

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Comportamiento y Confrontación de Especies de *Trichoderma* bajo  
condiciones *in vitro*

Por:

**JESICA FIGUEROA REYES**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México.

Septiembre 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Comportamiento y Confrontación en Especies de *Trichoderma* bajo  
condiciones *in vitro*

Por:

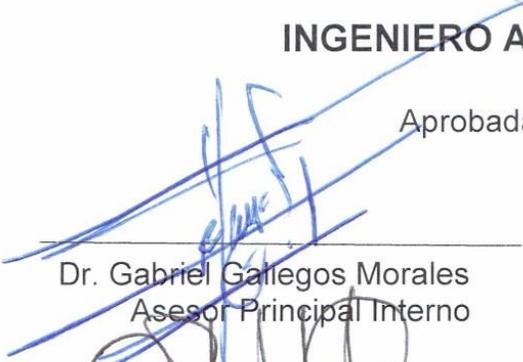
**JESICA FIGUEROA REYES**

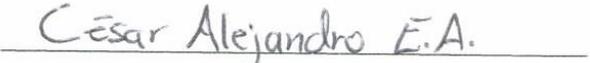
Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

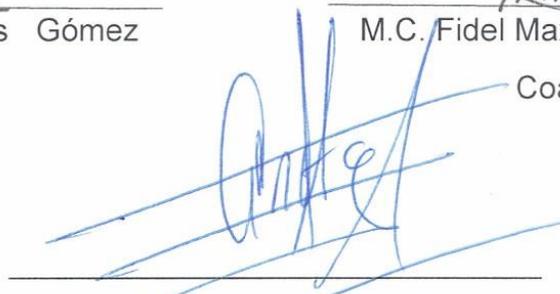
Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Asesor Principal Interno

  
Dr. César Alejandro Espinoza Ahumada  
Asesor Principal Externo

  
M.C. Alma Leticia Salas Gómez  
Coasesor

  
M.C. Fidel Maximiliano Peña Ramos  
Coasesor

  
Dr. José Antonio González Fuentes  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Septiembre 2020



## **AGRADECIMIENTO.**

**A DIOS.** Por darme la vida y salud en todo momento, sentir su presencia en esos momentos difíciles de mi vida que se presentaron durante mi carrera y motivándome para salir adelante. Por perseguir mí sueño que hoy se culmina victoriosamente. Mil gracias por estar y ser parte de mí, por permitirme conocer personas increíbles que son parte de mi vida.

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO MI ALMA MATER.** Gracias por TODO, por recibirme y permitir culminar mi carrera y haciéndome buitre para siempre.

### **A mis asesores**

**Dr. Gabriel Gallegos Morales** Gracias por ayudarme para que este trabajo se llevara a cabo, por aportar todos sus conocimientos en la realización del proyecto, muchas gracias por todo.

**Dr. César Alejandro Espinoza Ahumada** Gracias por tu apoyo y estar siempre para que esta investigación se llevara a cabo, ser tan paciente en momentos difíciles y apoyándome en todo lo que se requería para que este proyecto se culminara. Gracias por compartir tus conocimientos

**M.C. Alma Leticia Salas Gómez** Gracias por todas las revisiones y aportar sus conocimientos para que el proyecto se concluyera. Gracias por su tiempo y disponibilidad.

**A los maestros.** Por todas las enseñanzas dadas de cada uno, gracias por ser los mejores y exigir lo mejor de mí.

**Ing. Omar Jiménez Pérez** Por ayudarme con revisiones y contagiar su buen carácter. Por demostrar amabilidad cuando requería de su ayuda.

## DEDICATORIA.

### A MI PAPÁ

**Eulogio Figueroa Marcial.** Por ser la mejor persona del mundo, fuiste mi primer maestro el que me enseñó a leer y el más importante, gracias por estar siempre ahí, por ser el mejor papá y abuelo. Admiro la fortaleza que tienes de poder salir adelante y ser tan fuerte a pesar de las adversidades que se han presentado en nuestras vidas, Te amo para siempre.

### A MI MAMÁ †

**Enedina Reyes Arguello.** Tu recuerdo siempre estará presente en mi vida y donde quiera que estés, sé la más orgullosa logre lo que tanto querías y anhelábamos ese día para poder compartirlo. Dios tenía otro plan para tí, hacerte un ángel e iluminarme en momentos de obscuridad Gracias por hacerme una mujer fuerte y poder superar cualquier obstáculo en mi vida, por siempre serás la mejor abuela que mi hijo pudo tener.

### A MI HIJO

**Christian.** Mi querido hijito eres la persona más importante de mi vida, gracias por existir. Eres mi todo, te amo infinitamente. Mi pequeño travieso te he extrañado por días, pero todo es para que en futuro seas ese gran hombre que este orgulloso de mamá y sea tu ejemplo y seas capaz de cumplir todo lo que te propongas.

### A MIS TIOS

**Leonarda Reyes Arguello y Daniel De La Cruz.** Por darme su apoyo incondicional en momentos difíciles, por tener toda la paciencia del mundo con Christian, gracias por tanto. Siempre estaré agradecida con ustedes por tan valioso apoyo y sobre todo por darme ánimos cuando los necesite, los quiero.

## **A MI PAREJA**

**Ing. Iván Benetty Mérida Morales** Por todo su apoyo durante mi formación profesional, por ser el mejor compañero de vida que Dios me pudo dar, por no dejarme sola, por darme todo su amor y por motivarme a ser mejor siempre, Gracias por estar siempre junto a mí en todo momento.

## **A MI AMIGO**

**Walter Alejandro Villalobos López.** Por ser una excelente persona, por todas esas convivencias bonitas que vivimos a lo largo de nuestras carreras, pero sobre todo por el apoyo y confianza como amigo.

## **A MIS AMIGAS**

**Ameyalli Labastida Cruz, Maday Aguirre Martínez y Mayra Isela Romero Ramírez** Por estar ahí, en las buenas y en las malas, por sus consejos y por tantas risas vividas durante nuestra formación profesional, las quiero. A cada lugar que vayan, que Dios las bendiga siempre.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTO.....	III
DEDICATORIA .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURA .....	X
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Justificación .....	3
Objetivo.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
Aspectos generales de <i>Trichoderma</i> .....	4
Condiciones de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. ....	4
Características morfológicas de <i>Trichoderma</i> .....	5
Ubicación taxonómica .....	6
Interacción planta-microorganismo.....	6
Interacción Planta- <i>Trichoderma</i> .....	7
Modos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. ....	8
Micoparasitismo .....	8
Antibiosis.....	8
Competencia.....	8
La competencia por nutrientes.....	8
Importancia agrícola.....	9
Usos en la agricultura.....	9

<b>Actividad biológica de <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>Sinergismo entre especies de <i>Trichoderma</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>Actividad biofungicida de <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>Promoción de crecimiento en las plantas por <i>Trichoderma</i>. .....</b>	<b>11</b>
<b>Sinergismo entre microorganismo.....</b>	<b>12</b>
<b>Métodos de aislamiento de <i>Trichoderma</i>. .....</b>	<b>13</b>
<b>Métodos de propagación. ....</b>	<b>13</b>
<b>Medios de cultivo para <i>Trichoderma</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>Producción de metabolitos secundarios.....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>Ubicación del experimento.....</b>	<b>15</b>
<b>Material biológico.....</b>	<b>15</b>
<b>Preparación del medio .....</b>	<b>15</b>
<b>Compatibilidad entre especies de <i>Trichoderma spp</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>Conteo de conidios.....</b>	<b>17</b>
<b>Análisis estadístico. ....</b>	<b>18</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>Compatibilidad en crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>Esporulación de la confrontación de <i>Trichoderma spp</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>Ancho de barrera.....</b>	<b>20</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>30</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Criterios para determinar la compatibilidad por el ancho de la barrera entre <i>Trichoderma</i> spp. (Ortuño et al., 2013). .....	17
<b>Tabla 2.</b> Esporulación de especies de <i>Trichoderma</i> solo y en combinación.....	20
<b>Tabla 3</b> Ancho de barrera de las distintas confrontaciones entre especies de <i>Trichoderma</i> .	21

## ÍNDICE DE FIGURA

<b>Figura 1.</b> Departamento de parasitología, UAAAN 2020 .....	15
<b>Figura 2.</b> Preparación del medios de cultivo en el Laboratorio de Parasitología .....	16
<b>Figura 3</b> Procedimiento para la realización del Conteo de conidios. A) Placa de <i>Trichoderma</i> sp. B) Toma de suspensión de conidios de placa, C) Placa original sin conidios, D) Suspensión de conidios, E) Placa de <i>Trichoderma</i> ssp. y tubo con suspensión de conidios, F) Tubos con suspensión de conidios agitados manualmente, G) Cámara de Neubauer en microscopio, H) Enfoque y conteo de conidios y I) Campo de observación de conidios al microscopio. ....	18
<b>Figura 4.</b> Crecimiento micelial de especies de <i>Trichoderma</i> en combinación .....	19
<b>Figura 5.</b> Prueba de compatibilidad de diferentes especies de <i>Trichoderma</i> a través del ancho de barrera. ....	21

## RESUMEN

Esta investigación se realizó con el objetivo de comprobar el antagonismo de diferentes especies de *Trichoderma*, este hongo es un habitante natural del suelo y puede comportarse como saprófito o como parásito de otros hongos. Es uno de los inoculantes más usados en los últimos años ya que tiene buenas cualidades como antagonista de hongos, actuando como hiperparásito. El experimento se realizó en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, se trabajó con una colección de hongos de las especies de *Trichoderma harzanium*, *T. asperellum*, *T. lignorum* y *T. yunnanense*. En condiciones *in vitro* se realizaron diferentes confrontaciones entre dichas especies, al transcurrir 10 días y utilizando cámara de Neubauer se realizó el conteo de conidios en las especies confrontadas. Los datos obtenidos se evaluaron bajo un diseño completamente al azar, realizando un análisis de varianza, una comparación de medias según Tukey ( $p=0,05$ ). De las confrontaciones de dos cepas, se determinó que la mejor combinación fue TA-TL, que en conjunto esporularon más que el resto de las confrontaciones evaluadas. En cuanto a la confrontación de tres cepas la que tuvo mejor compatibilidad fue TA-TY-THZ y en las confrontaciones de cuatro especies hubo una baja esporulación. En cuanto se refiere a las combinaciones de *T. asperellum*, *T. yunnanense* y *T. harzanium* son las que presentaron mayor compatibilidad en el crecimiento, esporulación y el ancho de barrera.

## INTRODUCCIÓN

Existe un gran interés por el control biológico de los patógenos en la planta, debido a la creciente preocupación de la mayoría de la gente por el uso de agroquímicos. En el mundo los agricultores son cada vez más consciente de esta problemática pues el principal impacto es a los alimentos que se consumen al diario y al medio ambiente. En este caso los organismos antagonistas como los hongos *Trichodermas* spp. tienen la capacidad de actuar por diferentes mecanismos de acción, es decir, se trata de hongo benéficos que impiden el desarrollo o crecimiento de hongos dañino (Chiriboga, 2015).

Debido al daño ambiental ocasionado por el uso indebido de los productos agroquímicos, han buscado alternativas biológicas, en este caso es el hongo *Trichoderma* spp. ya que es un género que se ha caracterizado por ser bioinoculante y como agente de control, también es capaz de generar enzimas que ayudan a degradar restos sólidos (Hernández *et al.*, 2019).

Los hongos *Trichoderma* spp. predominan en los diferentes ecosistemas terrestres, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros organismos, además son de gran importancia para las plantas ya que son de excelente control de patógenos. Por otra parte, *Trichoderma* spp. es utilizada en la industria de los aromatizantes porque produce el metabolito 6-pentil- $\alpha$  pirona que proporciona el aroma de coco al ser utilizado con aceites vegetales comerciales (ricino, avellana, uva y linaza) como sustrato (Argumedo *et al.*, 2009).

## **Justificación**

En las interacciones de los microorganismos con las plantas se han documentado efecto en el desarrollo y la supresión de enfermedades, esta actividad benéfica se documenta cuando se aplica un solo agente microbiano. Se supondría que a mayor diversidad microbiana en los agroecosistemas se tendrá un mejor desarrollo de las plantas. Por lo que, se probarán diferentes especies de *Trichoderma* para determinar su compatibilidad en condiciones *in vitro*.

## **Objetivo**

Determinar en condiciones *in vitro* la compatibilidad en crecimiento y esporulación de cuatro especies de *Trichoderma*.

## **Hipótesis**

Al menos una combinación entre dos cepas de *Trichoderma* spp. será compatibles, no se inhibirán, y compartirán crecimiento y esporulación proporcional entre ellas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

**Aspectos generales de *Trichoderma*.** Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, con la capacidad de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Se considera que la distribución geográfica de *Trichoderma* spp. es en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Con esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. Sin embargo, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizosfera de la planta. El género *Trichoderma* es un modelo ejemplar para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una gran gama de fitopatógenos (Rodríguez, 1990). Actualmente en el mercado mundial de agentes de control biológico (ACB) fúngico es dominado por especies de *Trichoderma*, con más de 50 formulaciones registradas como productos disponibles. La mayor parte de estas formulaciones son usadas en la agricultura con el fin de producir proteínas y antibióticos que son útiles contra los agentes fitopatógenos de las plantas. Estas formulaciones se forman en base de esporas y clamidosporas, por lo regular se utilizan dos tipos de fabricación de inóculo, ya sea en fermentación líquida o sólida. La formulación obtenida de la fermentación sólida tiene como característica que la pared celular de la spora es más gruesa, esto a diferencia de la fermentación líquida que no presenta esta característica. Por lo que, las esporas de la fermentación sólida son más persistentes en condiciones adversas y tiene propiedades hidrofóbicas, que le ayudan a tener adherencia a la planta (Villegas, 2005).

**Condiciones de crecimiento de *Trichoderma* spp.** Para que se dé el desarrollo de *Trichoderma* spp. se necesitan factores físicos y nutricionales. En relación a la temperatura, el hongo se considera como un microorganismo mesófilo, por lo cual su temperatura óptima de crecimiento es de 25- 30°C, sin embargo, también es capaz de

crecer en temperaturas de 10-40°C. Crece en un amplio rango de pH que puede ser de 2 hasta 9, pero su rango óptimo es de entre 4 y 7. Tiene la capacidad de poder adaptarse en medios con humedad de hasta el 20 y 90% pero su rango óptimo de crecimiento es con humedad de entre los 70 y 80%. Presenta fotosensibilidad, por lo que, muestra una mayor esporulación y mejor desarrollo al ser expuesto bajo la luz, pero si se altera luz y oscuridad la esporulación y desarrollo es mejor. Es un degradador activo de sustratos como almidón, celulosa y peptina, las cuales son empleadas como fuente de crecimiento (Cucuk *et al.*, 2008). Además, se llega a presentar o no el crecimiento al ser expuesto a determinadas concentraciones de sal, como en el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), esta es debido a que en una concentración mayor a 80 g/L se logra inhibir el crecimiento, pero en una concentración de 60 g/L llega a tener un desarrollo mínimo y a los 10 g/L si se puede desarrollar de manera óptima. En cuanto a otras sales como a cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl) es difícil su crecimiento, porque los iones de Na y K logran inhibir su esporulación, así se disminuye la presión osmótica de la célula lo que lleva a la disminución de la esporulación (Simkovic *et al.*, 2008).

**Características morfológicas de *Trichoderma*.** La mayor parte de las colonias de *Trichoderma* spp. al empezar su crecimiento micelial son de color blanco de textura algodonosa que puede ser abundante o ralo, y al tener esporulación densa cambian de amarillento a verde oscuro (Infante *et al.*, 2009). La morfología colonial puede ser ralas o compactas, con variaciones entre estos dos extremos, esta característica se relaciona con la estructura de los conidióforos. Microscópicamente, el micelio está constituido por hifas hialinas, septadas de paredes lisas y con abundante ramificación. Las clamidosporas están presentes en varias especies, de manera intercalares o terminales, se desarrollan sobre una ramificación lateral de una hifa corta, globosa, incolora y de pared lisa. Los conidióforos se observan de forma cónica o piramidales, como una estructura compleja, caracterizada por tener una abundante ramificación lateral corta, de forma individual o en grupos de tres, hay otros conidióforos que se colocan hacia afuera, alejados de las ramificaciones laterales y las esporas son fialosporas que se producen de manera individual o acumuladas en el ápice de las fiálides, formando una cabeza de esporas cuyo diámetro es inferior a 15 µm, rara vez

están en cadenas cortas, pueden ser lisas o de pared rugosa, hialinas o verde amarillentas a verde oscuras, a veces con apariencia angular, algunas veces están truncadas en su base (Rivas, 2001).

## **Ubicación taxonómica**

*Trichoderma* ssp. se ubica taxonómicamente según Villegas (2005) en:

Reino: Fungi

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Deuteromicetes

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Trichoderma*.

**Interacción planta-microorganismo.** Los microorganismos del suelo tienen una gran importancia ya que establecen simbiosis con las plantas como biofertilizantes y su aplicación en el control biológico de patógenos. Algunas de las interacciones son beneficiosas: bacteria-planta y hongo-planta porque tienen un gran interés por su impacto en la Agricultura, constituyendo una alternativa para la aplicación de los fertilizantes químicos que actúan como contaminantes de suelos y aguas con gran perjuicio para la salud. Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrizógenos son de los principales simbiosis de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes. Por lo que, el potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado, en este contexto, se realizan estudios profundos sobre las interacciones de organismos

del suelo con las plantas, para que estas puedan auto defenderse en condiciones ambientales adversas (Felipe, 2003).

La mayor parte de las interacciones se dan en el suelo, ya que existen factores que limitan o favorecen el desarrollo de las plantas. Los microorganismos proporcionan beneficios nutricionales a las plantas lo que favorece su crecimiento. Resulta ser un poco difícil estimar los resultados de las interacciones entre las plantas y microorganismos que son benéficos del suelo, sin embargo, las comunidades microbianas que están asociadas al sistema de raíces, desempeñan una clave importante en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La inoculación de las plantas depende de sus compatibilidades funcionales con la fisiología y con la bioquímica de la interacción, así como de algunos de los componentes microbianos; así da diferentes respuestas, tomando en cuenta la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000).

**Interacción Planta-*Trichoderma*.** Existen interrelaciones entre algunos microorganismos que inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente causando de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. Los hongos que son microorganismos rizosféricos, formadores de micorrizas arbusculares (AMF), hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*, por lo regular son catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), necesitan de los factores antes mencionados para mostrar sus potenciales de efectos benéficos; sin embargo, se pueden presentar, en la interacción de los tres tipos de microorganismos, algunos efectos sinérgicos, que logren potencializar los beneficios o en cambio se muestren efectos antagónicos o simplemente que no haya ningún efecto en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas (Cano, 2011).

Rojan *et al.*, (2010) realizaron estudios con *Trichoderma viride* en un cultivo de soya, observaron que tiene efecto protector contra el ataque de *Fusarium oxysporum* y *Pythium arrhenomanes*, estos hongos patógenos que afectan en altos porcentajes de germinación de la semilla, sin embargo, todos los estados de desarrollo de la planta,

registraron que *Trichoderma viride* proporcionó un mayor crecimiento de las plantas, presenciado en un mayor peso seco de tallo, raíz y frutos y mayor producción, en comparación con las plantas testigo y las inoculadas con los patógenos. Los metabolitos secundarios producidos por estos hongos, como lo son las auxinas, juegan un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas en la interacción planta-*Trichoderma*.

**Modos de acción de *Trichoderma* spp.** Estos hongos tienen diferentes modos de acción, lo que los hace una herramienta muy valiosa para el manejo de enfermedades y de resistencia de los hongos fitopatógenos a las diferentes moléculas activas de los fungicidas. Los modos de acción más importantes son por micoparasitismo, antibiosis y competencia.

**Micoparasitismo.** Se describe como una simbiosis antagónica entre los organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, (Díaz, 1994; Lorito *et al.*, 1990; Melgarejo *et al.*, 1989; Ulloa, 1996).

**Antibiosis.** Es la acción directa de metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Varios autores mencionan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistente al antibiótico (Vero *et al.*, 1999).

**Competencia.** Constituyendo un antagonismo muy importante que se define como un comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato y nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca el espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo es favorecido por las características del agente control biológico como la velocidad de crecimiento y desarrollo, por otro lado, por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad *et al.*, 1987; Hjeljord, 1998).

**La competencia por nutrientes.** Se da por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos (Stefanova *et al.*, 1999). Por lo que cuando se emplea

fertilización completa o existe exceso de algún componente de los fertilizantes el antagonismo es poco eficaz, esto incluye a suelos con alto contenido de materia orgánica (Stefanova *et al.*,1999).

**Importancia agrícola.** La mayoría de las estructuras de reproducción de los hongos son de gran importancia económica agrícola. Cerca del 48% de los rendimientos se pierden debido a las enfermedades de las plantas, la mayor parte son causadas por hongos patógenos, sus principales fuentes de inóculo son esporas sexuales, asexuales y estructuras de resistencia. Por ejemplo, el género *Sclerotinia* produce esclerocios que son estructuras de resistencia y son el principal inóculo primario de infección. Así como existen hongos que ocasionan daños económicos, también los hay con beneficios económicos para la agricultura, tal es el caso del género *Trichoderma* cuyas especies son utilizadas para el control biológico, dan protección a los cultivos ante la presencia de patógenos que causan enfermedades en las plantas. Se reportan diversos estudios de antagonismo que permiten comprobar los efectos de beneficio de *Trichoderma* como agente de biocontrol (Núñez, 2012).

**Usos en la agricultura.** En la agricultura moderna se ha intensificado el uso de *Trichoderma spp.* como biocontrolador de patógenos de plantas, las especies *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma gamsii* son ingredientes microbianos activos de Remedier TM (ISAGRO, Novara, Italia), que se utiliza para la protección de cultivos contra una amplia gama de hongos patógenos del suelo y del área foliar (Gerin *et al.*, 2018).

En el PLM México Agroquímicos (2019), se menciona que los biofungicidas a base de esporas de *Trichoderma harzianum* actúa contra los fitopatógenos que atacan la raíz de las plantas, con un modo de acción por parasitismo, atacando directamente a los hongos fitopatógenos presentes en el suelo, sustrato o dentro de las raíces, inducción de resistencia, producción de fitoalexinas que activan los mecanismos de defensa de las plantas, antibiosis, al producir sustancias que impiden o limitan el desarrollo de los fitopatógenos, y como promotor de crecimiento al activar la producción de hormonas y crecimiento de raíces facilitando la absorción de nutrientes.

**Actividad biológica de *Trichoderma*.** Diferentes especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de ejercer actividad como agentes de biocontrol al inhibir los fitopatógenos fúngicos que causan pérdidas significativas de cultivos. En trabajos realizados en Egipto se aislaron a *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum*, las cuales mostraron ser antagonista de *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*. La mayor inhibición del crecimiento micelial del patógeno *in vitro* alcanzó hasta el 85.75% con un aislado de *T. asperellum*, sin embargo, el mejor biocontrolador en condiciones de invernadero fue *T. harzianum* al reducir la gravedad de la enfermedad (Hewedy *et al.*, 2019).

**Sinergismo entre especies de *Trichoderma*.** *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* sp. se usan de manera individual en mezclas, se determinó que son de gran importancia para las plantas, así como para la estimulación del crecimiento y la eliminación de enfermedades, se observó que la utilización de estos microorganismos es de gran ayuda, en cuanto a especies vegetales donde se usa y los patógenos que controla (Cano *et al.*, 2011).

Algunas especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. longibrachiatum*) se reportan como antagonistas contra nematodos agalladores de la raíz en varios cultivos (Mendoza *et al.*, 2013; Elgorban *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2015). Estas especies lograron tener un buen manejo de *Meloidogyne* (*M. incógnita*, *M. javanica* y *M. heterodera*) ya que redujeron relativamente las poblaciones de estos organismos en los cultivos de pepino (*Cucumis sativus* L.), chile habanero (*Capsicum chinense*), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Zhang *et al.*, 2014; Candelerio *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015). Donde se demostró tener un mayor efecto de control cuando se aplican microorganismos de la misma especie o de especies diferentes, que interactúan entre sí y muestran un comportamiento antagónico (incompatible). Otras investigaciones afirman que la combinación de aislados para el biocontrol puede ser compatible o incompatible para que se produzca mayor inhibición de los patógenos (Ortuño *et al.*, 2013). De manera que, las interacciones que son incompatibles de aislados fúngicos pueden ampliarse en el rango de control de patógenos (Hernández *et al.*, 2019).

**Actividad biofungicida de *Trichoderma*.** El hongo *Trichoderma harzianum* es uno de los microorganismos más estudiados debido a que tiene efectos significativos en la regulación de enfermedades fúngicas con una importante acción cuando se realiza su aplicación de forma preventiva al suelo. Es un eficaz controlador biológico debido a su facilidad para colonizar sustratos rápido, induce resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y tiene la actividad antagonista contra varios hongos patógenos (Carnero *et al.*, 2013).

Algunos de los factores que inciden en el rendimiento del cultivo de la soya (*Glycine max* L.) son la incidencia de enfermedades y especialmente las causadas por hongos. Para el control fitosanitario de estos microorganismos se emplean numerosos fungicidas en dosis mayores y en la mayoría de los casos no se logra tener un control, se incrementan los costos de producción y se reduce los beneficios para los productores. Cruz *et al.*, (2017) evaluaron las enfermedades fúngicas de mayor importancia e incidencia en el cultivo de la soya, así como la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum*. El antagonismo mostrado por *T. asperellum* se evaluó por el método de cultivo dual en placas Petri, también se evaluó la distribución e índice de ataque de enfermedades claves del cultivo de la soya en condición de campo, en general *T. asperellum* mostró un elevado potencial para el control biológico de las enfermedades evaluadas, disminuyendo relativamente su distribución y el porcentaje de infección.

**Promoción de crecimiento en las plantas por *Trichoderma*.** Este hongo promueve el crecimiento vegetal de las plantas tanto en la parte aérea como en las raíces, debido a que estos microorganismos son capaces de absorber y degradar nutrientes, algunas otras spp de *Trichodermas* producen hormonas de crecimiento como es el caso del ácido indolacético (Núñez *et al.*, 2012).

Este hongo es capaz de segregar factores reguladores de crecimiento en las plantas de varios cultivos. La promoción del desarrollo es debida a que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar manganeso, no importa el pH del medio, ni la disponibilidad ya que lo solubiliza constantemente, y este microelemento es requerido para las funciones

fisiológicas de las plantas, algunas de ellas como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno, síntesis de los compuestos aromáticos, y precursores de aminoácidos y hormonas, de fenoles y de lignina, útiles en el crecimiento y la resistencia a las enfermedades en las plantas (Martínez *et al.*, 2013). Además, tiene la capacidad de producir sustancias estimuladoras del crecimiento que ayudan al desarrollo de las plantas. Estas sustancias actúan como aceleradores de los tejidos meristemático apicales, que provocan un desarrollo más rápido. Su eficacia ha sido comprobada en clavel, crisantemo, pepino, berenjena, pimienta, rábano, tabaco, tomate, lechuga, zanahoria, papa, algodón, fríjol, pastos y ornamentales. En las semillas de pepino favorece la germinación, en el crisantemo logró que se incrementa el número de botones florales y la altura de la planta, y en las plantas de fríjol estimuló la germinación presentando un aumento en la altura de las plantas y ganancia en peso (Ramos *et al.*, 2008).

**Sinergismo entre microorganismo.** Existen en el suelo relaciones de sinergismo y antagonismo entre los microorganismos y plantas, esto se debe a que principalmente la exudación de compuestos químicos es de gran utilidad para el metabolismo de este conjunto microbiano, permiten el establecimiento, crecimiento y proliferación de estas poblaciones. Hay una gran cantidad de microorganismos presentes en el suelo como lo son: hongos, bacterias, protozoarios, nematodos, virus y viroides, que se asocian a las plantas. Entre algunas de ellas están las promotoras del crecimiento de las plantas, las cuales actúan por medio de mecanismos como la fijación biológica del nitrógeno y la regulación de enfermedades producidas por microorganismos patógenos (Virgen, 2016). *Trichoderma* ha demostrado que puede tener interacción positiva con otra clase de organismos benéficos, por ejemplo con especies de micorrizas arbusculares (*Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. claroideum* y *G. constrictum*) en plantas de melón, en diferentes condiciones de fertilidad del suelo (tradicional y baja), y la incidencia de la marchitez causada por el hongo patógeno *Fusarium* spp, donde se ha demostrado un efecto de sinergismo de *Trichoderma harzianum* con las micorrizas arbusculares (MA) *G. constrictum* o *G. intraradices*, en las condiciones de baja fertilidad del suelo. En la reducción del fertilizante, con plantas inoculadas con *T. harzianum* y micorrizas, tienen un mayor peso aéreo y mostraran un mejor estado nutricional. De

acuerdo al control el hongo patógeno, *Glomus mosseae* mostró capacidad para reducir la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium*, mientras que *T. harzianum* fue más efectivo que la micorriza al controlar el hongo patógeno. Sin embargo, la inoculación combinada de las MA y *T. harzianum* produjo un mayor efecto de control de *Fusarium* en comparación con la inoculación de las micorrizas solas, mostrando un efecto similar al observado en las plantas inoculadas solamente con *T. harzianum* (Martínez *et al.*, 2011).

**Métodos de aislamiento de *Trichoderma*.** Una de las capacidades que tiene *Trichoderma* es por lo que es de gran utilidad, se destaca su facilidad de aislamiento, cultivo de colonias y principalmente que no causa riesgos en las plantas (Papavizas *et al.*, 1982). La mayoría de las especies de *Trichoderma* se aíslan de la rizosfera ya que tienen la facilidad de asociarse con las plantas. Salazar *et al.*, (2017) reporta aislamiento de las muestras tomadas del suelo en algunos lugares donde se producía tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

**Métodos de propagación.** En el campo agrícola se ha incrementado el uso de microorganismos para el control biológico, uno de ellos son distintas especies de hongos *Trichodermas* spp. Una de las formas que existen en la agricultura de propagarlo es a través de sustratos de las gramíneas de arroz, la propagación de *Trichoderma* spp. se realiza de forma artesanal e industrial por medio de diferentes técnicas de fermentación sólida y/o líquida, los sustratos naturales que se reportan son granos de trigo, salvado de trigo, maíz, avena e incluso residuos de papa (Silvila *et al.*, 2013). Gómez, (2017) señala que este hongo se caracteriza porque tiene la capacidad de ser antagonista con patógenos, en su investigación evaluó los siguientes sustratos: arroz, puntilla-granza, puntilla-granza-linaza y puntilla-broza, por medio de diferentes condiciones y determino que los mejores sustratos para propagar fueron puntilla-granza-linaza y puntilla-granza. Avalos, (2016) reporta el cultivo de *Trichoderma* en cinco sustratos para la elaboración de un biofungicida como medios de propagación en donde principalmente utilizó la cascarilla de arroz y arroz partido. Para comprobar que la estabilidad del producto cambia dependiendo del sustrato usado para la formulación, entonces comprueba que el tratamiento más eficaz es el sustrato de harina de trigo.

**Medios de cultivo para *Trichoderma ssp.*** Este hongo se desarrolla en una gran cantidad de medios, lo que facilita la reproducción y su uso para la agricultura.

Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Es un medio que por lo regular es muy usado ya que sirve para aislar la mayoría de hongos. Algunos de ellos como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Verticillium*, *Trichoderma* y *Metarhizium*, debido a que crecen y presentan una muy buena esporulación (Cadeño *et al.*, 2004).

Medio Murashige & Skoog. Particularmente el medio MS es muy usado si se tiene como objetivo el de regenerar plantas. De manera que incluye algunas sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos (Cadeño *et al.*, 2004).

Medio Czapek Czapek. Es uno de los medios semisintético que se utiliza en el cultivo de hongos, ya que contiene nitrato de sodio como su única fuente de nitrógeno. Es un medio que tiene su composición química definida (Acosta *et al.*, 2016).

**Producción de metabolitos secundarios.** Para poder sobrevivir y competir el hongo *Trichoderma* tiene la capacidad de producir diversos metabolitos secundarios como las micotoxinas y alrededor de 100 moléculas no polares y algunas de bajo peso molecular que tienen la característica de ser antibióticas, algunas de ellas como lo son las pironas, policetidos, terpenos, butelinolidas, auxinas, esteroides y metabolitos derivados de aminoácidos (Jelen *et al.*, 2013). Este hongo también produce gran diversidad de compuestos no volátiles, entre ellos, algunos alcaloides y un número importante de antibióticos peptídicos (4-Heptanona, Trichodermamida A, Acido-indolacético, 3-Octanona, Viridin, Bergamoteno, 6-Pentil-2H-piran-2-ona y Valerianol) Para que se dé la producción de los metabolitos secundarios tienen que intervenir diferentes factores ambientales como lo es el pH, los nutrientes, luz y el impacto por lesiones físicas (Sivasithamparam *et al.*, 2002; Vinale *et al.*, 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento.

Este experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Buenavista, Saltillo Coahuila, ubicada en las coordenadas geográficas de 25° 21' 13" latitud N y 101° 1' 56" longitud oeste, con una altura de 1,742 msn.



**Figura 1.** Departamento de parasitología, UAAAN 2020

**Material biológico.** Para la realización de esta investigación se trabajó con cuatro especies diferentes de hongos *Trichodermas* spp. Estos microorganismos fueron proporcionados de la colección del Departamento de Parasitología en su área de Microbiología.

- THZ = *Trichoderma harzanium*
- TA = *Trichoderma asperellum*
- TL = *Trichoderma lignorum*
- TY = *Trichodema yunnanense*

**Preparación del medio.** En el desarrollo del experimento se utilizó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Este medio fue preparado al pesar 19.5 g del medio (MCD LAB), se depositó en matraz Erlenmeyer de 1 L, se agregó medio litro de agua destilada,

se tapó con torunda de algodón, se colocó en una parrilla eléctrica para que se diluyera en el agua y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 libras de presión. Posteriormente, a temperatura ambiente se enfrió, se vació en cajas Petri de plástico estériles de 90 mm, dejándolas reposar por 24 h, y se activaron las cepas en estas cajas Petri.



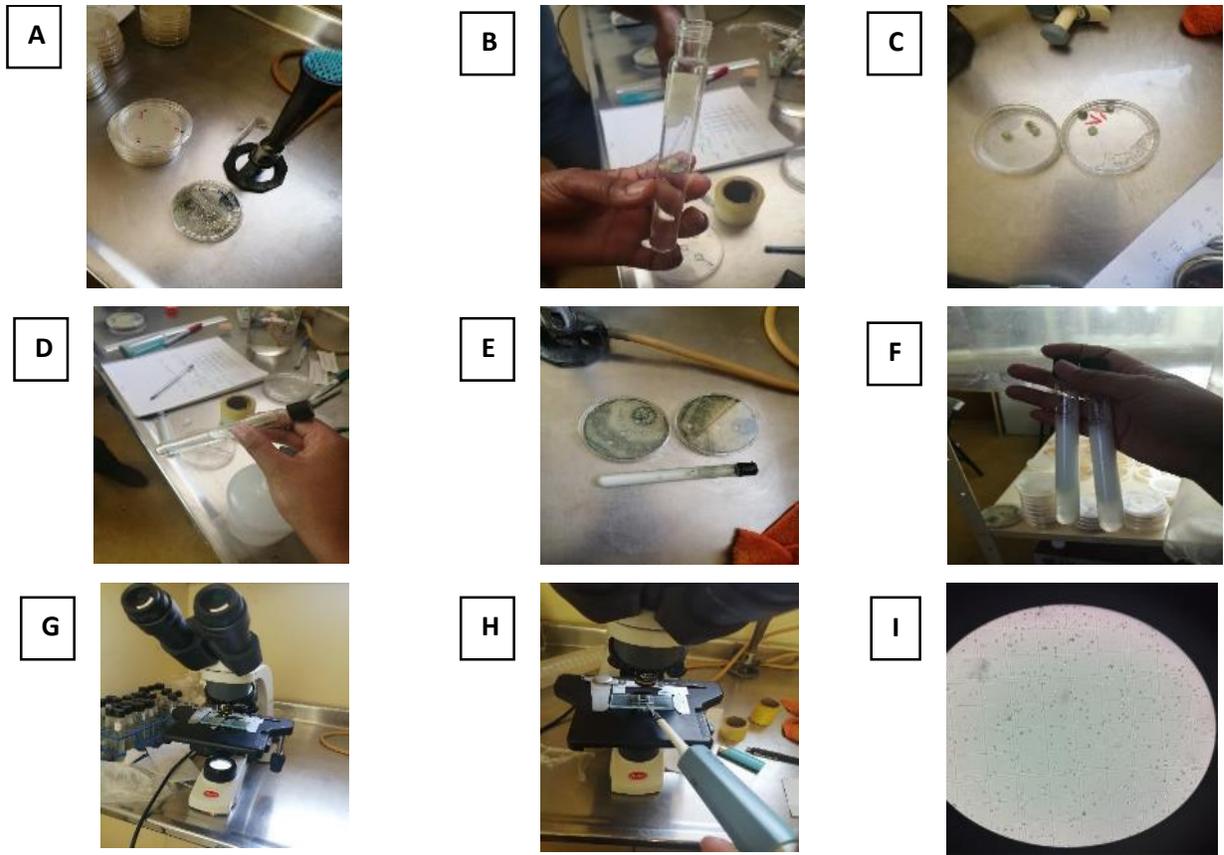
**Figura 2.** Preparación del medios de cultivo en el Laboratorio de Parasitología

**Compatibilidad entre especies de *Trichoderma* spp.** Las cepas originales se activaron en el medio de cultivo PDA. Transcurridos 10 días después de la siembra (dds) de las cepas, se tomó un explante circular de 5 mm de diámetro (PDA más el hongo en crecimiento), para cada tratamiento se sembraron las diferentes especies de *Trichoderma* en diferentes puntos de las cajas Petri, empezando con dos confrontaciones de diferentes especies, se hizo la siembra a los extremos de la caja Petri, la segunda confrontación se realizó con tres especies al realizar la siembra en los puntos de intersección de un triángulo equilátero y por último se realizó la siembra en los cuatro puntos cardinales de la caja Petri. Las cajas Petri de todos los tratamientos fueron selladas con plástico kleen pack e incubadas a  $26^{\circ} \pm 2$ .

**Tabla 1** Criterios para determinar la compatibilidad por el ancho de la barrera entre especies de *Trichoderma* spp. (Ortuño *et al.*, 2013).

Ancho de la barrera (cm)	Compatibilidad	Características
0.7- 1.0	Incompatible	Barrera firme
0.5-0.6	Incompatible	Barrera extensa
0.4-0.5	Confrontable	Barrera gruesa
0.2-0.3	Diferente	Barrera delgada
0.1-0.2	Compatible	Barrera perceptible
0	Individual	Sin Barrera

**Conteo de conidios.** Transcurridos 10 dds de cada confrontación de las especies de *Trichoderma* evaluadas, se realizó el conteo de conidios con la cámara de Neubauer. Se utilizó agua destilada estéril acondicionada con bionex (3 ml/l), se adicionaron 10 ml del agua destilada estéril a las cajas Petri por cada tratamiento (dos, tres y cuatro *Trichoderma* spp. confrontados) y se recuperaron los 10 ml con la solución madre (agua y conidios). La solución madre se agitó manualmente durante 30 seg y se hicieron diluciones para poder hacer el conteo de conidios. La cámara Neubauer se colocó en el microscopio, para asegurar su estabilidad, se aplicó cada solución con una micropipeta en las hendiduras de la cámara asegurándose que no se formaran burbujas, se dejó reposar por un minuto y se hicieron las observaciones con el objetivo 40x para realizar los conteos de los conidios. Los conidios contados se transformaron a conidios/ml por la fórmula citada por Aguilar *et al.*, (2016).



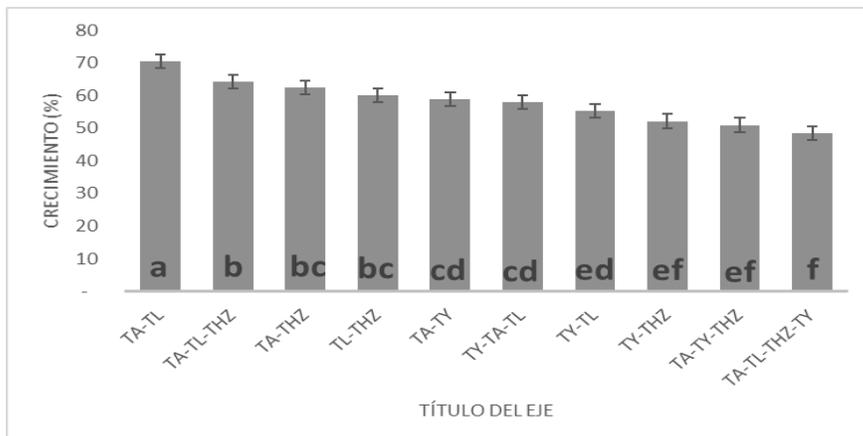
**Figura 3** Procedimiento para la realización del Conteo de conidios. A) placa de *Trichoderma* sp. B) Toma de suspensión de conidios de placa, C) Placa original sin conidios, D) Suspensión de conidios, E) Placa de *Trichoderma* ssp. y tubo con suspensión de conidios, F) Tubos con suspensión de conidios agitados manualmente, G) Cámara de Neubauer en microscopio, H) Enfoque y conteo de conidios y I) Campo de observación de conidios al microscopio.

### **Análisis estadístico.**

Para diferenciar los tratamientos, los datos obtenidos se analizaron bajo un diseño completamente al azar. De igual manera se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias según Tukey ( $p=0,05$ ) en el paquete estadístico Statical Analysis System (SAS) 1992.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Compatibilidad en crecimiento de *Trichoderma* spp.** De las diferentes combinaciones que se realizaron con las especies de *Trichoderma*, se obtuvo mayor compatibilidad en la combinación *T. asperellum* y *T. lignorum*, como se puede observar en la figura 4. En este contexto, la combinación de *T. asperellum*, *T. lignorum* y *T. harzanium* presentaron una compatibilidad por arriba del 50%. Con ayuda de un vernier digital se realizaron mediciones de crecimiento frontal y se determinó la compatibilidad con la fórmula de concentración inhibitoria fraccionada (FIC) consultada en la investigación de Sueke *et al.*,(2010).



**Figura 4.** Crecimiento micelial de especies de *Trichoderma* en combinación

**Esporulación de la confrontación de *Trichoderma* spp.** De las diferentes confrontaciones que se llevaron a cabo (dos, tres y cuatro) se encontró que algunas de las combinaciones de las especies de *Trichoderma* spp. fueron compatibles (tabla 2). El hongo *Trichoderma lignorum* presentó la mayor esporulación con 44.2 mil de conidios/mL, esta misma cepa al ser combinada con *T. asperellum*, en conjunto, esporularon más (20.4 mil) que todas las combinaciones evaluadas con dos cepas

confrontadas. Por separado, la cepa de *T. asperellum* tuvo una esporulación de 12.9 mil conidios/mL, la esporulación de *T. lignorum* y *T. asperellum*, en evaluación por separado, en promedio fue de 28.55 mil conidios/mL, tomando de referencia el dato anterior se observa que la combinación de estas dos cepas disminuyó un 29 % en la esporulación que las cepas evaluadas por separado. Por su parte, la mejor combinación de tres especies diferentes fue *T. asperellum*, *T. yunannense* y *T. harzanium* con una esporulación de 9.920 mil conidios/mL, con una disminución del 50 % de la esporulación que el promedio de las tres especies por separado. En la combinación de las cuatro especies se encontró una baja esporulación (4.94 mil conidios/ml).

**Tabla 2.** Esporulaci3n de especies de *Trichoderma* solo y en combinaci3n

COMBINACI3N	CONIDIOS/ml	COMBINACI3N	CONIDIOS/ml
TL	4.42x10 <sup>7</sup> a	TA-THZ	5.45x10 <sup>6</sup> def
TA-TL	2.04x10 <sup>7</sup> b	TA-TY	5.38x10 <sup>6</sup> ef
TY-TL	1.46x10 <sup>7</sup> bc	TY-TA-TL	5.02x10 <sup>6</sup> ef
TL-THZ	1.39x10 <sup>7</sup> bcd	TA-TL-THZ-TY	4.94x10 <sup>6</sup> ef
TA	1.29x10 <sup>7</sup> bcde	TY-THZ	4.63x10 <sup>6</sup> ef
TA-TY-THZ	9.92x10 <sup>6</sup> cdef	THZ	2.72x10 <sup>6</sup> f
TA-TL-THZ	9.28x10 <sup>6</sup> cdef	TY	1.66x10 <sup>6</sup> f

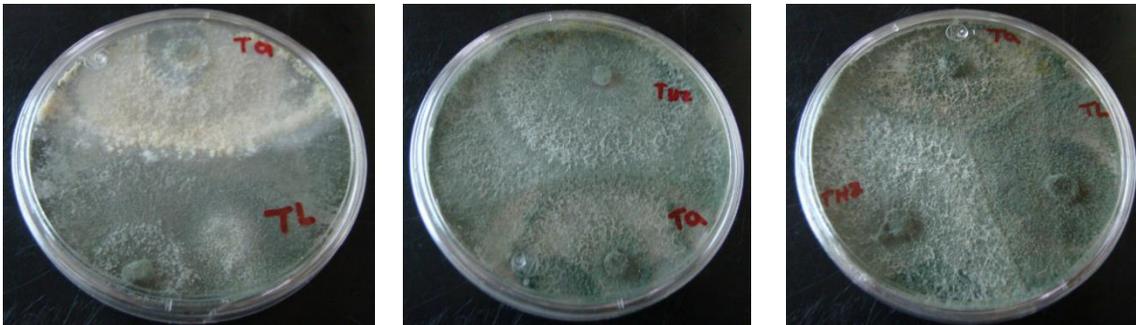
Media estadística con las mismas letras ( a, b, c) son similares estadísticamente (P=0.05); C.V. 34.76555

**Ancho de barrera.** Al realizar las observaciones se encontró compatibilidad entre dos especies, representadas por TL–TA y TA–THZ, por su parte, al combinar tres especies fue compatible la confrontaci3n de TL-TA-THZ. La compatibilidad de las entre especies mencionadas se pueden observar en la Figura 4, donde las imágenes muestran un ancho de barrera delgado, distinguiéndose en las confrontaciones que las especies presentaron diferencias en crecimiento micelial y esporulaci3n, de diferentes coloraciones. Las compatibilidades antes mencionadas fueron registradas en la tabla 3; todo lo anterior, sustenta que TL–TA, TA–THZ y TL-TA-THZ conviven y no inhiben el crecimiento entre ellas.

**Tabla 3** Ancho de barrera de las distintas confrontaciones entre especies de *Trichoderma*

Combinación	Ancho (cm)
TL-TA	0.055
TA-THZ	0.06
TL-THZ	0.27
TY-THZ	0.34
TY-TL	0.48
TY-TA	0.33
TL-TA-THZ	0.08
TY-TL-TA	0.35
TY-TA-THZ	0.44
TA-TL-TY-THZ	0.4

**Figura 5.** Prueba de compatibilidad de diferentes especies de *Trichoderma* a través del ancho de barrera.



TA: *Trichoderma asperellum*, TL: *T. lignorum* y THZ: *T. harzanium*

La aplicación de microorganismos benéficos para las plantas puede reemplazar parcialmente el uso de fertilizantes químicos, este es uno de los efectos benéficos que realiza el hongo *Trichoderma* teniendo un mayor efecto al mezclarlo con fertilizante orgánico (Ye *et al.*, 2020). Las diferentes especies del género *Trichoderma* son las más usadas para el control biológico de las enfermedades causadas por agentes fitopatógenos a las plantas (Woo *et al.*, 2014). Se ha reportado que el uso de

*Trichoderma* combinado con bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, rizobios y hongos micorrízicos arbusculares pueden reducir el uso de agroquímicos y aumentar el rendimiento de la planta, la nutrición y la tolerancia al estrés biótico-abiótico, estos estudios también han demostrado que al recubrir semillas con estos microorganismos ayudan a los cultivos a mejorar el establecimiento y la germinación de las plántulas o lograr altos rendimientos y calidad de los alimentos, bajo una reducción de la fertilización química. El uso de especies de *Trichoderma* antagonistas con diferentes modos de acción son un reto y una vía para la elaboración de consorcios comerciales, donde los aislados nativos en evaluaciones *in vitro* son importantes pruebas que reducen la variabilidad en el control biológico *in vivo*, esto también, puede favorecer el sinergismo con otros agentes biocontroladores (Benítez *et al.*, 2004). Los resultados de esta investigación concuerdan con los encontrados por Ortuño *et al.*, (2013), ellos demostraron la compatibilidad de consorcios de especies de *Trichoderma* y observaron un efecto benéfico en las plantas. Este mismo efecto se ha demostrado con especies incompatibles de *Trichoderma citrinoviride* y *T. harzianum*, las cuales, reducen el parasitismo de *Meloidogyne incognita* y mejoran el crecimiento de la planta, lo que los hace factible para ser ingredientes activos de bioplaguicidas (Koh *et al.*, 2018). Lo anterior, concuerda en cierta manera con esta investigación, ya que, se demostró que las diferentes especies *Trichoderma* en condiciones *in vitro* pueden crecer y esporular, siendo promisorios para ser combinados y evaluados en condiciones de experimentación en campo.

## CONCLUSIÓN

Existe compatibilidades en crecimiento, esporulación y ancho de barrera entre las especies fue *T. asperellum*- *T. lignorum* y *T. asperellum*-*T. harzianum* y así como también especies como *T. asperellum* (TA)-*T. yunannense* (TY)-*T. harzianum* (THZ) y *T. lignorum*-*T. asperellum*-*T. harzianum*. Se comprueba la compatibilidad *in vitro* entre especies de *Trichoderma* lo que facilitará la toma de decisiones para efectuar mezclas de este antagonista para estudios de investigación y empleo en invernadero y campo.

## LITERATURA CITADA

- Acosta Toro, O. A. (2016). Comportamiento de *Trichoderma* spp. bajo diferentes condiciones de laboratorio (Bachelor's thesis).  
<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/24264>
- Ramos, E. Y. A., Navarro, R. I. Z., Zumaqué, L. E. O., & Violeth, J. L. B. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 23-34.
- Aguilar-Ulloa, W., Arce-Acuña, P., Galiano-Murillo, F., & Torres-Cruz, T. J. (2016). Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Revista Tecnología en Marcha*, 29, 5-14.
- Ahmad, JS y Baker, R. (1987). Competencia de la rizosfera de *Trichoderma harzianum*. *Fitopatología*, 77 (2), 182-189.
- Argumedo-Delira, R., Alarcon, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* spp. y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 257-269.
- Ávalos, Guilcapi, Geoconda, y Verónica. (2016) Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida en formulación líquida. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador pp.
- Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón, (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7(4) 249-260.  
<http://scielo.isciii.es/pdf/im/v7n4/Benitez.pdf>
- Cadeño, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 pag.  
Disponible

en:[https://www.researchgate.net/publication/282875779\\_Manual\\_de\\_laboratorio\\_para\\_el\\_manejo\\_de\\_hongos\\_entomopatgenos](https://www.researchgate.net/publication/282875779_Manual_de_laboratorio_para_el_manejo_de_hongos_entomopatgenos)

- Candelerero, D.J., A.J. Cristóbal, R.A. Reyes, S.J.M. Tun S., A.M.M. Gamboa A., S.E. Ruíz, (2015). *Trichoderma spp.* promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagoni- cas contra *Meloidogyne incognita*. Revista Internacional de Botanica Experimental φYTON 84: 113-119.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* Una revisión. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 14: 15-31.
- Carnero, K. G., Medina, E. L., Salvatierra, C. Z., Castillo, J. D. L. C., & Miranda, W. M. (2013). Efecto biofungicida de *Trichoderma harzianum* y de extractos de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Ricinus communis* sobre *Rhizoctonia solani*. Revista REBIOLEST, 1(1), 43-48.
- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *Trichoderma spp.* para el control biológico de enfermedades. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Paraguay. 14 p.
- Cruz-Triana, A., Rivero-González, D., Martínez-Coca, B., Echevarría-Hernández, A., & Tania-Rodríguez, A. (2017). Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). Cultivos Tropicales, 38(4), 15-21.
- Cucuk C., Kivanci, M.(2008) Effect of carbon source on production of lytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. Journal of Applied Biological Sciences, 2(2): 23-26.
- Díaz J. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana (1994).

- Elgorban, A.M., M.A. Abdel-Wahab, A.H. Bahkali, B.A. Al-Sum, (2014). Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on tomato plants by *Hypocrea lixii* (the teleomorph of *Trichoderma harzianum*). *Clean Soil, Air, Water* 42: 1464-1469.
- Felipe Antón, M. D. R. (2003). Interacciones microorganismos-suelos-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1037834>
- Gamboa A., S.E. Ruíz, (2015). *Trichoderma spp.* promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. *Revista Internacional de Botanica Experimental φYTON* 84: 113-119.
- Gerin, D., Pollastro, S., Raguseo, C., De Miccolis Angelini, R. M., & Faretra, F. (2018). A ready-to-use single-and duplex-TaqMan-qPCR assay to detect and quantify the biocontrol agents *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2073. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02073
- Gómez-Bolívar, T. M. (2017). Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma spp.* mediante fermentación en líquido y sólido. Disponible en:<http://hdl.handle.net/2238/7079>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, (ahead),98-112. doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205.
- Hernández-Ochandía, D., M.G. Rodríguez, B. Peteira, I. Miranda, Y.Arias, B. Martínez, (2015). Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal* 30: 139-147.
- Hewedy, O. A., Abdel-Lateif, K. S., Bakr, R. A. (2019). Genetic diversity and biocontrol efficacy of indigenous *Trichoderma* isolates against *Fusarium* wilt of pepper. *Journal of Basic Microbiology*. 2019, 1-10. doi: 10.1002/jobm.201900493

- Hjeljord, L., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP.(Eds), 2, 131-151.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y., (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21
- Jeleń, H., Błaszczyk, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2014). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*, 13(3), 589-600.
- Koh, M., Amalia, F., Cristóbal, A. J., Reyes, R. A., Tun, S. J. M., Gamboa, A. M., Islas, F. I. R. (2018). Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*. *Scientia fungorum*, 47, 37-45. <http://www.scielo.org.mx/pdf/sf/v47/2594-1321-sf-47-37.pdf>
- Lorito, M., Harman, G., Prieto, A. D., Hayes, C. (1990). Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. *Phytopathology*, 82(10), 10-77.
- Martinez, M. A., Roldán A., Pascual J.A. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology* 47: 98- 105. 2011.
- Martínez, M. A., Roldán, A., & Pascual, J. A. (2011). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology*, 47(2), 98-105.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Melgarejo, P., Cal, A. D., & M.-Sagasta, E. (1989). Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. *Canadian Journal of Botany*, 67(1), 83-87.

- Mendoza, G.A.T., J.H. Wilson, J.C. Colina, (2013). Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Revista Científica de Estudiantes. Trujillo Perú.1: 65-71.
- Núñez, N. N. (2012). Evaluación del potencial de *Trichoderma* spp. y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.). Disponible en: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/603>
- Ortuño, N., C. Miranda, M. Claros, (2013). Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Journal Selva Andina Biosphere 1: 16-4. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2308-38592013000100003](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592013000100003).
- Papavizas, GC; Lewis JA & Abd-Elmoity, TH. (1982). "Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities". Phytopathology 72: 126-132.
- PLM México Agroquímicos. (2019). Diccionario de especialidades agroquímicas. Modos de acción - Agricultura orgánica. <http://www.agroquimicos-organicosplm.com/trichoderma-harzianum-486-11>.
- Rivas, W. (2001). Evaluación de Solarización y tres dosis de *Trichoderma harzianum rifai* para el control del Damping off, *Fusarium* spp. y, *Phytium* spp. en lechuga (*lactuca sativa*). Tesis de grado. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo p. 13-20.
- Rocha, I. D. S., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Vosátka, M., Freitas, H., Oliveira, R. S. (2019). Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1357. Doi: 10.3389/fpls.2019.01357.

- Rodríguez. I. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana, 1990.
- Rojan P. J.; Tyagy R. D.; Prévost D.; Satinder K. B.; Pouleur S.; Surampalli R. Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29: 1452-1459. 2010.
- Salazar, L., Sanabria, N., Aponte, G., Alcano, M., Herrera, R., Colmenares, D., ... & Magaña, S. (2011). Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la *fusariosis* del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *Bioagro*, 23(3), 185-190.
- Simkovic, M., Ditte, P., Kurucova, A., Lakatos, B., Varecka, L. U. (2008). Ca<sup>2+</sup>- dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(4), 291-298.
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (2002). Secondary metabolism in *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, 1, 139. Taylor y Francis.
- Sivila, N., & Alvarez, S. (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. *Tecnologías para la agricultura familiar. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar*. Primera edición. San salvador de Jujuy: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy. Universitaria de Jujuy. Pag 44.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía*. Universidad del Zulia, 16(5), 509-516.
- Ulloa, C. J. (1996). Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. In *Actas del V de Simposio de control biológico, Anais: Conferencias y Palestras, Foz de Iguazu-arana-Brasil* pag 234-238.
- Vázquez, M. M., César, S., Azcón, R., & Barea, J. M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*,

*Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*, 15(3), 261-272.

Vero, S. M., & Mondino, P. (1999). Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura internacional*, 7, 1-10.

Villegas MA. (2005) *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=VE2007400595>

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.

Virgen, C. G. (2016). Curso On Line Uso de Microorganismos para el control de Enfermedades del Suelo y Estimulación del Crecimiento de Plantas. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/mecanismos-de-accion-de-microorganismos-para-el-control-de-enfermedades-en-el-suelo>

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1).

Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Li, J., Zou, Z., Cao, K. (2020). Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11. Doi: 10.1038/s41598-019-56954-2.

Zhang S., Y. Gan, B. Xu, (2015). Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology* 94: 21-29.

Zhang, S., Y. Gan, B. Xu, Y. Xu, (2014). The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. *Biological Control* 72:1-8.

## ANEXOS

---

Sistema SAS

5

---

16:52 Thursday, November 18, 2019

## Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para espora

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente

tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	56
Error de cuadrado medio	1.485E13
Valor crítico del rango estudentizado	4.95664
Diferencia significativa mínima	8.54E6

---

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

---

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
--------------------	-------	---	------

---

---

		A		44212500	5	TL
		B		20407500	5	TA-TL
		B				
C		B		14606250	5	TY-TL
C		B				
C		B	D	13950000	5	TL-THZ
C		B	D			
C	E	B	D	12925000	5	TA
C	E		D			
C	E	F	D	9920000	5	TA-TY- THZ
C	E	F	D			
C	E	F	D	9287500	5	TA-TL- THZ
	E	F	D			
	E	F	D	5450000	5	TA-THZ
	E	F				
	E	F		5387500	5	TA-TY
	E	F				
	E	F		5020833	5	TY-TA- TL
	E	F				
	E	F		4943750	5	TA-TL- THZ-TY
	E	F				
	E	F		4693750	5	TY-THZ
		F				
		F		2725000	5	THZ
		F				

---

---

F	1662500	5	TY
---	---------	---	----

---



---

Sistema SAS 3

16:52 Thursday, November 18, 2019

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

Trat 14 TA TA-THZ TA-TL TA-TL-THZ TA-TL-THZ-TY TA-TY TA-TY-  
THZ THZ TL TL-THZ TY TY-TA-TL TY-THZ TY-TL

Número de observaciones 70

---



---

Sistema SAS 4

16:52 Thursday, November 18, 2019

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: espora

Fuente	Suma de DF	Cuadrado de cuadrados	la media	F-Valor	Pr >
Modelo	13	7.7557325E15	5.9659481E14	40.17	<.0001

---

---

Error                    56    8.317048E14    1.4851871E13

Total correcto            69    8.5874373E15

R-cuadrado    Coef Var    Raiz MSE    espora Media

0.903149    34.76555    3853813    11085149

Cuadrado de

Fuente                    DF    Anova SS    la media    F-Valor    Pr > F

trat                    13    7.7557325E15    5.9659481E14    40.17    <.0001

---

---

Sistema SAS

1

16:52 Thursday, November 18,

2019

Obs	trat	Rept	espora
1	TA	1	13700000
2	TA	2	13150000
3	TA	3	13100000
4	TA	4	11750000
5	TA	5	12925000
6	TA-THZ	1	4350000
7	TA-THZ	2	3925000
8	TA-THZ	3	6800000
9	TA-THZ	4	6725000
10	TA-THZ	5	5450000

---

---

11	TA-TL	1	18700000
12	TA-TL	2	20350000
13	TA-TL	3	21450000
14	TA-TL	4	22000000
15	TA-TL	5	19537500
16	TA-TL-THZ	1	7516667
17	TA-TL-THZ	2	6383333
18	TA-TL-THZ	3	10766667
19	TA-TL-THZ	4	12483333
20	TA-TL-THZ	5	9287500
21	TA-TL-THZ-TY	1	3525000
22	TA-TL-THZ-TY	2	2987500
23	TA-TL-THZ-TY	3	6350000
24	TA-TL-THZ-TY	4	6912500
25	TA-TL-THZ-TY	5	4943750
26	TA-TY	1	3550000
27	TA-TY	2	4350000
28	TA-TY	3	6525000
29	TA-TY	4	7125000
30	TA-TY	5	5387500
31	TA-TY-THZ	1	9600000
32	TA-TY-THZ	2	10366667
33	TA-TY-THZ	3	10066667
34	TA-TY-THZ	4	9550000
35	TA-TY-THZ	5	10016667
36	THZ	1	1450000

---

---

37	THZ	2	1900000
38	THZ	3	4650000
39	THZ	4	2900000
40	THZ	5	2725000
41	TL	1	40100000
42	TL	2	66300000
43	TL	3	35250000
44	TL	4	35200000
45	TL	5	44212500
46	TL-THZ	1	9050000
47	TL-THZ	2	10750000
48	TL-THZ	3	16125000
49	TL-THZ	4	19875000
50	TL-THZ	5	13950000
51	TY	1	1700000
52	TY	2	1800000
53	TY	3	1350000
54	TY	4	1800000
55	TY	5	1662500
56	TY-TA-TL	1	4500000
57	TY-TA-TL	2	4566667
58	TY-TA-TL	3	5133333
59	TY-TA-TL	4	5883333
60	TY-TA-TL	5	5020833
61	TY-THZ	1	4775000
62	TY-THZ	2	6700000

---

63	TY-THZ	3	3225000
64	TY-THZ	4	4075000
65	TY-THZ	5	4693750
66	TY-TL	1	13275000
67	TY-TL	2	12625000
68	TY-TL	3	14700000
69	TY-TL	4	17825000
70	TY-TL	5	14606250

---

Sistema SAS 5

17:09 Thursday, November 18, 2019

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para crec

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente

tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	40
Error de cuadrado medio	4.89
Valor crítico del rango estudentizado	4.73453
Diferencia significativa mínima	4.6822

---

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

---

Tukey Agrupamiento		Media	N	trat
	A	70.6	5	TA-TL
	B	64.4	5	TA-TL- THZ
C	B	62.6	5	TA-THZ
C	B			
C	B	60.2	5	TL-THZ
C				
C	D	59	5	TA-TY
C	D			
C	D	58	5	TY-TA-TL
	D			
E	D	55.4	5	TY-TL
E				
E	F	52.2	5	TY-THZ
E	F			
E	F	51	5	TA-TY- THZ
	F			
	F	48.6	5	TA-TL- THZ-TY

---

Sistema SAS 3

17:09 Thursday, November 18, 2019

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

trat 10 TA-THZ TA-TL TA-TL-THZ TA-TL-THZ-TY TA-TY TA-  
TY-THZ TL-THZ TY-TA-TL TY-THZ TY-TL

Número de observaciones 50

---

Sistema SAS 4

17:09 Thursday, November 18, 2019

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: crec

Suma de	Cuadrado de				
Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr >

Modelo	9	2020.400000	224.488889	45.91	<.0001
--------	---	-------------	------------	-------	--------

Error	40	195.600000	4.890000		
-------	----	------------	----------	--	--

Total correcto	49	2216.000000			
----------------	----	-------------	--	--	--

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	crec Media
------------	----------	----------	------------

---

---

0.911733 3.799544 2.211334 58.20000

Cuadrado de

Fuente	DF	Anova SS	la media	F-Valor	Pr >
F					
trat	9	2020.400000	224.488889	45.91	<.0001

---

---

Sistema SAS

1

17:09 Thursday, November 18, 2019

Obs	Trat	rept	Crec
1	TA-THZ	1	66
2	TA-THZ	2	58
3	TA-THZ	3	54
4	TA-THZ	4	61
5	TA-THZ	5	64
6	TA-TL	1	68
7	TA-TL	2	71
8	TA-TL	3	73
9	TA-TL	4	69
10	TA-TL	5	72
11	TA-TL-THZ	1	61
12	TA-TL-THZ	2	62
13	TA-TL-THZ	3	65
14	TA-TL-THZ	4	66
15	TA-TL-THZ	5	68

---

---

16	TA-TL-THZ-TY	1	46
17	TA-TL-THZ-TY	2	51
18	TA-TL-THZ-TY	3	50
19	TA-TL-THZ-TY	4	47
20	TA-TL-THZ-TY	5	49
21	TA-TY	1	59
22	TA-TY	2	58
23	TA-TY	3	60
24	TA-TY	4	58
25	TA-TY	5	60
26	TA-TY-THZ	1	52
27	TA-TY-THZ	2	50
28	TA-TY-THZ	3	52
29	TA-TY-THZ	4	48
30	TA-TY-THZ	5	53
31	TL-THZ	1	57
32	TL-THZ	2	61
33	TL-THZ	3	62
34	TL-THZ	4	59
35	TL-THZ	5	62
36	TY-TA-TL	1	58
37	TY-TA-TL	2	59
38	TY-TA-TL	3	58
39	TY-TA-TL	4	55
40	TY-TA-TL	5	60
41	TY-THZ	1	50

---

---

42	TY-THZ	2	52
43	TY-THZ	3	51
44	TY-THZ	4	54
45	TY-THZ	5	54
46	TL-TY	1	54
47	TL-TY	2	57
48	TL-TY	3	58
49	TL-TY	4	56
50	TL-TY	5	52

---