



Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas

Selecting strains of *Trichoderma* spp. generating secondary metabolites of interest for use as a growth promoter in plants grown

Ortuño Noel^{1*}, Miranda Claudia², Claros Mayra¹

Datos del Artículo

¹Fundación PROINPA, Bolivia.

²Facultad de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Bioingeniería, USIP, Cochabamba
clauapa_cruz@hotmail.com

*Dirección de contacto:

Noel Oruño
Fundación PROINPA, Casilla 4285, Cochabamba, Bolivia, Telf. (591) 44319595, Fax (591) 44319600.
E-mail address:
nortuno@prompa.org

Palabras clave:

Trichoderma spp., metabolitos secundarios, hongo promotor de crecimiento en plantas, enfrentamientos duales, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus*.

J Selva Andina Biosph.
2013; 1(1):16-32.

Historial del artículo

Recibido abril, 2013.
Devuelto octubre 2013.
Aceptado octubre, 2013.
Disponible en linea, noviembre 2013

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Key words:
Trichoderma spp.,
secondary metabolites,
fungus plant growth
promoter,
dual confrontations,
Lactuca sativa,
Raphanus sativus.

Resumen

La interacción *Trichoderma-Trichoderma* de 35 cepas, fue estudiada debido al potencial del hongo para sintetizar Metabolitos Secundarios (MS), como el ácido-3-indolacético (IAA), mediante enfrentamientos duales en medio de cultivo sólido potato-dextrose-agar (PDA) como método de selección para cepas formadoras de "barrera de defensa" entre 0.5-0.7cm con ancho óptimo de selección. Se identificaron 20 enfrentamientos duales, estos fueron replicados en medio de cultivo líquido potato-dextrose-agar (PDA) en agitación constante, al cabo de 9 días de crecimiento se realizó el filtrado del caldo para separar los metabolitos sintetizados por el hongo del micelio formado. Esta sustancia de interés, que contiene a los MS, fue inoculada en dos cultivos: *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*. Se encontró que, los mejores tratamientos para el ensayo de *Lactuca sativa* son los enfrentamientos 3(BP-T0001-BPT0029), 4(BP-T0006-BPT0028), 7(BP-T0007-BPT0024) y el cultivo individual I (BP-T0028) como las mejores cepas inductoras de crecimiento e involucra el peso, largo, volumen de raíz y el peso de hoja. Para el ensayo de *Raphanus sativus* los mejores tratamientos son el enfrentamiento 10 (BP-T0015-BPT0025) y el cultivo individual K (BP-T0031) como inductores del largo de raíz, diámetro y peso de bulbo. El cultivo individual G (BP-T0024) y fertilizante químico QUI inductores del peso de hoja y el enfrentamiento 3 (BP-T0001-BPT0029) como inductor del peso de raíz. Por lo tanto los MS sintetizados por *Trichoderma* spp. durante los enfrentamientos duales actúan como Promotores del Crecimiento en Plantas (PGP).

© 2013. *Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivia. Todos los derechos reservados.*

Abstract

The *Trichoderma-Trichoderma* interaction of 35 strains was studied because of the fungal potential to synthesize Secondary Metabolites (MS), such as the 3-indoleacetic acid (IAA), by using dual confrontations in solid crop of potato-dextrose-agar (PDA) as a selecting method for forming strains of "defense barrier" between 0.5-0.7cm with an optimum width selection. 20 dual confrontations were identified. These were replicated in liquid culture potato-dextrose broth (PDB) under constant stirring. After 9 days of growth, the filtration was performed to separate the metabolites synthesized by the fungus mycelium formed. This substance of interest, containing the MS, was inoculated into two crops: *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus*. It was found that the best treatments for testing are the *Lactuca sativa* 3(BP-T0001-BPT0029), 4(BP-T0006-BPT0028), 7(BP-T0007-BPT0024) confrontations and the individual crop I (BP-T0028) as the best inducer strains of growth and involving weight, length, root volume and leaf weight. For testing of *Raphanus sativus*, the best treatments are the confrontation 10 (BP-T0015-BPT0025) and the individual K crop (BP-T0031) as inducers of root length, diameter and bulb weight. The individual G crop (BP-T0024) and the chemical fertilizer QUI, inducers of leaf weight and the confrontation 3(BP-T0001-BPT0029) as inducer of root weight. Therefore, the MS synthesized by *Trichoderma* spp. MS during dual confrontations act as Growth Promoters in Plants (PGP).

© 2013. *Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivian. All rights reserved.*

Introducción

Trichoderma es un género de hongos que tiene bastante importancia para la vida humana y la funcionalidad de un ecosistema, descomponedor de la materia orgánica, esencial en la recirculación de nutrientes en el medio ambiente. Algunos miembros de este género tienen asociaciones simbióticas con plantas, leguminosas, gramíneas, compuestas, solanaceas y otras, mientras otras son utilizados como biocontroladores contra organismos patógenos como *Fusarium* y *Rizoctonia*, además la producción de enzimas industriales como los pigmentos de antraquinona y otros (Druzhinina & Kubicek 2005) y metabolitos secundarios (MS) como antibióticos y promotores del crecimiento de plantas (PGP: Plant Growth Promoting), ideales para la agricultura (Harman *et al.* 2004, Vinale *et al.* 2006, Vinale *et al.* 2008, Vinale *et al.* 2009, Druzhinina *et al.* 2011). *Trichoderma* spp. uno de los hongos que está presente en todo tipo de suelos agrícolas y ecosistemas, su versatilidad, adaptación y fácil manipulación (Fernández-Larrea 2001) ha permitido su uso por más de 70 años como antagonista para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos en el mundo (Kubicek & Harman 2002).

Entre los MS de *Trichoderma* spp. se encuentra el ácido-3-indolacético (AIA) una hormona inductora del crecimiento (Gravel *et al.* 2007), así *Trichoderma* spp. como hongo promotor del crecimiento (PGPF: Plant Growth Promoting Fungi) (Yedidia 1999, Harman 2000, Gravel *et al.* 2007, Vinale *et al.* 2008, Achá 2008), acción que fue estudiada mediante la inducción de la producción de metabolitos con (i) aminoácidos inductores específicos de hormonas (AIA) como el L-triptófano (L-Trp) (Gravel *et al.* 2007), (ii) patógenos (Vinale *et al.* 2006, Vinale *et al.* 2008) y (iii) el inóculo directo de *Trichoderma* spp. identificado como PGP. Se ha logrado incrementar la velocidad y porcentaje de germinación, reducir los efectos causados por condiciones de estrés ambiental (Bjorkman *et al.* 1998), y frente a patógenos como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. comunes en cultivos agrícolas (Achá 2008), como también el aumento de la altura de las plantas, peso seco y tamaño de las raíces (Kleifeld & Chet 1992).

Así, la creciente demanda de alternativas ecológicas para el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos en la producción agrícola, su estudio de propiedades benéficas de los microorganismos en el suelo (Harman *et al.* 2004, Vinale *et al.* 2008, Vinale *et al.* 2009, Ryder *et al.* 2012). Actualmente se desarrollan productos con organismos vivos, conocidos como agentes de control biológico: hongos, bacterias, virus e insectos (PROINPA 2012) a través del aislamiento y caracterización de microorganismos nativos bolivianos mediante pruebas en laboratorio (Ortuño *et al.* 2004) y en campo mediante ensayos realizados con *Trichoderma* spp. en plántulas de cebolla y tomate en el Valle Alto de Cochabamba-Bolivia donde se destaca la particularidad de este hongo como PGPF (Medrano & Ortuño 2007, Achá 2008).

Por esta razón, las cepas de *Trichoderma* spp. han adquirido un alto valor comercial, abarcando nuevas tecnologías para la producción masiva de productos de este hongo (Cruz 2007). Aunque su uso a través de productos donde se tiene como componente activo esporas de *Trichoderma* spp. en diferentes medios de crecimiento, ya sea de forma sólida o líquida (PROINPA 2012), se tiene como dependencia la capacidad de crecimiento y supervivencia del hongo

en el sustrato inoculado y la competencia con otros micro organismos de suelo.

Esta interacción provocada lleva a una mayor producción de componentes de defensa, sintetizados a través del metabolismo secundario del hongo donde se ha encontrado al AIA entre otros (Benítez *et al.* 2004). Según Kilian *et al.* (2006), el desarrollo de productos biológicos basados en microorganismos benéficos puede ampliar las opciones del mantenimiento y rendimiento de cultivos en campo, dentro de la agricultura boliviana andina, la baja fertilidad, deficiente conservación de suelos se refleja en bajos rendimientos de los cultivos, que sería superable con el empleo de biofertilizantes de preparación local (Franco *et al.* 2005).

Por consiguiente se ha visto necesario la búsqueda de formas alternativas de obtener dichos beneficios: mediante técnicas de estrés biológico en laboratorio, como los enfrentamientos duales de *Trichoderma* spp. donde se aprovecha doblemente el potencial del hongo, identificándose las cepas productoras de MS-PGP dejando de lado los métodos tradicionales de enfrentamientos de *Trichoderma* spp. con patógenos de la planta.

Materiales y métodos

El ensayo se realizó en el laboratorio de microbiología de la Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (Fundación PRO INPA), ubicada en la provincia Quillacollo del departamento de Cochabamba, que se encuentra a 15 Km de la ciudad, a una altitud de 2613 msnm y cuyas coordenadas geográficas son 17°21'00.7" latitud sur y 66°15'40.6" longitud oeste.

Cepas microbianas, 35 cepas nativas bolivianas de *Trichoderma* spp disponibles en la colección de la Fundación PROINPA, fueron activadas en (PDA:

potato-dextrosa-agar, Difco™ Laboratories, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Estas fueron incubadas en tubos de ensayo de 6 mL a 20±2 °C durante 8 días.

Prueba preliminar de detección del ácido indol acético (AIA), la capacidad de síntesis del ácido indol acético (AIA) de las 35 cepas de *Trichoderma* spp. de forma individual, Rico (2009). Inicialmente, se preparó el medio de cultivo caldo de papa (PDB: potato-dextrose-broth), según el protocolo establecido por el laboratorio de microbiología de la Fundación PROINPA. El medio fue llevado a la autoclave durante 15 min a 121 °C, se agregó la mezcla previamente filtrada de 0.153 g de L-Trp disuelto en 15 mL de agua. A continuación se realizó la inoculación de las 35 cepas de *Trichoderma* spp en erlenmeyer de 50 mL con el medio de cultivo PDB enriquecido con L-Trp (aminoácido precursor para la síntesis del AIA durante el desarrollo de *Trichoderma* spp.). El medio de crecimiento del hongo se mantuvo en agitación constante a 100 rpm a 23±2 °C durante 7 días, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, en una centrífuga marca Vortex 21K, el sobrenadante se dispensó en placas de plástico tipo ELISA, con 96 hoyos de 250 µL, marca MicroWell. Para su revelado se adicionó solución de Salkowski (ClFe₃=2% al 0.05M, H₂SO₄=35% H₂O=63%), que detecta derivados del Indol (Gordon & Weber 1951). Como testigo negativo o cero se usó un pocillo control con PDB más la solución de Salkowski. Para el control positivo se usaron dos bacterias identificadas (*Bacillus subtilis* y *Bacillus amiloliquefaciens*) como positivas a la prueba. La placa de ELISA se llevó a oscuridad por 15 min, para su posterior revelado, se observó viraje de color de amarillo a diversas tonalidades entre el rango de rosado a fucsia encendido, coloración que indica la presencia de AIA (Gordon & Weber 1951).

Enfrentamientos duales-PDA, para seleccionar las mejores cepas de *Trichoderma* spp. productoras de MS de interés, se produjo el estrés biológico del hongo mediante enfrentamientos duales en placas petri de 90 mm de diámetro con PDA, las 35 cepas de *Trichoderma* spp. tuvieron en 7 días de crecimiento (placa matriz), de esta se tomó una muestra general de inóculo un disco de 5 mm de diámetro (PDA más hongo en crecimiento), que fueron sembrados en puntos equidistantes en placa petri de 50 mm, se incubó a 20 ± 2 °C por 8 días. Durante este tiempo, se realizaron controles de velocidad de crecimiento, compatibilidad o incompatibilidad. Hecho que se verifica con la presencia o no de la “barrera de defensa”. Para este ensayo se trabajó con 315 enfrentamientos: combinaciones duales de las 35 cepas de *Trichoderma* spp. cada enfrentamiento contó con tres repeticiones.

Análisis estadístico, se consideraron los siguientes parámetros como variables de respuesta: Para el control de velocidad de crecimiento de los enfrentamientos duales, se tomó como variables (i) crecimiento horizontal del hongo en la placa petri (cm) y (ii) crecimiento vertical del hongo en la placa petri (cm), datos que fueron evaluados mediante un análisis de *cluster* con el programa estadístico PAST. Se observaron tres características de forma general al final de los 8 días de crecimiento: (i) compatibilidad de ciertas cepas durante su crecimiento en la placa petri, (ii) crecimiento en la placa petri de forma proporcional, y (iii) crecimiento agresivo de una de las dos cepas enfrentadas, limitando el avance de su antagonista en la placa petri. Al terminar el periodo de crecimiento del hongo, se tomó como parámetro de selección el ancho de barrera presentado en la placa petri (Tabla 1).

Tabla 1 Características de selección en los enfrentamientos de *Trichoderma* spp.

Ancho de barrera (cm)	Selección	Características
0.7	Positiva*	Incompatibilidad. Barrera gruesa.
0.5 - 0.6	Positiva*	Incompatibilidad. Barrera gruesa.
0.4 - 0.5	Negativa	Incompatibilidad. Barrera delgada.
0.2 - 0.3	Negativa	Incompatibilidad. Barrera delgada.
0.1 - 0.2	Negativa	Incompatibilidad. Barrera fina.
0	Negativa	Compatibles. No presenta barrera.

*Selección Positiva: indica que el enfrentamiento dual será replicado para la producción de MS en medio de cultivo PDB.

Producción de Metabolitos Secundarios (MS), la replicación en medio de cultivo PDB los 20 enfrentamientos duales que presentaron formación de la “barrera de defensa gruesa” (0.5-0.7 cm) en el medio de cultivo PDA y así facilitar la separación de la sustancia de interés producida durante la interacción de ambas cepas del micelio formado, realizándose nuevos cultivos duales con los enfrentamientos seleccionados según la metodología Rea ves & Crawford (1994), también descrita en Vinale *et al.* (2009), en matraces erlenmeyer de 50 mL con PDB autoclavado a 121 °C durante 15 min, también se realizó el cultivo individual (discos de 5 mm de diámetro tomados de la placa matriz) en PDB de las 12 cepas de *Trichoderma* spp. que forman parte de los enfrentamientos duales. Los matraces fueron llevados a agitación constante, 100 rpm durante 9 días a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Cada enfrentamiento contó con cinco repeticiones, de ellas se tomó un matraz al azar para la medición del pH _{inicial} (día uno), pH _{intermedio} (a cuatro días), pH _{final} (a nueve días. Los cultivos individuales, con una repetición, se

tomó el pH final de cada uno (datos no presentados).

Filtrado del medio de cultivo PDB, después de 9 días de crecimiento, los enfrentamientos y cultivos individuales de *Trichoderma* spp. en PDB, se separaron de la sustancia de interés del micelio del hongo formado mediante el siguiente protocolo: (i) se separó el micelio formado por *Trichoderma* spp. del caldo, (ii) se realizó choque térmico a 50 °C por 15 min del líquido obtenido, luego se filtró y separó cualquier resto de estructura fúngica de la sustancia de interés que contiene a los MS: (i) papel filtro Nº1, (ii) papel de filtro cualitativo 415VWR equivalente a papel filtro WHATMAN Nº6 de 3 µm y (iii) Sterile Syringe Filter de 0.2 µm Celulose Acetato VWR mas una jeringa estéril de 5 mL.

Bioensayos en invernadero, se utilizó el diseño aleatorio por bloques, con 6 bloques para cada ensayo (*Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*) cada bloque con 35 tratamientos: 20 enfrentamientos duales, 12 cepas individuales, 1 testigo (T) caldo de cultivo PDB, 1 tratamiento biológico (BIO): TRICOBAL, y 1 tratamiento químico (QUI): INKAFERT AZUL. Los fertilizantes químico (QUI) y biológico (BIO) fueron instalados como tratamientos positivos, las semillas de *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* sembradas en macetas de 2 kg con tierra estéril (Arena-Cascarilla de Arroz-Tierra vegetal en proporción 1:1:1), esterilizada a 150 °C por 120 min con vapor de agua. A partir de la germinación de las semillas se controló el tiempo en el cual estas llegaron al estadio de plantines (punto de partida del ensayo). De esta forma se procedió a inocular 500 µL de caldo filtrado de los enfrentamientos duales de *Trichoderma* spp. 500 µL de caldo filtrado de las cepas individuales de *Trichoderma* spp. 0.5 g de TRICOBAL y 0.44 g de INKAFERT AZUL. El inóculo del caldo filtrado de 500 µm por tratamiento se hizo en

la zona de la meso-rizósfera. En el caso del inóculo sólido como es TRICOBAL e INKAFERT AZUL se realizó alrededor de la rizósfera entre 6-8 cm de profundidad.

Variables de respuesta, se realizaron evaluaciones semanales de desarrollo de plantines en cuanto a altura del área foliar, número de hojas, el regado de las plantas en desarrollo se realizó cada 48 h, por la mañana. Al cabo de un mes y medio de crecimiento controlado, se realizó la cosecha de *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*, se consideró las variables de respuesta: (i) cultivo de *Lactuca sativa*: peso de hoja (g), peso de raíz (g), largo de raíz (cm), volumen de raíz (mL) y (ii) cultivo de *Raphanus sativus*: peso de hoja (g), diámetro del bulbo (cm), peso del bulbo (g), largo del bulbo (cm), volumen del bulbo (mL), largo de raíz (cm), peso de raíz (g).

Análisis estadístico, el análisis de *cluster* mediante el programa estadístico PAST para la evaluaciones de invernadero: cosecha de los cultivos de *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*. También se realizaron para los datos de las variables de respuesta obtenidos de la cosecha de los ensayos evaluaciones mediante el análisis de varianza (ANOVA) bajo la distribución normal con un nivel de confianza del 99% con el software estadístico SAS-9.2.

Resultados

Prueba preliminar de detección de AIA, las 35 cepas de *Trichoderma* spp. analizadas de forma individual en la prueba de AIA, las cepas 1, 6, 7, 8, 10, 15, 18, 23, 24, 25, 28, 29, 31, 32 marcaron positivo a la presencia de AIA.

Enfrentamientos duales-PDA, los controles de crecimiento de cepas *Trichoderma* spp. se observó un efecto antagonista en PDA, la formación de barrera de defensa entre cepas incompatibles en área de

terminada de crecimiento. En su inicio una cepa enfrentada es capaz de inhibir a su antagonista a distancia, luego la detención, se realiza por secreción de sustancias antifúngicas, parámetro de selección, formación y dimensión de la barrera (Figura 1). Considerando la clasificación de los 105 enfrentamientos, realizados en PDA, se tiene como resultado: 20 enfrentamientos con barrera gruesa (Tabla 2) seleccionados para la producción de MS en PDB, además de ser este el grupo que mostró la menor velocidad de crecimiento al momento de competir frente a otro hongo del mismo género en un área determinada, según el análisis de *Cluster*.

Dentro de los 20 enfrentamientos duales de *Trichoderma* spp. las cepas individuales 1, 6, 7, 15, 18, 23, 24, 25, 28, 29, 31, 32 identificadas como productoras de AIA mediante la inducción del L-Trp, formaron la barrera de defensa gruesa al ser enfrentadas entre las cepas del mismo grupo en PDA, las cepas individuales 8 y 10 no presentaron el mismo resultado, ya que al ser enfrentadas con otra cepa de *Trichoderma* spp. del mismo grupo, la barrera de defensa formada en la placa petri con el medio de cultivo PDA fue delgada en un 56% de los enfrentamientos y fina en un 36%.

Producción de MS, la evaluación del pH final de los enfrentamientos duales y las cepas individuales de *Trichoderma* spp. en PDB, el análisis ANOVA indica que no existen diferencias estadísticas notables ($P<0.01$) entre ambos tratamientos. En general, el pH final de los cultivos de cepas individuales de *Trichoderma* spp. al final del ensayo presentó variaciones entre 4.28 y 8.38, y solamente una cepa presentó pH neutro. Asimismo el pH final de los enfrentamientos duales no sobrepasa el valor de 7.17.

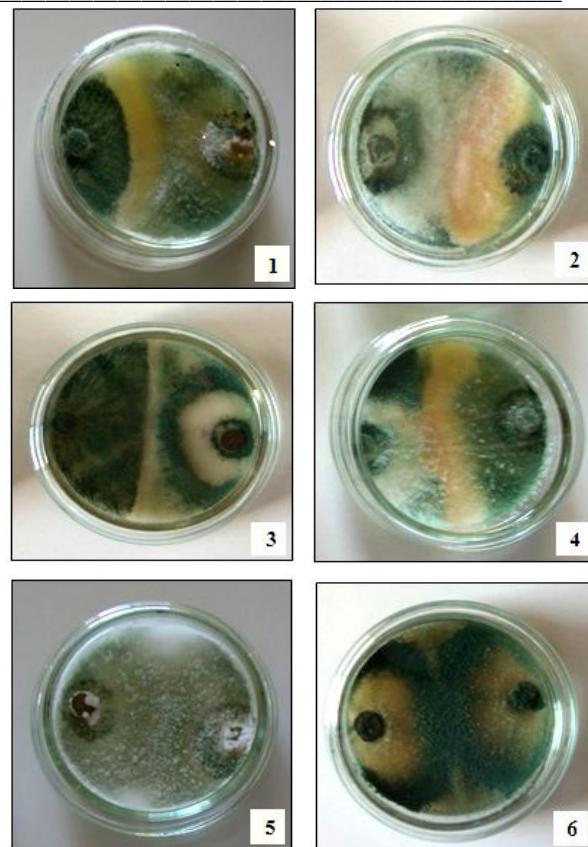


Figura 1 Clasificación de enfrentamientos duales. 1: Menor desarrollo de la cepa A frente a la cepa B, 2: La cepa A se desarrolla en mayor área que la cepa B con ataque al hongo antagonista, 3: Crecimiento compartido de las dos cepas, con formación de barrera, 4: Ambas cepas se desarrollaron de igual forma pero la cepa A ataca fuertemente a la cepa B, 5: Cepas compatibles sin tinción del medio de cultivo PDA, 6: Compatibles con tinción de medio de cultivo PDA.

Bioensayos en invernadero

Análisis estadístico para el ensayo de *Lactuca sativa*, se muestra que los enfrentamientos duales y los cultivos individuales, pueden ser agrupados en 8 (Tabla 3) según la eficiencia de acción como PGPF. Por lo tanto, de acuerdo al análisis de las medias generales para las variables de respuesta evaluadas al final de la cosecha, los mejores tratamientos pertenecen al “**Grupo 5**” con los tratamientos: 3, 4, 7 (enfrentamientos) e I (cultivo individual). Por lo que

estos tratamientos podrían utilizarse como promotores de crecimiento en el cultivo de *Lactuca sativa* (Figura 2).

Tabla 2 Clasificación de los enfrentamientos duales de *Trichoderma* spp. según la velocidad de crecimiento: análisis de *Cluster*

Grupo según <i>Cluster</i>	Velocidad de crecimiento	Enfrentamientos duales*
Grupo 1	Mayor velocidad de crecimiento	Compatibles: 47 enfrentamientos
Grupo 2	Grupo 2 < Grupo 1	Barrera fina: 27 enfrentamientos
Grupo 3	Grupo 3 < Grupo 2	Barrera delgada: 11 enfrentamientos
Grupo 4	Menor velocidad de crecimiento	Barrera gruesa: 20 enfrentamientos

*Clasificación de los enfrentamientos duales de *Trichoderma* spp. según la presencia de barrera.



Figura 2 *Lactuca sativa*-PGPF “Grupo 5”. **1:** Enfrentamiento 3 comparado con el Testigo T, **2:** Enfrentamiento 4 comparado con el Testigo T, **3:** Enfrentamiento 7 comparado con el Testigo T, **4:** Cultivo individual I comparado con el Testigo T.

Tabla 3 Medias generales para las variables de crecimiento y rendimiento de *Lactuca sativa* según el análisis de *Cluster*

Grupo según <i>Cluster</i>	Tratamientos	Peso de hoja (g)	Peso de raíz (g)	Largo de raíz (cm)	Volumen de raíz (mL)
1	12-A-B-13-C	1.696	0.673	7.129	1.006
2	20	7.315	1.568	16.656	1.566
3	6-17-9-18-10-8-2-QUI	63.730	3.026	27.750	3.069
4	16-K-1-19-F-H-BIO-J	52.359	2.887	29.004	3.132
5*	4-7-3-I	67.582	3.802	39.979	3.813
6	5	42.134	2.795	20.659	2.555
7	11-14-L-T-15-G	32.511	2.524	27.379	2.556
8	E	20.280	1.177	15.069	1.304

*Grupo 5: Mejores PGPF.

Por otra parte en análisis de varianza muestra que se encontraron diferencias estadísticas significativas ($Pr<0.01$) para las variables de respuesta peso de hoja, peso de raíz, largo de raíz y volumen

Análisis estadístico para el ensayo de Raphanus sativus, se muestra que los enfrentamientos duales y los cultivos individuales, pueden ser agrupados en 9 (Tabla 4). De los cuales el mejor grupo como PGPF, de acuerdo al análisis de medias generales para las variables de respuesta evaluadas al final de la cosecha, es el “**Grupo 6**” (Figura 3) con los tratamientos **10** (enfrentamiento) y **K** (cultivo individual).

de raíz para el cultivo de *Lactuca sativa*. Por lo que el efecto de los cultivos individuales y enfrentamientos duales entre los tratamientos varió según los caracteres de la planta.

El análisis de varianza muestra diferencias significativas ($Pr<0.01$) para las variables de respuesta peso de hoja, diámetro de bulbo, peso de bulbo, largo de bulbo, volumen de bulbo y largo de raíz para el cultivo de *Raphanus sativus*, y no así para la variable peso de raíz.



Figura 3 *Raphanus sativus*-PGPF “Grupo 6”. 1: Enfrentamiento 10 comparado con el Testigo T; 2: Cultivo individual K comparado con el Testigo T.

Tabla 4 Medias generales para las variables de crecimiento y rendimiento de *Raphanus sativus* según el análisis de *Cluster*

Grupo según <i>Cluster</i>	Tratamientos	Peso de hoja (g)	Diámetro de bulbo (cm)	Peso de bulbo (g)	Largo de raíz (cm)	Peso de raíz (g)
1	A	4.862	3.183	28.242	28.333	0.723
2	G-QUI	5.656	3.175	35.648	30.833	0.737
3	L	3.566	2.197	14.040	15.833	0.695
4	5-8-6-H-11-7-2-16	5.380	3.992	58.360	58.271	0.981
5	9-BIO-E	5.277	3.806	52.879	52.778	0.884
6	10-K	5.555	4.142	66.447	69.583	1.344
7	4-12-I-13-F-T-17-19-14-15-18-B-D-1	5.229	3.575	46.237	46.012	1.063
8	20-J-C	4.923	3.372	41.518	38.889	0.916
9	3	5.508	4.083	53.593	41.250	1.657

*Grupo 6: Mejores PGPF.

Discusión

Prueba preliminar de detección de AIA, en la prueba de detección de AIA catorce cepas individuales de *Trichoderma* spp. presentaron el viraje de color rojo-rosado, indicando la presencia de AIA. Según lo reportado por Salkowski 1889, Bric *et al.* 1991, Glickmann & Dessaix 1995, Anwar 2000, su detección en el medio permite establecer si el microorganismo de interés tiene la capacidad de sintetizar AIA (hormona de crecimiento vegetal) a partir de un precursor determinado (L-Trp) y, así mismo, evaluar la especificidad encontrada en la reacción colorimétrica de Salkowski para la detección de compuestos indol. Es así que Yedidia *et al.* (1999), de mostró que monocultivos de *Trichoderma* spp. son responsables del incremento en el crecimiento de la planta de pepino (*Cucumis sativus* L.) en un ambiente aséptico. Gravel *et al.* (2007), también demostró que una cepa de *Trichoderma*; *T. vatroviride* es capaz de sintetizar AIA “*in vitro*” mediante la inducción de diferentes precursores como el L-Trp, triptamida y tryptofol

(200 µg mL⁻¹) en el medio de cultivo, mostrando que raíces de plántulas de tomate crecieron en presencia de concentraciones variantes de AIA (0-10 µg mL⁻¹).

Producción de MS, de acuerdo a la selección, de los 20 enfrentamientos duales, a partir de la condición: mejores formadores de “barrera de defensa” zona en la que se presentó (i) inhibición de crecimiento por parte de una de las dos cepas inoculadas en la placa Petri y (ii) coloración de la zona de la barrera de defensa, Kubicek & Harman (2002) indican que; algunos de los MS que produce este hongo presentan coloración en el medio de crecimiento, además de la característica pigmentación de ciertas cepas. Además, las cepas que presentaron mayor incompatibilidad con la formación de barrera de defensa mayor, presentan el desarrollo más lento durante los 8 días de crecimiento.

Por lo tanto, mientras los enfrentamientos duales presenten menor compatibilidad y mayor estrés durante su crecimiento más lento será su desarro-

llo en un área determinada. Y ya que la producción de MS en hongos es un proceso complejo asociado al desarrollo morfológico (Vinale *et al.* 2009), y según Vessey (2003) la producción de reguladores del crecimiento de la planta por microorganismos es un mecanismo importante muchas veces asociado a la estimulación durante el crecimiento, se ha establecido como forma de síntesis de los MS de interés el método de enfrentamientos duales de *Trichoderma* sp. Es así que en condiciones naturales como indica Sánchez *et al.* (2005), en el suelo, los microorganismos llegan a sintetizar mayor cantidad de AIA en comparación con cultivos puros en condiciones de laboratorio, posiblemente por efectos sinérgicos con otros microorganismos e interacciones con la materia orgánica del suelo. Por lo que el estrés causado a estas 12 cepas en enfrentamientos duales simula esta condición.

Ryder *et al.* (2012), descartan la posibilidad que el efecto PGP de *Trichoderma* spp. ocurra en respuesta al control de patógenos menores en la raíz, como se ha venido estudiando, ya que cepas de *Trichoderma* spp. si tienen efecto PGP en ausencia de alguna enfermedad detectable (Chang *et al.* 1986, Ryder *et al.* 2012) y en suelo o turba estériles (Windham *et al.* 1986, Ryder *et al.* 2012), condiciones en las que se instalaron los ensayos en invernadero para *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*. Por lo tanto, el efecto de PGP por el hongo no necesariamente ocurre a través de la liberación de nutrientes o control ejercido sobre alguna enfermedad causada por algún patógeno presente en la planta. Es así que se demuestra la capacidad que tienen cepas individuales de *Trichoderma* spp. de sintetizar MS-PGP, como el tratamiento I en *Lactuca sativa* y K en *Raphanus sativus* que fueron inoculadas en los ensayos en invernadero, en au-

sencia de estrés por enfermedad de la planta, patógeno o un competidor durante su crecimiento en el medio de cultivo PDB.

La cantidad de MS acumulados por *Trichoderma* spp. en los enfrentamientos duales con hongos patógenos depende del balance entre el efecto elicitador y la velocidad de biotransformación ejercida por un patógeno huésped (Vinale *et al.* 2009). Lo que indica que la cantidad de MS producida por *Trichoderma* spp. dependerá del estado del hospedero así como de los siguientes factores: (i) la cepa a considerar, (ii) el microbio elicitador o condición y (iii) el balance entre biosíntesis y biotransformación de los metabolitos (Vinale *et al.* 2009). Dada la interacción a la que fueron sometidas las cepas de *Trichoderma* spp. en los enfrentamientos duales, donde ellas actuaron como competidores de espacio, nutrientes y patógenos frente a otra cepa del mismo género, además de causar posible daño en estructuras, paredes celulares, frenar el crecimiento de la otra cepa antagonista como menciona Harman (2000). Asimismo en este estudio se evidenció que las cepas de *Trichoderma* spp. sintetizan MS con capacidad PGP de forma conjunta en enfrentamientos duales y de forma individual. Obteniendo mejores resultados con los inóculos de enfrentamientos duales en un 80% para el ensayo de *Lactuca sativa* y en un 82% para el ensayo de *Raphanus sativus* comparados con los inóculos de cepas individuales.

El entendimiento y manejo de los anteriores factores significaría una mejor comprensión del proceso de producción de estos compuestos naturales secretados por *Trichoderma* spp. durante los enfrentamientos. Y la aplicación directa, de estos compuestos o moléculas elicitadas, en cultivos vegetales representa un nuevo enfoque para el desarrollo de biofertilizantes basados en compues-

tos bioactivos: MS como indica Vinale *et al.* (2009). Estos productos naturales: MS, han sido estudiados, identificados y aislados como muestra de la capacidad de *Trichoderma* spp. de biosintetizarlos y son aplicados como PGP en cultivos vegetales. Este hecho ha sido relacionado con el metabolismo secundario de este hongo a manera de favorecer la asociación simbiótica entre algunas cepas de *Trichoderma*-planta. (Kubicek & Harman 2002, Harman *et al.* 2004, Vinale *et al.* 2008, Vinale *et al.* 2009, Lorito *et al.* 2010, Morán-Diez *et al.* 2012). Lo que respalda la hipótesis de tener AIA sintetizado en el caldo PDB empleado para los ensayos en invernadero debido al estrés biológico causado al enfrentar dos cepas de *Trichoderma* spp. por lo que este método es también una forma alternativa de producción de esta hormona.

Considerando lo reportado por Delgado-Jarana *et al.* (2000), el pH del ambiente de la rizósfera es uno de los factores que afectan la actividad de *Trichoderma* spp. y los factores patogénicos secretados por diferentes microorganismos. Por ejemplo algunos antibióticos son degradados a pH elevado, y en un pH bajo se podría inducir la degradación enzimática mediante proteasas ácidas. Aunque *Trichoderma* spp. tiene la habilidad de adaptarse a un amplio rango de condiciones extremas esta característica le da ventaja frente a otro organismo durante su interacción en un suelo ácido si se da el caso, incluso la adaptación de los compuestos bioactivos sintetizados cuentan con esta ventaja. Ya que los enfrentamientos y cultivos individuales presentan un amplio rango de crecimiento y por lo tanto la tolerancia de sus compuestos sintetizados es amplia.

Filtrado del caldo de cultivo PDB, Kamilova *et al.* (2006), indica que para realizar el aislado de los exudados de plántulas y semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) pepino (*Cucumis sativus* L.) pimienta (*Capsicum annum* L.), que contienen también MS, del medio de crecimiento “*in vitro*” estos fueron secados a 45 °C y filtradas (tamaño de poro 0.45 µm) y el aminoácido Trp también fue extraído de la misma forma. Se realizó el choque térmico de 50 °C por 15 min lo que ayudó a desactivar las cepas de *Trichoderma* spp. Indicando que algunos de estos compuestos naturales: MS, resisten temperaturas altas por tiempo prolongado sin daño a sus estructuras, manteniendo su viabilidad. Además de considerar la efectividad del filtrado de la sustancias de interés que contiene a los MS. Ya que según Reyes *et al.* (2007), la obtención de filtrados puros del caldo de cultivo PDB de cepas de *Trichoderma* spp. mediante filtrados es una técnica útil de obtener dicha sustancia. Aunque también indica que pudo haber ocurrido la destrucción o pérdida de algunos compuestos durante las fases previas a su extracción.

Bioensayos en invernadero, el AIA exógeno, como el producido por microorganismos, causa cambios en la morfología del sistema de la raíz el cual se ve influenciado en la toma de nutrientes para la planta (Arteca 1996). Ya que según indica Kamilova *et al.* (2006), la mayor parte de la auxina encontrada en la rizósfera de forma natural, es derivada del triptófano secretado por la raíz y convertida en auxina por bacterias y hongos. En cuanto a la inoculación del caldo filtrado de los enfrentamientos duales y cultivos individuales de *Trichoderma* spp. que fue aplicado a las plántulas jóvenes de lechuga (*Lactuca sativa*) y rábano (*Raphanus sativus*) se debe a que: el estado de plántula de una planta en desarrollo es más sensitiva a la estimulación de crecimiento vegetal por la auxina (Kamilova *et al.* 2006) u otra hormona de crecimiento o PGP. Pero la aplicación de la cantidad o

concentración de estas sustancias: MS debe ser considerada seriamente ya que Contreras-Cornejo *et al.* (2009), indica que el efecto deseado mediante la inoculación de cepas de *Trichoderma* en la planta bajo condiciones naturales dependerá de la concentración y el tipo de auxinas que produzca el hongo, debido a que en pruebas realizadas con AIA y AIA1d inoculadas en plantas de *Arabidopsis* promovieron el crecimiento de la planta a concentraciones bajas. Caso que pudo presentarse en los tratamientos 7, 4, 3, 8 (enfrentamientos) e **I** (cultivo individual) en *Lactuca sativa* y **K** (cultivo individual) y 10, 8, 5, 11 (enfrentamientos) en *Raphanus sativus*. En cambio a concentraciones elevadas actuaron como represores del crecimiento (Acosta *et al.* 2001). Caso que pudo darse en el cultivo de lechuga inoculadas con los tratamientos **12, 13, 20** (enfrentamientos) y **A, B** y **C** (cultivo individual) al presentar un porcentaje bajo en cuanto al crecimiento foliar y radicular, como también la muerte de las plantas inoculadas con el tratamiento **D** (cultivo individual). Siendo el cultivo de lechuga más sensible a los compuestos de interés: MS. Por lo tanto el AIA incluso el producido por microorganismos, puede influir en el crecimiento de sistemas radiculares dependiendo de la cantidad encontrada en la rizósfera a través de la elongación y formación de raíces laterales o adventicias (Taiz & Zeiger 2006, Gravel *et al.* 2010). Y *Trichoderma* spp. produce auxinas que son capaces de estimular el crecimiento de la planta y desarrollo de la raíz (Contreras-Cornejo *et al.* 2009).

Ya que la inoculación de *Trichoderma* spp. de forma directa en la planta si tiene el efecto PGP debido a las sustancias naturales sintetizadas por este hongo: MS, identificados por Kubicek & Harman 2002, Vinale *et al.* 2008, como la harziano piridi-

na, 6PP, Koninginin, Koninginin A, Konin ginin B, Koninginin C, Koninginin E, Ciclo nerodiol y la presencia de auxinas (Contreras-Cornejo *et al.* 2009) que actúan como reguladores del crecimiento de la planta y además han sido encontrados dentro de los productos metabólicos de *Trichoderma* spp. Es así que se han realizado pruebas de forma directa y controlada, como Ryder *et al.* (2012) en lechuga, donde la actividad PGP se debe en parte a los compuestos solubles en agua, que fueron inoculadas con el líquido extraído del cultivo de la cepa *Trichoderma hamatum* GD12 capaces de incentivar el crecimiento de este vegetal. También Kamilova *et al.* (2006), demostró que en estudios previos realizados en invernadero, tratando a las semillas de una planta con una suspenión de esporas de *Trichoderma* spp. incrementaron el rendimiento de esta. Resultado similar se encontró al tratar las semillas separadas de *Trichoderma* spp. por una membrana de celofán, indicando que *Trichoderma* spp. produce metabolitos difusibles capaces de promover el crecimiento de la planta (Benítez *et al.* 1998). Indican también que algunos MS de *Trichoderma* spp. están directamente involucrados en la interacción planta-*Trichoderma* y particularmente que 6PP puede ser considerado como un compuesto similar a la auxina y/o puede actuar como un inductor de auxinas (Vinale *et al.* 2008).

La identificación de nuevos efectores moleculares pueden apoyar la aplicación de nuevos biofertilizantes basados en MS de *Trichoderma* spp. para ser utilizados en lugar de microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal. Un punto de partida para lograr este cometido podría ser el estudio de la actividad de las cepas enfrentadas **3, 4, 5, 7, 8, 10, 11** y los cultivos individuales **I, K** que presentaron el mejor rendimiento de los 35

tratamientos en los ensayos de invernadero. También Whipps (2001), menciona que ciertos aislados de *Trichoderma* spp. pueden actuar como PGPF en ausencia de patógenos mayores. Contreras-Cornejo *et al.* (2009) encontró que *T. virens* y *T. atroviride* son capaces de estimular el crecimiento en plantas “*in vitro*” de *Arabidopsis*. Debido al incremento en el crecimiento de la raíz y profundidad de esta como consecuencia para una mejor absorción de nutrientes (Yedidia *et al.* 2001, Harman *et al.* 2004). Como se observó en los tratamientos **3, 4, 7, I, J** en el cultivo de *Lactuca sativa* y los tratamientos **2, 10, 14, 19** en el cultivo de *Raphanus sativus* según el desarrollo en mayor proporción de la raíz.

El hecho de estimular a *Trichoderma* spp. enfrentándola con otra cepa del mismo género mediante la selección de los mejores productores o formadores de la barrera de defensa, asegura la producción de MS; hormonas que tengan la acción PGP, ya que según Whipps (2001), se debe considerar que si un microorganismo es capaz de crecer en la rizósfera, no proveerá de forma automática la acción PGP, ya que probado en el suelo no será siempre capaz de colonizar la rizósfera o promover el crecimiento de la planta, esto por las variantes del suelo, factores bióticos y abióticos que influyen en la composición de las comunidades presentes en la zona de la rizósfera. Por ejemplo al detallar la interacción de las cepas enfrentadas de *Trichoderma* spp. con los códigos asignados a las cepas individuales se tiene a los mejores enfrentamientos que presentaron el mayor rendimiento en los ensayos de invernadero **3 (A—J), 4 (B—I), 5 (B—J), 7 (C—G), 8 (D—F), 10 (D—H), 11 (E—G)**. Dentro de estos enfrentamientos se cuenta con la participación de las cepas individuales **A, B, C, D, E, F, G, H, J** que no figuran entre las

mejores inductoras del crecimiento de la planta. Pero se cuenta con una excepción en el enfrentamiento **4** donde se observa la presencia de la cepa individual **I** (una de las mejores cepas individuales inductora del crecimiento en el cultivo de *Lactuca sativa*). Por lo tanto el hecho de poder actuar como PGPF como cepa individual (cepas **I, K**) no asegura que estas se comportaran de la misma forma prometedora durante la interacción con otro hongo del mismo género. Igualmente cepas individuales con bajos rendimientos en cuanto a su acción PGPF, tienen el potencial para expresar mejor esta propiedad al ser inducidos por estrés biológico en un medio de crecimiento común (PDB), mejorando así las opciones de trabajo para elegir a las cepas sobresalientes como inductoras del crecimiento de la planta.

Es así que el ambiente juega un papel importante en la diferenciación y crecimiento de *Trichoderma* spp. La respuesta a estímulos exteriores durante el crecimiento, formación de conidias y microparasitismo, son tres características importantes que contribuyen al desarrollo de estos organismos, ya que el proceso de formación de conidias implica la detección del estímulo, comunicación intracelular, regulación de la expresión del gen de forma espacial y temporal y la especialización celular: cambios morfológicos (Carreras-Villaseñor *et al.* 2012). Dentro de los tratamientos utilizados en este estudio que rindieron mejor como PGPF son los enfrentamientos duales realizados, implicando una forma de estrés por competencia de nutrientes y espacio, entre dos cepas de *Trichoderma* spp. tanto en *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* y no los cultivos individuales (excepciones **I, K**).

Entre otras consideraciones, las observaciones realizadas al comportamiento de la fragilidad de ruptura y marchitamiento de las hojas, se advirtió

que los cultivos de *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* tratados con el inóculo del caldo PDB que contiene a los MS presentaron hojas más resistentes en comparación con el fertilizante químico INKAFERT-AZUL con un comportamiento de ruptura frágil. Además el marchitamiento se presentó más tempranamente con el fertilizante químico comparado con los tratamientos inoculados con el caldo que contiene a los MS.

Conflictos de interés

Esta investigación no presenta conflictos de interés.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo económico del proyecto Fontagro-Bioinsumos y el Proyecto IP-Holanda.

Literatura citada

Achá C. Aislamiento y multiplicación de cepas nativas de *Trichoderma* sp y su evaluación como biocontrolador de *Fusarium* sp y *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental. 2008; 1-94 pp.

Acosta M, Sánchez J, Bañón B. Auxinas. Azcón-Bieto J. & Talón M. Fundamentos de fisiología vegetal. Editorial McGraw-Hill Interamericana, España. ISBN: 2001; 84-486-0258-7.261-283 pp.

Anwar G. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis, University of the Punjab, Lahore. 2000; 204 pp.

Arteca RN. Plant Growth Substances: Principles and Applications. Chapman & Hall, New York. 1996; 332 pp.

Benítez T, Delgado-Jarana J, Rincón A, Rey M, Limón M. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. Citado en: Pandalai SG (eds) Recent research developments in microbiology. Research Signpost, Trivandrum. 1998; 2:129-150.

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of Genetics, University of Sevilla, Spain. Int Microbiol. 2004; 7:249-260.

Bjorkman T, Blanchard LM, Harman GE. Growth enhancement of *shrunken-2 (sh2)* Sweet Corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of Environmental Stress. J Amer Soc Hort Sci. 1998; 123(1):35-40.

Bric J, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid In Situ Assay for Indol-acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. Appl Environ Microbiol. 1991; 535-538.

Carreras-Villaseñor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella JA. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. CINVESTAV Irapuato. Irapuato, Gto., México 2012. Microbiology. DOI: 10.1099/mic.0.052688-0. 158:3-16 pp.

Chang YC, Chang YC, Baker R, Kleifeld O, Chet I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Dis. 1986; 70:145–148.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortes-Penagos C, López-Bucio J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism

in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2009; 149:1579–1592.

Cruz L. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. 2007; 133 pp.

Delgado-Jarana J, Pinto-Toro JA, Benitez T. Overproduction of beta-1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 29:1481(2):289-96.

Druzhinina I, Kubicek CP. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species *Clusters*? *J Zhejiang. Univ Sci B.* 2005;(2): 100-12.

Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(10):749–759.

Fernández-Larrea O. Microorganismos para el control fitosanitario. Avance en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Costa Rica. 2001; 62:96-100.

Franco J, Herbas J, Ortuño N, Main G, Navia O. El Aporte de la Transformación de los Desechos Orgánicos en la Seguridad Alimentaria, Resultados de un Proyecto en Tiraque y Carrasco, Cochabamba. *Revista de Agricultura.* 2005; 34:14-18.

Glickmann E, Dessaux YA. Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 793-796.

Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 1951; 26(1):192–195.

Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem.* 2007; 39:1968-1977.

Harman GE. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease.* 2000; 84:377-393.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:43-56.

Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B. Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2006; 19:250-256.

Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, Hain R. FZB24® *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutznachrichten Bayer.*;2006;1/00.1.

Kleifeld O, Chet O. *Trichoderma harzianum*-interaction with living plants and effect on growth response. *Plant Soil.* 1992; 144:267-272.

Kubicek C, Harman G. *Trichoderma* Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics. Copyright Taylor & Francis Ltd. 2002; 1:1-271.

Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. Translational research on *Trichoderma*: from omics

to the field. *Annu Rev Phytopathol.* 2010; 48:395-418.

Medrano AM, Ortuño N. Control del Damping off mediante la aplicación de bioinsumos en almácigos de cebolla en el Valle Alto de Cochabamba-Bolivia. *Acta Nova.* 2007; 3(4): 660-679.

Morán-Diez E, Rubio B, Dominguez S, Hermosa R, Monte E, Nicolás C. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *J Plant Physiolg.* 2012; DOI: 10.1016. 12:016.

Ortuño N, Navia O, Medrano A, Rojas K, Torrico L. Desarrollo de bioinsumos: Un aporte a la soberanía alimentaria de Bolivia. *Revista de Agricultura.* 2010; 62 (47):30-38.

Paleontological Statistics. Øyvind Hammer. Natural History Museum. University of Oslo. 2011; Version 2.13.

PROINPA. Informes Anuales Promoción e Investigación de Productos Andinos. 2012; P.irr.

Reaves JL, Crawford RH. *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. United States Department of Agriculture, Forest Service (Pacific Northwest Research Station). 1994; 8 pp.

Reyes J, Pineda J, Sanabria ME. Efectividad de tres filtrados de hongos presentes en frutos de maíz (*Zea mays L.*) sobre *Fusarium moniliforme*. *Agroecología.* 2007; 2:47-53.

Rico M. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas alto andinas del Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. 2009; 138 pp.

Ryder LS, Harris BD, Soanes DM, Kershaw MJ, Talbot NJ, Thornton CR. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. *Microbiol.* 2012; 158(1):84-97.

SAS Institute Inc. The SAS System for Windows. Version 9.2. SAS Inst., Cary, NC. 2008; 141-179 pp.

Sánchez J, Valencia H, Valero N. Reducción de ácido indoláctico por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia graniflora* y *Calamagrotis effuse* del Páramo El Granizo. En: Bonilla M, Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos. 2005; 177-193 pp.

Salkowski E. Ueber die Bildung von Flüchtigen Fettsäuren bei der ammoniakalischen Harngrährung. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 1989; 13:264-274.

Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology.* Cuarta Edición. Editorial Sinauer, New York. 2006; 690 pp.

Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 2003; 255:571-586.

Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalbertic EL, Lorito M, Sivasithamparamb K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2006; 43:143-148.

Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic E, Marra R, Wooa S, Lorito M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem.* 2008; 40:1-10.

Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic E, Marra-Barbetti MJ, Li HR, Wooa S, *et al.* A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathology*. 2008; 72:80-86.

Vinale F, Ghisalbertic E, Sivasithamparamb K, Marra R, Ritieni A, *et al.* Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48:705-711.

Vinale F, Flematti G, Sivasithamparamb K, Lorito M, Marra R, *et al.* Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma Harzianum*. *J Nat Prod*. 2009; 72:2032-2035.

Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany, Roots Special Issue*. 2001; 52:487-511.

Windham MT, Elad Y, Baker R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 1986; 76:518-521.

Yedidia I, Benhamouand IN, Chet I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativa* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microb*. 1999; 65:1061-1070.

Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*. 2001; 235:235-242.