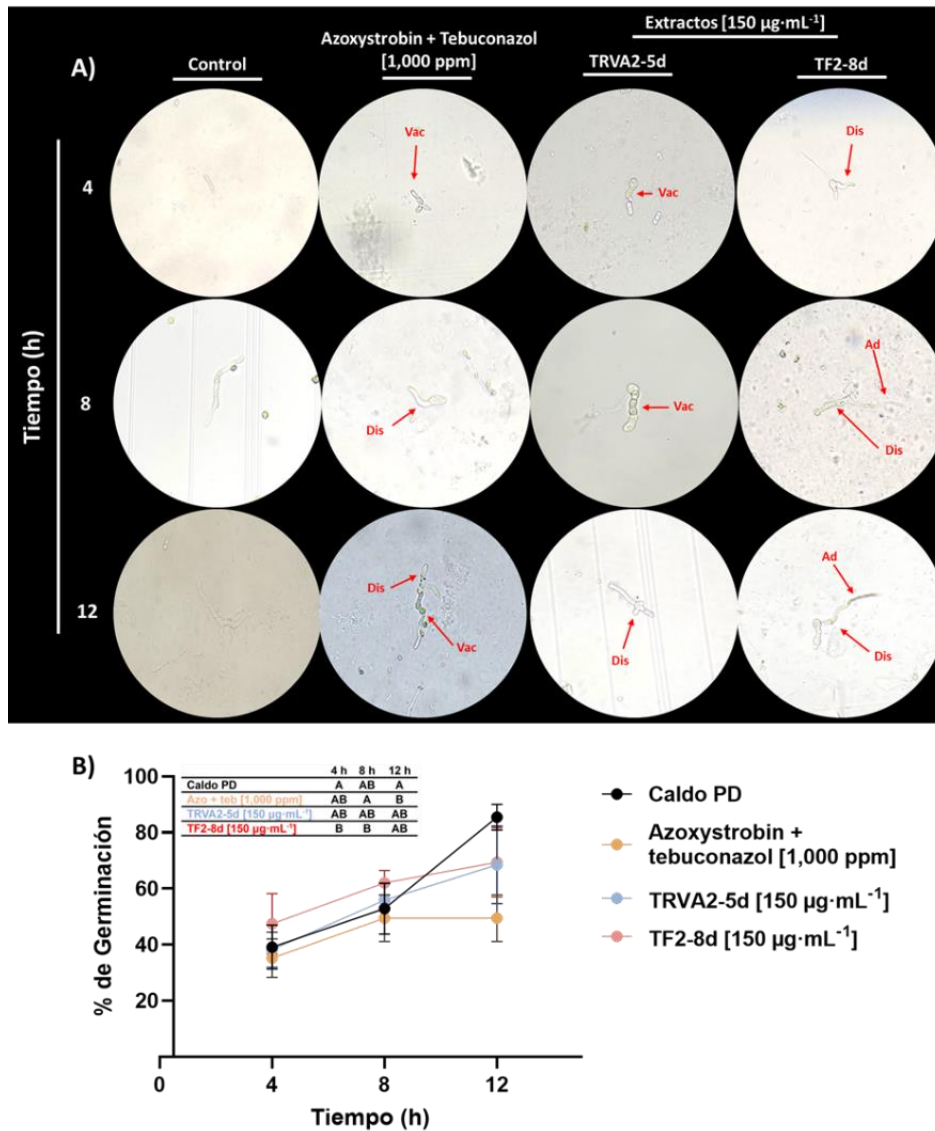


Figura 20. Germinación de microconidios de *F. oxysporum* (F6) tratados con extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA2). **A)** Micrografías representativas de los ensayos de germinación de microconidios de *F. oxysporum* F6 previamente tratados con los extractos TRVA2-5d y TF2-8d [150 µg·mL⁻¹]. **B)** Porcentaje de germinación de microconidios de *F. oxysporum* F6. Los datos mostrados en B son el promedio de una n=9 ± DE. Se realizó un análisis de normalización y varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Las letras mostradas en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes. Los indicadores son los siguientes: adelgazamiento (**Ad**), vacuolas (**Vac**) y distorsión (**Dis**).

Los microconidios de *F. oxysporum* Zar sin el tratamiento comenzaron su proceso de germinación al cabo de 4 h, y a las 12 h se observó el desarrollo de hifas. Por otro lado, el tratamiento con tiabendazol afectó el desarrollo de los tubos germinativos, a las 4 h se observó vacuolización y al cabo de 12 h se desarrollaron hifas delgadas (Fig. 21A).

Con respecto a los tratamientos: al cabo de 4 h los microconidios crecidos con el extracto TRVA2-5d mostraron tubos germinativos delgados, al cabo de 8 h se desarrollaron hifas; a las 12 h de incubación las hifas presentaron vacuolización y los microconidios alcanzaron alrededor del 80% de germinación (Fig. 21B). Por último, los tubos germinativos de los microconidios incubados con el extracto TF2-8d al cabo de 4 h presentaron malformaciones, a las 8 h se observaron tubos germinativos alargados con ramificaciones y al final del experimento los tubos germinativos fueron delgados y en algunos casos se observó lisis (Fig. 21A).

Los extractos crudos alteran el desarrollo de los tubos germinativos e hifas de los microconidios de *F. oxysporum* F6 y Zar, lo cual podría afectar su capacidad infectiva sobre su respectivo hospedero.

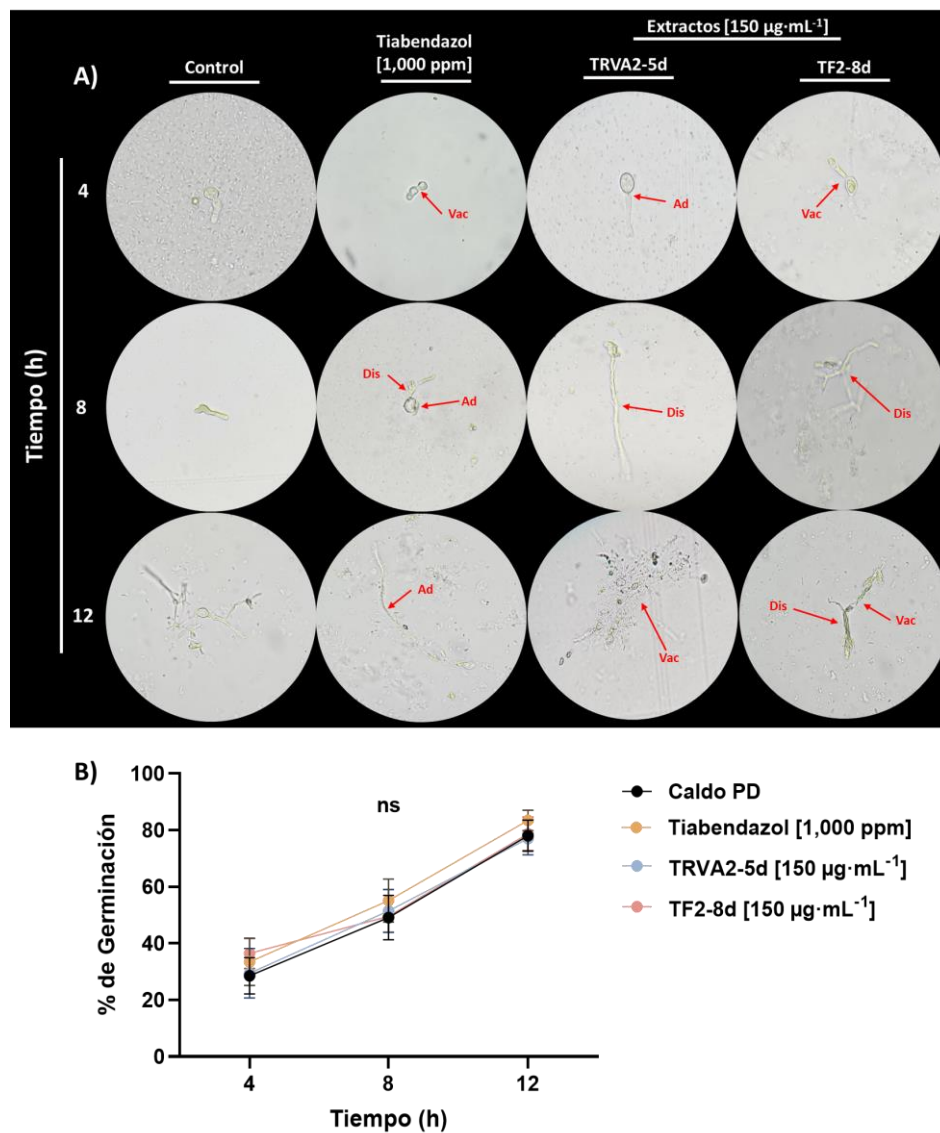


Figura 21. Germinación de microconidios de *F. oxysporum* (Zar) tratados con extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA2). A) Micrografías representativas de los

ensayos de germinación de microconidios de *F. oxysporum* Zar previamente tratados con los extractos TRVA2-5d y TF2-8d [$150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]. **B)** Porcentaje de germinación de microconidios de *F. oxysporum* Zar. Los datos mostrados en B son el promedio de una $n=9 \pm \text{DE}$. Se realizó un análisis de normalización y varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Los datos no significativos se muestran como ns. Los indicadores son los siguientes: adelgazamiento (**Ad**), vacuolas (**Vac**) y distorsión (**Dis**).

7.3. Evaluación de la capacidad de infección de *F. oxysporum* (F6 y Zar) tratado con los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA2) sobre hojas de arándano y zarzamora ex vivo

Con la finalidad de analizar si el tratamiento con los extractos crudos TRVA2-5d y TF2-8d comprometía la capacidad de infección de *F. oxysporum*, se inocularon los microconidios de F6 y Zar previamente tratados en el envés de hojas de arándano (Fig. 22A) y zarzamora (Fig. 22B), respectivamente.

Transcurrido el periodo de incubación, se analizaron las hojas de arándano para determinar el establecimiento de la infección (Fig. 22A-I). Las hojas inoculadas con los microconidios control de *F. oxysporum* F6 mostraron crecimiento mucoide sobre la superficie del envés (5 cm^2). Además, la zona de inoculación se pigmentó de rosa, color característico de *F. oxysporum* lo que indica que se logró establecer la infección (Fig. 22A-II). Por otro lado, en las hojas inoculadas con las esporas tratadas con azoxystrobin con tebuconazol se observó el crecimiento de una capa mucoide sobre la superficie (3 cm^2), y alrededor de la zona de inoculación se desarrolló micelio (Fig. 22A-III), esto indica que la infección no pudo establecerse.

Similarmente, los microconidios tratados con el extracto TRVA2-5d crecieron de manera mucoide en la superficie del envés de la hoja, el área de infección fue menor en comparación con el control (4 cm^2), la zona de infección mostró una ligera pigmentación rojiza en la zona de inoculación (Fig. 22A-IV). Por último, en las hojas inoculadas con los microconidios tratados con el extracto TF2-8d se observó pigmentación rojiza en la zona de inoculación y crecimiento mucoide con un área de cobertura de 3 cm^2 (Fig. 22A-V).

Con base en el área de infección se determinó el porcentaje de infección de *F. oxysporum* F6, el tratamiento control generó el 22% de infección, mientras que la cepa tratada con azoxystrobin con tebuconazol generó el 14% de infección. Por otro lado, las esporas tratadas con los extractos TRVA2-5d y TF2-8d infectaron el 17% y 15% de la superficie de la hoja, respectivamente (Fig. 22C).

Los resultados anteriormente descritos sugieren que los extractos crudos disminuyen la capacidad infectiva de los microconidios de *F. oxysporum* F6 sobre hojas de arándano, de manera similar al tratamiento con azoxystrobin + tebuconazol.

Con respecto a las hojas de zarzamora (Fig. 22B-I), las hojas inoculadas con los microconidios control de *F. oxysporum* Zar mostraron crecimiento micelial aéreo

blanco en la zona de inoculación (3 cm²), la cual se internalizó a través de la hoja por la nervadura principal de ésta (Fig. 22B-II). Por otra parte, en las hojas inoculadas con esporas tratadas con tiabendazol se observó disminución de la zona de infección (2 cm²), alrededor de la zona de inoculación se desarrolló micelio aéreo blanco (Fig. 22B-III).

De manera similar, las esporas tratadas con el extracto TRVA2-5d desarrollaron micelio en la superficie del envés de la hoja, el área de infección fue similar a la del control con tiabendazol (2 cm²), no se observó daño en el haz de la hoja (Fig. 22B-IV). Por último, en las hojas inoculadas con esporas tratadas con el extracto TF2-8d se observó desarrollo de micelio reproductivo en la zona de inoculación (3 cm²) en el envés de la hoja, la cual alcanzó el haz de la hoja (Fig. 22B-V).

Con base en el área de infección se determinó el porcentaje de infección de *F. oxysporum* Zar, el tratamiento control generó 10% de infección, mientras que las esporas tratadas con tiabendazol y TRVA2-5d generaron 8% de infección. Por otra parte, las esporas tratadas con TF2-5d infectaron el 15% de la superficie de la hoja (Fig. 22D). Los resultados obtenidos sugieren que los extractos crudos afectan el desarrollo de *F. oxysporum* Zar en las hojas de zarzamora.

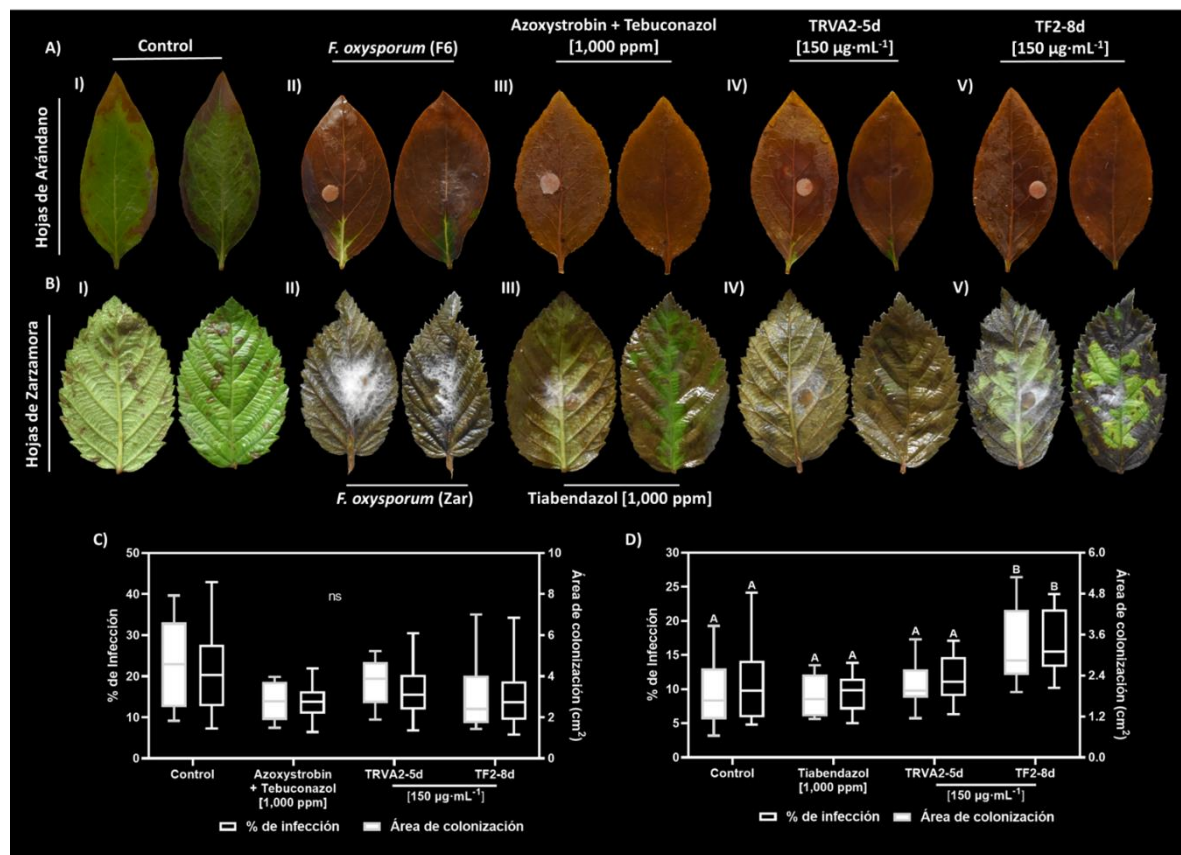


Figura 22. Evaluación de la capacidad de infección de los microconidios de *F. oxysporum* (F6 y Zar) tratados con los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA2) sobre hojas de arándano y zarzamora *ex vivo*. Fotografías representativas de los

bioensayos de infectividad. **A)** *F. oxysporum* (F6), control sin infección (**A-I**); Control hojas inoculadas con microconidios de *F. oxysporum* (F6) sin tratamiento (**A-II**); Microconidios tratados con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (**A-III**); Microconidios tratados con los extractos TRVA2-5d (**A-IV**) y TF2-8d (**A-V**) [150 µg·mL⁻¹]. **B)** *F. oxysporum* (Zar), control sin infección (**B-I**); control hojas inoculadas con microconidios de *F. oxysporum* (Zar) sin tratamiento (**B-II**); Microconidios tratados con tiabendazol [1,000 ppm] (**B-III**); Microconidios tratados con los extractos TRVA2-5d (**B-IV**) y TF2-8d (**B-V**) [150 µg·mL⁻¹]. Los incisos **C** y **D**) Porcentaje de infección y área de colonización (cm²) de microconidios de *F. oxysporum* (F6 y Zar, respectivamente). Los datos mostrados en C y D son el promedio de una n=12 ± DE. Se realizó un análisis de normalización y varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0.01$. Las letras mostradas en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes y los datos no significativos se muestran como ns.

Se observaron microscópicamente las hojas de arándano y zarzamora después del desarrollo de la infección de *F. oxysporum* F6 (Fig. 23A) y Zar (Fig. 23B). No se observaron daños en el tejido dérmico de las hojas control (no inoculadas) de F6 (Fig. 23A-I) y Zar (Fig. 23B-I).

Las esporas de *F. oxysporum* F6 no tratadas lograron infectar las hojas a través de la nervadura central (Fig. 23A-II); por otra parte, las hifas de las esporas de *F. oxysporum* F6 tratadas con azoxystrobin con tebuconazol se desarrollaron sobre la superficie de la hoja y no lograron internalizarse a través de la epidermis (Fig. 23A-III), mientras que las esporas tratadas con el extracto TRVA2-5d se internalizaron a través del tejido dérmico hasta llegar a la nervadura central de la hoja (Fig. 23A-IV). Por último, las esporas tratadas con el extracto TF2-8d solo se desarrollaron en la epidermis de la hoja, sin llegar a internalizarse a los tejidos dérmico y vasculares de las hojas (Fig. 23A-V).

La infección ocasionada por las esporas de *F. oxysporum* Zar (sin tratamiento) se estableció en la nervadura de la hoja, así como alrededor de ésta (Fig. 23B-II). Por otra parte, la capacidad infectiva de las esporas de *F. oxysporum* Zar tratadas con tiabendazol se vio afectada, ya que no se observaron hifas en el tejido epidérmico de la hoja (Fig. 23B-III), mientras que las hifas de las esporas de Zar tratadas con el extracto TRVA2-5d se internalizaron tanto en el envés como en el haz de la hoja (Fig. 23B-IV). Por último, las esporas tratadas con el extracto TF2-8d desarrollaron mayor densidad de hifas internalizadas alrededor de la nervadura central (Fig. 23B-V). Estos resultados indican que los extractos TRVA2-5d y TF2-8d alteran la capacidad infectiva de *F. oxysporum* F6 y Zar.

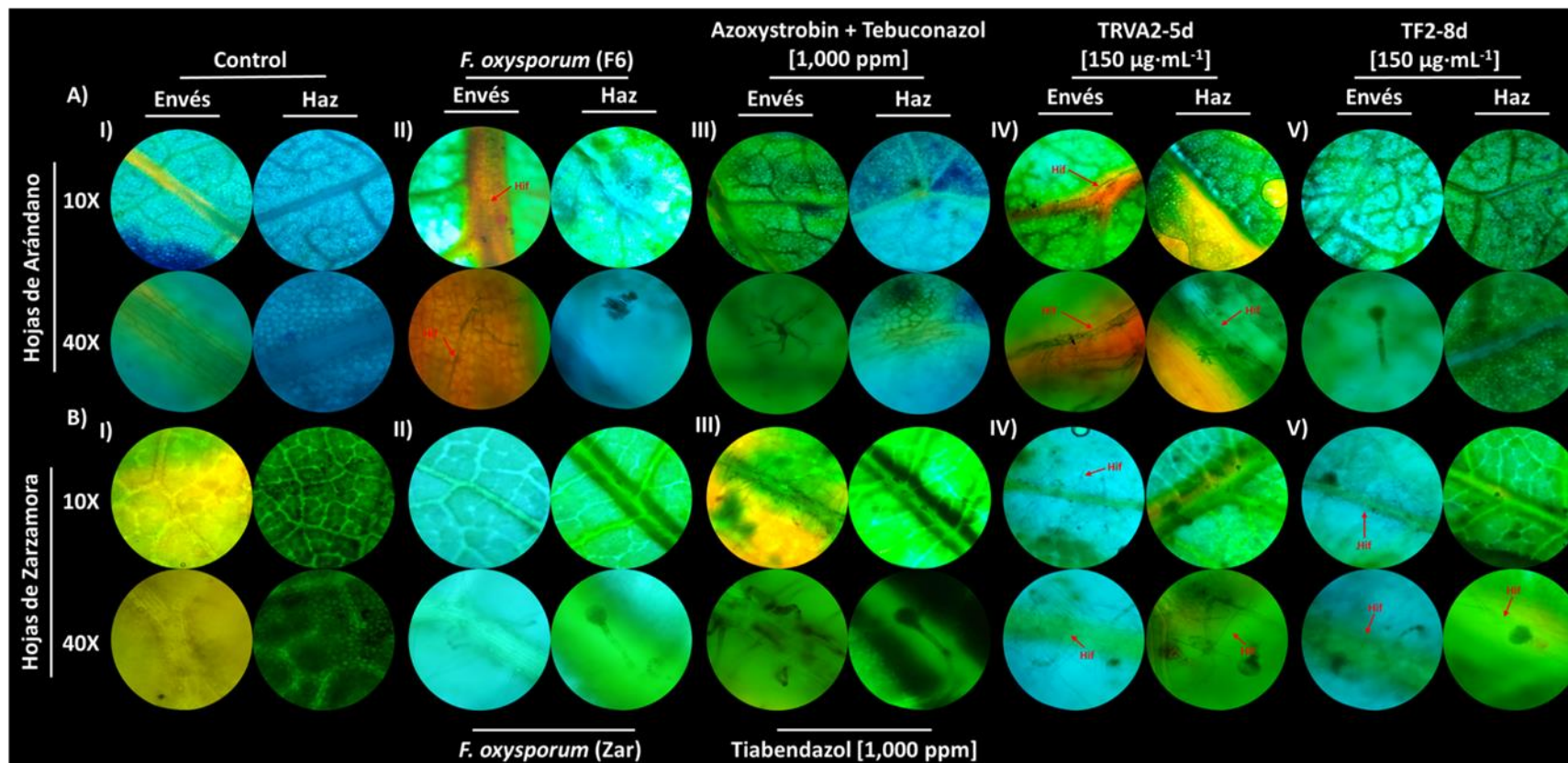


Figura 23. Evaluación microscópica de la capacidad de infección de los microconidios de *F. oxysporum* (F6 y Zar) tratados con los extractos crudos de *Trichoderma* sp. (TRVA2) sobre hojas de arándano y zaramora *ex vivo*. Micrografías representativas del envés y haz de los bioensayos de infectividad visualizados en el microscopio con los objetivos 10X y 40X. **A)** *F. oxysporum* (F6), control sin infección (**A-I**); Hojas inoculadas con microconidios de *F. oxysporum* (F6) sin tratamiento (**A-II**); Microconidios tratados con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (**A-III**); Microconidios tratados con los extractos TRVA2-5d (**A-IV**) y TF2-8d (**A-V**) [150 µg·mL⁻¹]. **B)** *F. oxysporum* (Zar), control sin infección (**B-I**); Hojas inoculadas con microconidios de *F. oxysporum* (Zar) sin tratamiento (**B-II**); Microconidios tratados con tiabendazol [1,000 ppm] (**B-III**); Microconidios tratados con los extractos TRVA2-5d (**B-IV**) y TF2-8d (**B-V**) [150 µg·mL⁻¹]. **Hif:** hifas.

8. Discusión

En México, entre los ACB que se han utilizado para el control de *Fusarium* se encuentran las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (la mayoría de estas bacterias provienen de la rizosfera de plantas de interés agrícola) y, por otra parte, los hongos de los géneros *Macrolepiota*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Irpex* y *Xylaria* (Reverchon & Sandoval, 2021). Las especies del género *Trichoderma* son los principales ACB utilizados para suprimir las enfermedades causadas por fitopatógenos. La producción de enzimas líticas, por ejemplo, quitinasas y β -1,3-glucanasas, es uno de los principales mecanismos de acción que este género posee para controlar a los hongos fitopatógenos, las cuales degradan la pared celular del patógeno (El Komy *et al.*, 2015).

El uso de la pared celular de fitopatógenos como inductores está basado en la habilidad de *Trichoderma* para reconocer la presencia de otros microorganismos, la liberación constante de enzimas líticas le permite detectar moléculas de la pared celular de otros hongos. En este sentido, Alfaro-Vargas *et al.*, (2022) observaron que la adición de pared celular de *F. oxysporum* estimuló la producción de enzimas extracelulares de *T. asperellum*. La presencia de otros microorganismos o componentes de éstos en el medio de cultivo puede activar la antibiosis, el micoparasitismo y la producción de proteínas extracelulares con propiedades antifúngicas específicas para el control de los fitopatógenos. Shakeri y Foster (2007) reportaron la producción de dos enzimas serina proteasa y quitinasa de dos cepas de *T. harzianum* 101645 y 206040, estas enzimas inhiben alrededor del 25 al 35% del crecimiento de *B. cinerea* y *F. culmorum*.

En el presente estudio se comparó la producción de PE generadas por *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) en condiciones basales y en respuesta a los inductores derivados de la inactivación térmica de *F. oxysporum* F6 y Zar, individualmente. Se observó que en condiciones basales *Trichoderma* sp. TRVA2 fue la mayor productora de PE ubicadas en un rango de 10 a 250 kDa durante los primeros 7 días (Fig. 8A), mientras que *T. atroviride* TIMI206040 produjo PEs en un rango de 10 a 75 kDa durante los 14 días (Fig. 6A); en presencia de ambos inductores (F6 y Zar) *T. atroviride* TIMI206040 produjo PEs diferenciales durante los 14 días de experimentación (Fig. 6). Por otro lado, se observó que la adición de los inductores F6 y Zar al cultivo de *Trichoderma* sp. TRVA2 estimuló la producción de PEs en diferentes periodos de incubación, el primero dentro de los 7 días de incubación (Fig. 8, Columna B) y el segundo después de este periodo (Fig. 8, Columna C). Por otro lado, la cantidad de PEs generadas por *Trichoderma* sp. TRVA1 en presencia del inductor Zar fue mayor con respecto a lo observado con *Trichoderma* sp. TRVA2 (Fig. 9, columna C). El análisis fenético de los 126 perfiles proteicos obtenidos bajo ambas condiciones (basal e inductor) reveló que

TIMI206040, TRVA1 y TRVA2 producen un perfil diferencial de PE en respuesta a los inductores (Fig. 10, 11 y 12). Algunas de las PE obtenidas podrían poseer actividad antifúngica contra *F. oxysporum* F6 y/o Zar debido a que éstas se generaron en respuesta al micelio desactivado de las cepas de *F. oxysporum*. La producción de las PE es altamente modulada por los cambios en el ambiente, la viabilidad de los nutrientes, la temperatura, el pH, la luz, etc. De igual manera la producción de las PE es dependiente del estado de desarrollo de los hongos (Vicente *et al.*, 2022).

Resultados similares fueron reportados por Ridout *et al.*, (1986), quienes demostraron que la pared celular de *R. solani* indujo la actividad de β -1,3-glucanasa y quitinasa en *T. harzianum* IMI 298372 y *T. viride*. Al evaluar el perfil proteico de ambas cepas se observó diferencia en el número total y peso molecular de las proteínas. *T. viride* fue la cepa que menor cantidad de proteínas produjo con pesos moleculares de ~45 a 66 kDa y 115 kDa, mientras que *T. harzianum* IMI 298372 produjo proteínas de ~50 a 60 kDa y ~132 a 186 kDa. Esto sugiere que hay una producción diferencial de proteínas dependiente de las especies del género *Trichoderma*. Sin embargo, el tipo de función enzimática predominante de las proteínas secretadas por *Trichoderma* depende del fitopatógeno empleado como lo demostraron Qualhato *et al.*, (2013); quienes analizaron la producción de PE de *Trichoderma* spp. en respuesta a la pared celular de *S. sclerotiorum*, *F. solani* y *R. solani*, y observaron que la pared celular de *F. solani* favoreció la producción de proteasas, las cuales pueden romper la pared celular o actuar como inactivadores proteolíticos de enzimas producidas por patógenos.

Debido a que la exposición de *Trichoderma* a la pared celular de los hongos fitopatógenos induce la producción de diferentes proteínas extracelulares, se analizó la actividad antifúngica de 18 extractos crudos producidos por *T. atroviride* (TIMI206040) y *Trichoderma* sp. (TRVA1 y TRVA2) en respuesta a los inductores F6 y Zar, sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum* F6 y Zar resistente a fungicidas químicos. Los extractos IMI-4d, IMI-5d, TRVA2-5d y TF2-8d inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* F6 y Zar, por otra parte, los extractos TF1-12d y TZ1-13d solamente inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* F6 y el extracto TZ2-5d inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* Zar, los porcentajes de inhibición de los extractos oscilaron entre el 25% al 65%, la exposición a dichos extractos generó vacuolización, adelgazamiento, hinchamiento y lisis de las hifas de ambas cepas, lo cual indica que los extractos crudos contienen proteínas o enzimas con potencial antifúngico (Fig. 13, 16, 18, 20).

Los fenotipos microscópicos observados pueden ser ocasionados por la exposición a proteínas con diferentes actividades enzimáticas. En este sentido, da Costa *et al.*, (2021), analizaron las enzimas hidrolíticas producidas por *T. piluliferum*, estas enzimas indujeron la fragmentación, vacuolización, enrollamiento y distorsión de las de hifas *Colletotrichum musae*. De manera similar, la quitinasa (30.8 kDa) aislada

de *Phaseolus mungo* indujo el desarrollo de las hifas hinchadas y distorsionadas de *F. solani* y *F. oxysporum* (Ye & Ng, 2005). Además, la combinación de quitinasas y β -1,3 glucanasas promueven la lisis y distorsión de las hifas de los hongos fitopatógenos, como lo demostraron *Ruangwong et al.* (2021a) al emplear el filtrado de *T. koningiopsis* PSU3-2 el cual indujo la lisis de las hifas de *C. gloeosporioides*. Con base en los fenotipos observados los extractos crudos producidos por las cepas de *Trichoderma* (TIMI206040, TRVA1 y TRVA2) obtenidos en respuesta a los inductores F6 y Zar podrían contener proteínas o familias de enzimas degradadoras de la pared celular.

Con base en el porcentaje de inhibición del crecimiento y los efectos microscópicos del escrutinio se seleccionaron siete extractos crudos con potencial antifúngico y se analizó el efecto de la concentración de los extractos crudos ($150\text{-}450\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum* F6 y Zar. Los extractos crudos no generaron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial radial significativos entre las cepas de *F. oxysporum* (Fig. 17 y 19). Sin embargo, la exposición a los extractos generó vacuolización, adelgazamiento, hinchamiento y lisis de las hifas de *F. oxysporum* (Fig. 18 y 20). Por otra parte, se observaron alteraciones en la pigmentación de las colonias de *F. oxysporum* al incrementar la concentración de los extractos TRVA2-5d y TF2-8d de 150 a $450\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la pigmentación de las colonias de *F. oxysporum* F6 se intensificó, mientras que la pigmentación de las colonias de *F. oxysporum* Zar disminuyó. Los datos sugieren que no solamente las PEs de los extractos crudos afectan el desarrollo de *F. oxysporum*, sino que alteran la pigmentación y, por consiguiente, la producción de micotoxinas, las cuales facilitan el establecimiento de la infección en el hospedero al abatir los mecanismos de defensa de éstos (Tian *et al.*, 2016).

La pigmentación es parte del crecimiento de los hongos filamentosos y puede ser usado como una herramienta para el estudio del ciclo de vida de los fitopatógenos (Cambaza, 2018). Las especies de *Fusarium* producen diferentes pigmentos como antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftaquinona, carotenoides, compuestos fenólicos, pirroles y derivados de azapilona, además de las micotoxinas bikaverina, aurofusarina, etc. (Abdel-Azeem *et al.*, 2019; Afroz Toma *et al.*, 2023). La producción de pigmentos de *Fusarium* depende de las condiciones de crecimiento y también se producen en respuesta al estrés (Cambaza, 2018; Medentsev, *et al.* 2005). Dentro de las micotoxinas más comunes del género *Fusarium* se incluyen a los tricotecenos (deoxivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearelenona (ZEN)), el DON es una de las principales micotoxinas producidas por *F. graminearum*, la cual es reconocida como el principal factor que facilita el desarrollo de la infección de los tejidos vegetales (Tian *et al.*, 2016), su producción está regulada por el sistema tiorredoxina, la cual comprende tiorredoxina reductasa (TRR), tiorredocin (TRX) y NADPH, este sistema regula la síntesis de metionina, el crecimiento celular y la apoptosis. Fan *et al.*, (2019) reportaron que la eliminación de los genes de TRR de *F. graminearum* (FgTRR) redujo la tasa de germinación de conidios, el crecimiento

de las hifas y la integridad de la pared celular. Con base en los fenotipos generados en respuesta a los extractos crudos TRVA2-5d y TF2-8d, éstos podrían afectar el sistema tiorredoxina de *F. oxysporum* F6 y Zar.

El control biológico de *F. oxysporum* y la degradación del DON son parte importante del manejo integrado de enfermedades, lo cual minimiza el impacto de este fitopatógeno sobre sus hospederos (Schöneber *et al.*, 2015). Para degradar las micotoxinas se han utilizado las enzimas que son capaces de romper los enlaces de los pigmentos. En este sentido, Tian *et al.*, (2019) identificaron la enzima UDP-glucosiltransferasa (UGs) en *Trichoderma*, esta enzima cataliza la glicosilación del DON a deoxyvalenol-3-glucósido en *F. graminearum* 5053. Por otra parte, *T. afroharzianum* T22 produce proteínas con pesos moleculares de 60-90 kDa, como peroxidasa, quitinasas, β -1,3 glucanasas y fenilalanina amonio-liasa, las cuales son capaces de oxidar las aflatoxinas B1 y ocratoxina de *A. parasiticus* y *A. flavus*, respectivamente; en moléculas polares y menos tóxicas, además de generar un cambio en la pigmentación (Dini *et al.*, 2022). Los pigmentos fúngicos se producen para desempeñar funciones en respuesta a las condiciones ambientales como la protección a la luz ultravioleta (UV), los agentes oxidante, la privación de nutrientes, etc. Estos pigmentos cumplen la función de protección para evitar que el micelio se hidrolizado por enzimas producidas por otro microorganismos (Lin & Xu, 2022). El género *Fusarium* sp. produce antraquinonas y naftoquinonas, las cuales son inducidas por factores de estrés abiótico y biótico, al igual que la melanina (Medentsev & Akimenko, 1998). En este sentido, Kou & Alexander (1967) demostraron que la presencia de melanina en hifas de *A. nidulans* ayudan a la resistencia a la degradación por enzimas quitinasas y β -1,3 glucanasas, los autores proponen que la melanina forma una barrera a partir de los precursores de este, los cuales inhiben las enzimas hidrolíticas. Las PEs obtenidas en este estudio pudieran contener enzimas esterases, liasas o aminotransferasas, ya que, éstas alteraron la pigmentación de *F. oxysporum*.

Debido a los efectos microscópicos inducidos en las colonias de *F. oxysporum* por la exposición a los extractos TRVA2-5d y TF2-8d, se analizó su efecto sobre la germinación de los conidios de *F. oxysporum*. No hubo diferencias significativas entre los extractos y los fungicidas químicos sobre el porcentaje de germinación de *F. oxysporum*. En este sentido, los extractos crudos y los fungicidas químicos indujeron el adelgazamiento, distorsión, vacuolización y lisis de los tubos germinativos al cabo de 4 h de incubación (Fig. 21-22). Estos datos sugieren que los extractos crudos generan efectos similares a los ocasionados por el tratamiento con los fungicidas químicos. Wang *et al.*, (2023) analizaron el transcriptoma durante las primeras 48 h de crecimiento de *T. harzianum* T4 en presencia de pared celular de *B. cinerea* y encontraron que los genes que codifican para las enzimas hidrolasas, quitinasas, celulasas, glicotransferasas y proteasas aumentaron significativamente en comparación al control, estas enzimas participan durante el proceso de micoparasitismo y la sobre-regulación de estos genes, indujo la

producción de estas enzimas, las cuales inhibieron la germinación de conidios y el crecimiento micelial de *B. cinerea*, razón por la cual se considera que los extractos crudos evaluados en el presente trabajo podrían contener enzimas hidrolíticas.

Los fenotipos obtenidos del tratamiento con los extractos crudos son similares a los reportados por Lorito *et al.*, (1993) quienes determinaron que el tratamiento con endoquitinasas y quitobiosidasa afecta negativamente el desarrollo de los tubos germinativos de *F. solani*, las endoquitinasas a $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indujeron la lisis de los tubos germinativos, mientras que la quitobiosidasa a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indujo necrosis. De manera similar las enzimas quitinasas y β ,1-3 glucanasas producidas por *T. asperellum* afectaron la germinación de los conidios de *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi* y *F. cantenulatum*, aunque no se descarta la participación de otro tipo de proteínas. Por último, las quitinasas contenidas en los extractos libres de células de tres ACB comerciales (Mycostop®, Xedavir® y Polyversum®) inhibieron el 50% y 100% de germinación de *F. graminearum* BRFM 1967 y *F. verticillioides* BRFM 2251 al cabo de 12 h, respectivamente (Pellan *et al.*, 2020). Las PE de los extractos crudos afectaron el desarrollo de los tubos germinativos, estos efectos podrían afectar la capacidad infectiva de *F. oxysporum* y evitar así el desarrollo de la enfermedad.

Con base en los efectos generados por los extractos crudos sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum*, se analizó su capacidad de infección. Los extractos crudos (TRVA2-5d y TF2-8d) y el tratamiento con azoxystrobin con tebuconazol indujeron el crecimiento dimórfico de *F. oxysporum* F6 sobre la superficie de la hoja de arándano (Fig. 23A). El porcentaje de infección de la superficie de *F. oxysporum* F6 tratado con azoxystrobin con tebuconazol y los extractos crudos fue de alrededor del 10% al 15% del área total de la hoja; además, no se apreciaron lesiones sobre el tejido vegetal. En este sentido, Michielse *et al.*, (2009) reportaron que el crecimiento dimórfico encargado de la patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) está regulado por la proteína Sge1 codificada por el gen *SGE1* (gen de expresión *SIX1*), la eliminación de genes *SIX* de las mutantes de *Fol* causan principalmente un fenotipo no patogénico completo, debido a la incapacidad de suprimir la respuesta de defensa del huésped. Los PE afectaron la patogenicidad de *F. oxysporum* F6 al modular el crecimiento dimórfico, esto afectó el desarrollo en la superficie de la hoja de arándano.

En el caso de *F. oxysporum* Zar se obtuvo un porcentaje de infección de la superficie de la hoja del 10% al 20%, se observó que a diferencia de *F. oxysporum* F6, las esporas tratadas con tiabendazol y TF2-8d se internalizaron en el tejido vegetal hasta llegar al haz de la hoja (Fig. 23B-III y V), mientras que las esporas de *F. oxysporum* Zar tratadas con TRVA2-5d sólo se desarrollaron en la zona de inoculación (Fig. 23B-IV) estos resultados sugieren que los extractos podrían afectar la vía de señalización MAP cinasa (Di Pietro *et al.*, 2001). Tras la germinación, los hongos liberan cutinasas extracelulares, enzimas capaces de

hidrolizar la cutina cerosa que recubre la planta, lo cual permite el acceso del patógeno, incluso *F. solani* f. sp. *pisi* almacena cutinasas en las esporas lo cual facilita el contacto y la germinación de éstas (Kolattukudy *et al.*, 1995). Las PE contenidas en los extractos crudos podrían inhibir la producción de cutinasas, esto es debido a que se observó que las esporas de *F. oxysporum* F6 no hidrolizaron la capa cerosa de las hojas; sin embargo, las esporas de *F. oxysporum* Zar tratadas con los TF2-8d no perdieron esta capacidad, esto podría deberse a que las PE no inhibieron la producción de cutinasas. Con base en los fenotipos observados en el presente trabajo, las PE contenidas en los extractos alteran la germinación, el crecimiento y desarrollo, así como la capacidad de infección de las cepas de *F. oxysporum* F6 y Zar.

9. Conclusión

Las proteínas extracelulares producidas por *Trichoderma* sp. TRVA1 y TRVA2 en respuesta al micelio desactivado térmicamente de *F. oxysporum*, poseen potencial biotecnológico que afecta la germinación de las esporas, el desarrollo y estructura de las hifas *F. oxysporum* resistente a fungicidas químicos.

10. Perspectivas

- Caracterizar las proteínas extracelulares obtenidas de *Trichoderma* sp. TRVA1 y TRVA2 en respuesta a los inductores *F. oxysporum* F6 o Zar.
- Evaluar los mecanismos de acción de las proteínas extracelulares producidas por *Trichoderma* sp. TRVA1 y TRVA2 sobre el desarrollo de *F. oxysporum*.
- Evaluar las proteínas extracelulares de *Trichoderma* sp. TRVA1 y TRVA2 sobre el crecimiento y desarrollo de otros fitopatógenos.

11. Anexos

11.1 Curva de calibración de albumina de suero bovino

Se preparó una muestra patrón de albumina de suero bovina (BSA) a 1 mg·mL⁻¹. Posteriormente se realizaron las diluciones de acuerdo con la tabla siguiente:

Viales	BSA (μL=μg)	Solución D (μL)	Folin (μL)
1	0	1000	50
2	5	995	50
3	10	990	50
4	20	980	50
5	30	970	50
6	40	960	50
7	50	950	50
8	60	940	50
9	70	930	50
10	80	920	50
11	90	910	50
12	100	900	50

11.2 Antibiograma

Se usó el método de placa de ELISA de 96 pozos modificado de Troskie *et al.*, (2012), para esto se utilizaron seis concentraciones de microconidios de *F. oxysporum* (F6 o Zar) 250, 500, 750, 1,000, 1,250 y 1,500, las cuales se inocularon en medio PDA y medio PDA suplementado con agroquímicos (azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (F6) o tiabendazol [1,000 ppm] (Zar)), se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Multiskan GO 100-240 V, 50/60 Hz ThermoFischer Scientific cada 24 h por 96 h (Fig. 24).

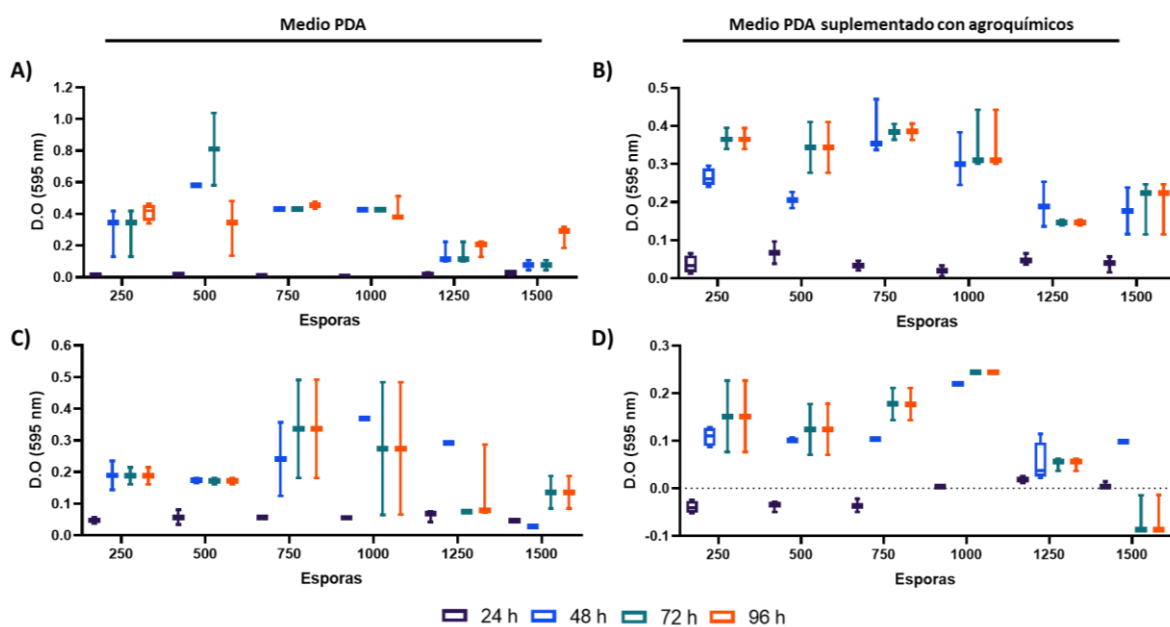


Figura 24. Cinética de germinación de microconidios de *F. oxysporum* (F6 y Zar). Se inocularon microconidios de *F. oxysporum* en medio PDA (control): **A-C)** F6 y Zar, respectivamente; y **B-D)** en medio PDA suplementado con azoxystrobin con tebuconazol [1,000 ppm] (F6) o tiabendazol [1,000 ppm] (Zar), respectivamente. La germinación se midió cada 24 h durante 96 h en un espectrofotómetro a 595 nm. Los datos en el gráfico representan el promedio de una $n=8 \pm DE$.

12. Referencias

- Abdel-Azeem, A. M., Abdel-Azeem, M. A., Darwish, A. G., Nafady, N. A., & Ibrahim, N. A. (2019). *Fusarium*: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications. En *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (pp. 201–261). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_6
- Afroz Toma, M., Rahman, M. H., Rahman, M. S., Arif, M., Nazir, K. H. M. N. H., & Dufossé, L. (2023). Fungal pigments: Carotenoids, riboflavin, and polyketides with diverse applications. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 9(4), 454. <https://doi.org/10.3390/jof9040454>
- Alfaro-Vargas, P., Bastos-Salas, A., Muñoz-Arrieta, R., Pereira-Reyes, R., Redondo-Solano, M., Fernández, J., Mora-Villalobos, A., & López-Gómez, J. P. (2022). Peptaibol production and characterization from *Trichoderma asperellum* and their action as biofungicide. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 8(10), 1037. <https://doi.org/10.3390/jof8101037>
- Aneberries, A. C. (2021). Lista de Plaguicidas 2021-2022.
- Antracnosis en mora. (2020, October 15). Invesa - La Compañía Amiga. <https://www.invesa.com/product/antracnosis-en-mora/>
- Así puedes salvar tus cultivos de arándanos de la Alternaria. (2018, July 4). Solagro. <https://solagro.com.pe/blog/asi-puedes-salvar-tus-cultivos-de-arandanos-de-la-alternaria/>
- Asmekash, T., Mulatu, A., Melesse, A., & Alemu, T. (2022). Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates against *Fusarium* wilt disease (*Fusarium oxysporum vasinfectum*) of cotton plant (*Gossypium herbaceum*) under in-vitro condition. *Ethiopian Journal of Biological Sciences*, 21(1), 55–67.
- Bae, S.-J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Hong, S.-B., Seo, H., Bae, D.-W., Bae, I., Kim, J.-J., & Bae, H. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological control: theory and applications in pest management*, 92, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Baibakova, E. V., Nefedjeva, E. E., Suska-Malawska, M., Wilk, M., Sevriukova, G. A., & Zheltobriukhov, V. F. (2019). Modern fungicides: Mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. *Annual research & review in biology*, 1–16. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v32i330083>
- Bárcenas-Santana, D., Guillén-Sánchez, D., Yazmín-Basaldúa, C., Ramos-García, M. D. L., & Valle-De La Paz, M. (2019). Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria*

spp.) en Morelos, México. *Revista mexicana de fitopatología*. 37, 454–463. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-5>

Berry, V. (2011). Production and Marketing Conference. The Future of Berries in the USA. Petersburg, Virginia, United States.

Bhaduri, S. A. U. M. Y. A., & Demchick, P. H. (1983). Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies. *Applied and environmental microbiology*, 46(4), 941-943.

Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology spectrum*, 4(6), 4-6.

Botrytis en mora. (2020, October 15). Invesa - La Compañía Amiga. <https://www.invesa.com/product/botrytis-en-mora/>

Cambaza, E. (2018). Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. *Foods* (Basel, Switzerland), 7(10), 165. <https://doi.org/10.3390/foods7100165>

Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. *Agronomy*, 9(3), 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>

Coninck, E., Scaufaire, J., Gollier, M., Liénard, C., Foucart, G., Manssens, G., Munaut, F., & Legrève, A. (2020). *Trichoderma atroviride* as a promising biocontrol agent in seed coating for reducing *Fusarium* damping-off on maize. *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 637–651. <https://doi.org/10.1111/jam.14641>

Contreras-Pérez, M., Santoyo-Pizano, G., De los Santos-Villalobos, S., Gutiérrez-García, M. A., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Rocha-Granados, M. D. C. (2019). Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología: La Revista Oficial de La Sociedad Mexicana de Fitopatología*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1905-4>

Coronel, C. (2022). Control biológico de *Fusarium solani* resistente a fungicidas con cepas de *Trichoderma* spp.: Una alternativa agroecológica para el cultivo de fresa en Puebla.

da Costa, A. C., de Miranda, R. F., Costa, F. A., & Ulhoa, C. J. (2021). Potential of *Trichoderma piluliferum* as a biocontrol agent of *Colletotrichum musae* in banana fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34(102028), 102028. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102028>

de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), S. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030.

de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), S. (2021). Panorama agroalimentario 2021 [Data set].

de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial, D. (n.d.). Panorama Agroalimentario Berries 2016.

Dekker, J. (2018). The fungicide resistance problem: Current status and the role of systemics. En *Pesticide Interactions in Crop Production* (pp. 163–180). CRC Press.

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(71)80077-3)

Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Mègelecz, E., & Roncero, M. I. G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1140–1152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02307.x>

Díaz-Gutiérrez, C., Arroyave, C., Llugany, M., Poschenrieder, C., Martos, S., & Peláez, C. (2021). *Trichoderma asperellum* as a preventive and curative agent to control *Fusarium* wilt in *Stevia rebaudiana*. *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management*, 155(104537), 104537. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104537>

Dini, I., Alborino, V., Lanzuise, S., Lombardi, N., Marra, R., Balestrieri, A., Ritieni, A., Woo, S. L., & Vinale, F. (2022). *Trichoderma* enzymes for degradation of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(12), 3959. <https://doi.org/10.3390/molecules27123959>

Dominik Hepperle, D. H. (2005). GelQuest and ClusterVis (Nº de versión 3.5.5.0). Windows. Alemania: SequentiX.

Dubey, S. C., Suresh, M., & Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management*, 40(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.006>

El Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., & Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal*, 31(1), 50–60. <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.09.2014.0087>

Emanuel, R.-V., César Arturo, P.-U., Lourdes Iveth, M.-R., Homero, R. de la C., & Mauricio Nahuam, C.-A. (2020). In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 10(8), 329. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>

Fan, X., He, F., Ding, M., Geng, C., Chen, L., Zou, S., Liang, Y., Yu, J., & Dong, H. (2019). Thioredoxin Reductase Is Involved in Development and Pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Frontiers in microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00393>

Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G. R., Gómez-Dorantes, N., & Gregorio-Cipriano Mr Y Fernández-Pavía, Y. L. (2012). Enfermedades en plantas en el estado de Michoacán. *Biológicas*, 14(2), 75–89.

Figueroa S, D., Guerrero C, J., & Bensch T, E. (2010). Efecto DE momento DE cosecha y permanencia en Huerto sobre la incidencia DE hongos DE poscosecha en arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.), cvs. Berkeley, Brigitta y Elliott Durante la temporada 2005-2006. *Idesia*, 28(2). <https://doi.org/10.4067/s0718-34292010000200002>

Fraç, M., Gryta, A., Oszust, K., & Kotowicz, N. (2016). Fast and accurate microplate method (Biolog MT2) for detection of *Fusarium* fungicides resistance/sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 489. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00489>

Fuentes Rojas, B. (2020). Competitividad de las empresas mexicanas exportadoras de berries; un estudio de ventaja comparativa revelada con EUA, España y Países Bajos, 2001-2018.

Fungicide Resistance ACtion Committee (FRAC) España. (2019). Clasificación de Fungicidas y Bactericidas según el Modo de Acción.

Ghazanfar, M. U., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M. I. (2018). *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, 2(3).

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Herrera Arteaga, I., Pérez Pérez, R., Soria Leal, L. and Chávez Avilés, M., 2020. Potencial antagonista de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de Los Azufres, Michoacán, sobre el crecimiento de cepas de *Fusarium oxysporum* resistentes a fungicidas químicos. Licenciatura. Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad Hidalgo.

Husaini, A. M., Sakina, A., & Cambay, S. R. (2018). Host-pathogen interaction in *Fusarium oxysporum* infections: Where do we stand? *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 31(9), 889–898. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0302-CR>

InfoAgro (Ed.). (2021). Cultivo de fresa en México: Vol. Julio-Agosto 2021. Informativo Agrícola de México S.A. de C.V.

InfoAgro (Ed.). (2022). Cultivo de berries en México: Vol. Marzo-Abril 2022. Informativo Agrícola de México S.A. de C.V.

Integrado, E. y. M. (n.d.). La marchitez de la zarzamora. Gospaorganics.com. Retrieved November 18, 2023, from https://gospaorganics.com/Documentos/Marchitez_Zarza_ElectronicV_c.pdf

Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167-180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>

Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S., & Flaishman, M. A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4080–4087. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4080>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.

Lin, L., & Xu, J. (2022). Production of fungal pigments: Molecular processes and their applications. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(1), 44. <https://doi.org/10.3390/jof9010044>

Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., & Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83(3), 302–307.

Lowry, H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). 195 1. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265–275.

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. In *Advances in Applied Microbiology* (pp. 29–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

Malandrakis, A., Daskalaki, E. R., Skiada, V., Papadopoulou, K. K., & Kavroulakis, N. (2018). A *Fusarium solani* endophyte vs fungicides: Compatibility in a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-tomato pathosystem. *Fungal biology*, 122(12), 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.10.003>

Marques, E., Martins, I., & Mello, S. C. M. de. (2018). Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica*, 18(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0418>

Medentsev, A. G., & Akimenko, V. K. (1998). Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*, 47(6), 935–959. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)80053-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)80053-8)

Michielse, C. B., van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E. M. M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C., & Rep, M. (2009). The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000637. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000637>

Olivet, J. J., Villalba, J., & Schenzer, D. (Eds.). TECNOLOGÍA DE APLICACIÓN DE AGROQUÍMICOS EN CULTIVOS EXTENSIVOS. FPTA, (53), 3.

Panorama Agroalimentario | Berries 2016. (s/f). Gob.mx. Recuperado el 19 de enero de 2022, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200633/Panorama_Agroalimentario_Berries_2016.pdf

Pei, S., Liu, R., Gao, H., Chen, H., Wu, W., Fang, X., & Han, Y. (2020). Inhibitory effect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*. *Postharvest Biology and Technology*, 163(111126), 111126. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111126>

Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., & Strub, C. (2020). Commercial biocontrol agents reveal contrasting compartments against two mycotoxigenic fungi in cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. *Toxins*, 12(3), 152. <https://doi.org/10.3390/toxins12030152>

Pincot, D. D., Feldmann, M. J., Hardigan, M. A., Vachev, M. V., Henry, P. M., Gordon, T. R., ... & Knapp, S. J. (2021). Novel *Fusarium* Wilt Resistance Genes Uncovered in the Wild Progenitors and Heirloom Cultivars of Strawberry. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.07.471687>

Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461–1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>

Reverchon, Frédérique, & Diyarza Sandoval, N. A. (2021). Potenciales agentes de control biológico contra *Fusarium* spp. en México: situación actual, retos y perspectivas. <https://doi.org/10.57737/BIOTECNOLOGIAYSUST.V6I2.1105>

Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R., & Lynch, J. M. (1986). Enzyme Activity and Electrophoretic Profile of Extracellular Protein Induced in *Trichoderma* spp. by Cell Walls of *Rhizoctonia solani*. *Microbiology (Reading, England)*, 132(8), 2345–2352. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-8-2345>

Rojas, E. C., Jørgensen, H. J., Jensen, B., & Collinge, D. B. (2018). *Fusarium* diseases: biology and management perspectives University of Copenhagen, Denmark. En Integrated disease management of wheat and barley (pp. 43–66). Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/AS.2018.0039.02>

Ruangwong, O.-U., Pornsuriya, C., Pitija, K., & Sunpapao, A. (2021). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against postharvest anthracnose of chili pepper. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 7(4), 276. <https://doi.org/10.3390/jof7040276>

Ruangwong, O.-U., Wonglom, P., Phoka, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S.-I., & Sunpapao, A. (2021). Biological control activity of *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 against gummy stem blight in muskmelon (*Cucumis melo*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115(101663), 101663. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101663>

Saint-Vincent, P. M., Ridout, M., Engle, N. L., Lawrence, T. J., Yeary, M. L., Tschaplinski, T. J., Newcombe, G., & Pelletier, D. A. (2020). Isolation, Characterization, and Pathogenicity of Two *Pseudomonas syringae* Pathovars from *Populus trichocarpa* Seeds. *Microorganisms*, 8(8), 1137. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081137>

Savita, & Sharma, A. (2019). Fungi as biological control agents. In *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment* (pp. 395–411). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_18

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Schöneberg, A., Musa, T., Voegelé, R. T., & Vogelgsang, S. (2015). The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1165–1179. <https://doi.org/10.1111/jam.12775>

Shabeer, S., Tahira, R., & Jamal, A. (2021). *Fusarium* spp. Mycotoxin Production, Diseases and their Management: An Overview. *Pakistan journal of agricultural research*, 34(2). <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2021/34.2.278.293>

Sharma, A. K., & Sharma, P. (2020). *Trichoderma*. Springer Singapore.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>

Sun, H.-Y., Zhu, Y.-F., Liu, Y.-Y., Deng, Y.-Y., Li, W., Zhang, A.-X., & Chen, H.-G. (2014). Evaluation of tebuconazole for the management of *Fusarium* head blight in

China. Australasian Plant Pathology: APP, 43(6), 631–638.
<https://doi.org/10.1007/s13313-014-0309-4>

Sunčica, K. T., Gordana, D., Jelena, L., Ilija, T., & Danijela, T. (2011). Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species. African journal of biotechnology, 10(50), 10188–10195. <https://doi.org/10.5897/ajb11.1330>

Tian, Y., Tan, Y., Liu, N., Yan, Z., Liao, Y., Chen, J., de Saeger, S., Yang, H., Zhang, Q., & Wu, A. (2016). Detoxification of Deoxynivalenol via Glycosylation Represents Novel Insights on Antagonistic Activities of *Trichoderma* when Confronted with *Fusarium graminearum*. Toxins, 8(11), 335. <https://doi.org/10.3390/toxins8110335>

Troskie, A. M., Vlok, N. M., & Rautenbach, M. (2012). A novel 96-well gel-based assay for determining antifungal activity against filamentous fungi. Journal of Microbiological Methods, 91(3), 551–558.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.025>

Vicente, I., Baroncelli, R., Hermosa, R., Monte, E., Vannacci, G., & Sarrocco, S. (2022). Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in *Trichoderma* ecophysiology. Fungal Biology Reviews, 39, 83–99.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.12.004>

Wang, S.-Q., Ma, J., Wang, M., Wang, X.-H., Li, Y.-Q., & Chen, J. (2019). Combined application of *Trichoderma harzianum* SH2303 and difenoconazole-propiconazole in controlling Southern corn leaf blight disease caused by *Cochliobolus heterostrophus* in maize. Journal of Integrative Agriculture, 18(9), 2063–2071.
[https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(19\)62603-1](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(19)62603-1)

Wang, Y., Zhu, X., Wang, J., Shen, C., & Wang, W. (2023). Identification of Mycoparasitism-Related Genes against the Phytopathogen *Botrytis cinerea* via Transcriptome Analysis of *Trichoderma harzianum* T4. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 9(3), 324. <https://doi.org/10.3390/jof9030324>

Yang HH, Yang SL, Peng KC, Lo CT, Liu SY (2009) Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. Mycol Res 113(9):924–932.
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.004>

Ye, X., & Ng, T. B. (2005). A chitinase with antifungal activity from the mung bean. Protein Expression and Purification, 40(2), 230–236.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.06.032>

Yuan, J., Wen, T., Zhang, H., Zhao, M., Penton, C. R., Thomashow, L. S., & Shen, Q. (2020). Predicting disease occurrence with high accuracy based on soil macroecological patterns of *Fusarium* wilt. The ISME Journal, 14(12), 2936-2950.
<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0720-5>

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

Zhang, F., Yang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS microbiology letters*, 359(1), 116-123. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12582>

Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>