



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

“Estudio de la respuesta del hongo *Trichoderma atroviride* a  
la presencia de la planta *Arabidopsis thaliana*”

Tesis que presenta

**Ana Fernanda Flores Enríquez**

Para obtener el grado de

**Maestra en Nanociencias y Materiales**

**Directores de tesis:**

**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**

**Dr. J. Sergio Casas Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., abril 2024



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudio de la respuesta del hongo *Trichoderma atroviride* a la presencia de la planta *Arabidopsis thaliana*”** presentada para obtener el Grado de Maestra en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Ana Fernanda Flores Enríquez** y aprobada el 3 de abril del 2024 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dr. Braulio Gutiérrez Mediana**  
Codirector de la tesis

---

**Dr. J. Sergio Casas Flores**  
Codirector de la tesis

---

**Dr. Haret-Codratian Rosu**  
Miembro del Comité Tutorial



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Nanoestructuras I de la División de Materiales Avanzados y el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los Dr. Braulio Gutiérrez Medina y el Dr. J. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (1151892) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través del Proyecto CF-2023-G-542 denominado: "Añadiendo una nueva dimensión a las redes biológicas: La arquitectura del micelio tridimensional y su importancia en la búsqueda y el transporte de recursos para el desarrollo de hongos filamentosos", el cual fue aprobado en el marco de la Convocatoria de "Ciencia de Frontera 2023", otorgado a Braulio Gutiérrez Medina.

# Acta de examen

## Dedicatorias

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional en esta travesía.

## Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por permitirme ser parte de su comunidad, así como brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones para realizar mi proyecto.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) dado que me brindo apoyo financiero para mi formación académica.

A mis directores de tesis el Dr. Braulio Gutiérrez Medina y el Dr. J. Sergio Casas Flores, por su apoyo, guía, disponibilidad y enseñanza a lo largo de este proyecto. De igual forma a mi comité tutorial, el Dr. Haret-Codratian Rosu por su contribución en sus comentarios para desarrollar este proyecto.

Al Dr. Saul Jijón Moreno, por brindarme las herramientas necesarias para realizar los experimentos de este proyecto.

A mi familia y amigos por su apoyo en todo momento a lo largo de esta formación.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos Institucionales	i
Acta de examen	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabla	viii
Resumen	1
Abstract	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1 La importancia de las alteraciones biológicas en los ecosistemas.	5
1.1.1 Clasificación de interacciones biológicas.	5
1.1.2 El interés en el estudio de las interacciones entre los hongos y las plantas.	7
1.2 Las alteraciones morfológicas en hongos en respuesta a señales externas.	8
1.3 El hongo de <i>Trichoderma atroviride</i> como hongo modelo.	11
1.4 El estudio de <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.	13
1.5 Los cambios morfológicos que se observan en interacciones entre <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> .	15
1.6 El Microscopio óptico de Campo Claro.	16
1.6.1 Las aplicaciones del microscopio óptico: La video microscopia.	17
1.7 El procesamiento digital de imágenes: Técnicas utilizadas.	18
1.8 Hipótesis.	20
1.9 Planteamiento del problema.	20
1.10 Objetivos.	20
1.10.1 Objetivo general.	20
1.10.2 Objetivos particulares.	20
<b>2. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>22</b>
2.1 La Preparación de organismo.	22

2.1.1 El hongo <i>Trichoderma atroviride</i> .	22
2.1.2 La planta <i>Arabidopsis thaliana</i> .	24
2.2 El desarrollo para la elaboración de la minicámara.	25
2.3 Las condiciones experimentales para el sistema de observación.	26
2.4 La Construcción de la caja negra.	27
2.5 La adquisición y el procesamiento de imágenes.	28
2.5.1 Reducción del tamaño del stack.	30
2.5.2 Calibración y eliminación de ruido.	31
2.5.3 Selección de intervalo espacial.	32
2.5.4 Ajuste de contraste y brillo.	32
2.5.5 Threshold.	32
2.5.6 Binarizar y eliminar partículas.	32
2.5.7 Esqueletización.	33
2.5.8 Tracking Mate.	33
2.6 El análisis de datos.	34
<b>3. RESULTADOS</b>	36
3.1 El crecimiento de organismos: <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Arabidopsis</i> .	36
3.2 La minicámara de crecimiento.	37
3.3 La construcción de la caja negra.	38
3.4 La adquisición y el procesamiento de imágenes.	40
3.5 El análisis de datos.	44
3.5.1 La distancia de crecimiento del micelio.	46
3.5.2 La velocidad de crecimiento apical y frente de colonia.	47
3.5.3 El análisis del crecimiento de colonia a nivel macroscópico.	52
<b>4. CONCLUSIONES</b>	58
<b>5. PERSPECTIVAS</b>	60
<b>6. REFERENCIAS</b>	61
<b>7. ANEXOS</b>	68

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ejemplos de tipos de simbiosis.	6
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de estudios de cambios morfológicos en hongos patógenos.	10
<b>Figura 3.</b> Fotografía de microscopia de cambios morfológicos de <i>Trichoderma</i> spp. al colonizar tipos de plantas modelo.	11
<b>Figura 4.</b> Caja de Petri con colonia de <i>Trichoderma atroviride</i> .	12
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de la planta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
<b>Figura 6.</b> Partes que conforma al microscopio óptico compuesto.	17
<b>Figura 7.</b> Procesamiento de imágenes usando video microscopia.	18
<b>Figura 8.</b> Línea de tiempo para el crecimiento de la plántula y el hongo.	22
<b>Figura 9.</b> Proceso para obtener los conidios frescos.	23
<b>Figura 10.</b> Diagrama del proceso de crecimiento de la planta.	25
<b>Figura 11.</b> Diagrama del proceso de trasplante de la plántula e inoculación del hongo a la minicámara.	26
<b>Figura 12.</b> Diagrama del acomodo del sistema de observación en la cámara oscura.	28
<b>Figura 13.</b> Programa para la captura de imágenes de AmScope.	29
<b>Figura 14.</b> Procesamiento de imágenes para la reducción del tamaño del stack y elección del área de observación.	31
<b>Figura 15.</b> Procesamiento de imágenes por ROI.	34
<b>Figura 16.</b> Proceso para la obtención de datos haciendo una captura y análisis de imágenes.	35
<b>Figura 17.</b> Resultados para el crecimiento de <i>Trichoderma</i> .	37
<b>Figura 18.</b> Plántula y conidios día uno, en la cámara de crecimiento.	38
<b>Figura 19.</b> Sistema de observación, cámara oscura para el microscopio y caja computadora.	39

<b>Figura 20.</b> Prueba de estabilidad de la cámara oscura.	40
<b>Figura 21.</b> Resultados en el procesamiento de imágenes para reducción y calibración de imagen, prueba control.	41
<b>Figura 22.</b> Resultados en el procesamiento de imágenes para reducción y calibración de imagen, prueba hongo-planta.	42
<b>Figura 23.</b> Procesamiento de imágenes para obtener datos en muestra hongo-planta.	43
<b>Figura 24.</b> Observación de la formación de un frente de colonia denso, donde vemos las diferentes etapas y tiempos en que sucedió.	44
<b>Figura 25.</b> Trayectoria de un ejemplo de muestra de hifa.	46
<b>Figura 26.</b> Gráficas correspondientes a la velocidad promedio de las muestras del control.	49
<b>Figura 27.</b> Gráficas correspondientes a la velocidad promedio de las muestras o interacción hongo plántula.	50
<b>Figura 28.</b> Gráfica comparativa de todas las muestras de la velocidad.	51
<b>Figura 29.</b> Gráfica comparativa de los promedios de la velocidad total de todas las muestras.	52
<b>Figura 30.</b> Gráfica correspondiente a los diámetros promedios de los tres casos en ambas situaciones conforme pasa el tiempo.	54
<b>Figura 31.</b> Fotografías de los cambios morfológicos de la colonia control de 48 h y 72 h.	56
<b>Figura 32.</b> Fotografías de los cambios morfológicos de la colonia hongo-planta de 24 h, 48 h y 72 h.	57

## Lista de Tabla

<b>Tabla 1.</b> Distancias de las cinco muestras control con su desviación.	47
<b>Tabla 2.</b> Distancias de las cinco muestras hongo-planta con su desviación.	47
<b>Tabla 3.</b> Velocidad promedio de las cinco muestras control con su desviación.	48
<b>Tabla 4.</b> Velocidad promedio de las cinco muestras de la interacción hongo-plántula con su desviación.	48
<b>Tabla 5.</b> Promedio del diámetro del micelio control al transcurrir 24 h, 48 h y 72 h.	53
<b>Tabla 6.</b> Promedio del diámetro del micelio ante la presencia de la plántula al transcurrir 24 h, 48 h y 72 h.	53
<b>Tabla 7 y 8.</b> Medidas del radio al paso de 48 h, lado A y lado B. Medida del radio al paso de 72 h, lado A y lado B.	55
<b>Tabla 9 y 10.</b> Medidas del radio al paso de 48 h, lado C corresponde al radio de la colonia del hongo control. Medida del radio al paso de 72 h, lado C.	55



## Resumen

En el panorama de una constante evolución de la investigación científica, la integración de la biofísica al campo de la ciencia de los materiales ha surgido como un enfoque interdisciplinario, donde se exploran conocimientos novedosos y técnicas nuevas que convergen en un punto: la biología y la física. Este acercamiento ofrece conocimientos notables sobre el desarrollo de los organismos vivos y su aplicación a principios físicos para descifrar mecanismos de la vida. Por esto mismo, el estudio de las interacciones entre organismos representa una relación compleja que ha atraído gran interés en el campo de la biofísica. El análisis de hongos modelos como *Trichoderma* han sido objeto de un gran número de estudios, ya que se utilizan como agentes de control biológico y estimuladores del crecimiento en plantas, como es el caso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

El enfoque que se dará en este proyecto es examinar la respuesta que tenga el micelio del hongo *Trichoderma atroviride* cuando se encuentra en interacción con la raíz de plántula de *Arabidopsis thaliana*, registrando el crecimiento del hongo filamentoso a nivel hifa y nivel colonia por medio de microscopía óptica de campo claro. Para poder realizar esta observación se construyó un sistema de microscopía que nos permitió hacer capturar una imagen de parte de un micelio cada diez minutos durante 24 h, teniendo como resultado un conjunto de imágenes de lapso de tiempo para ser analizadas por procesamiento digital. La base de los experimentos es estudiar diez muestras donde cinco estarán con presencia de la plántula y las cinco restantes estarán con ausencia de ella. Estas observaciones fueron hechas en condiciones controladas de temperatura (22° C) y humedad (65%), bajo iluminación de luz roja ( $\lambda = 600-650$  nm) para mantener un crecimiento vegetativo en el hongo.

Con el fin de analizar el crecimiento del hongo, se usaron dos softwares (*ImageJ/FIJI* y *Mathematica*) que nos permitieron realizar el procesamiento y estudio de imágenes por muestra. Se obtuvo como resultado la velocidad del crecimiento del ápice de las hifas individuales o el avance del frente de colonia. Se encontró que la velocidad promedio de crecimiento total del hongo es de 4.10  $\mu\text{m}/\text{min}$  en la prueba control (sin planta) y 2.40  $\mu\text{m}/\text{min}$  en la muestra experimental (hongo-plántula). Además, debido a los cambios que fueron observados se realizó un segundo análisis que nos permitió identificar cambios morfológicos en el hongo en ambos casos a nivel macroscópico después de 24 h, 48 h y 72 h. Estos resultados indican existe un reconocimiento a distancia entre el hongo y la raíz de la plántula, capaz de modular la velocidad de crecimiento del hongo y cambiar la forma de la colonia.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, *Trichoderma atroviride*, plantas, hongos, micelio, hifa, morfología, microscopía, interacción, velocidad de crecimiento.

## Abstract

In the context of a constant evolution of scientific research, the integration of biophysics in the field of materials science has emerged as an interdisciplinary approach, where novel knowledge and new techniques are offered that converge at one point; biology and physics, offering remarkable knowledge about the development of living organisms and its application to physical principles to decipher mechanisms of life. For this reason, the study of interactions between organisms represents a complex relationship that has attracted great interest in the field of biophysics. The analysis of model fungi such as *Trichoderma* have been the subject of a large number of studies, since they are used as biological control agents and growth stimulators in plants, as is the case of the model plant *Arabidopsis thaliana*.

The focus that will be given in this project is to examine the response of the mycelium of the fungus *Trichoderma atroviride* when it is in interaction with the seedling root of *Arabidopsis thaliana*, recording the growth of the filamentous fungus at the hyphal level and colony level by means of bright field microscopy. In order to make this observation, a microscopy system was built that allowed us to capture an image of part of a mycelium every ten minutes for 24 hours, resulting in a set of time-lapse images to be analyzed by digital processing. The basis of the experiments is to study ten samples where five will be with the presence of the seedling and the remaining five will be without it. These observations were made under controlled conditions of temperature (22° C) and humidity (65%), under red light illumination ( $\lambda = 600-650$  nm) to maintain vegetative growth in the fungus.

In order to analyze the growth of the fungus, two softwares were used (*ImageJ/FIJI and Mathematica*) that allowed us to process and study images per sample. The speed of growth of the apex of individual hyphae or the advancement of the colony front was obtained as a result. It was found that the average total growth speed of the fungus is 4.10  $\mu\text{m}/\text{min}$  in the control test (without plant) and 2.40  $\mu\text{m}/\text{min}$  in the experimental sample (fungus-seedling). Furthermore, due to the changes that were observed, a second analysis was carried out that allowed us to identify morphological changes in the fungus in both cases at a macroscopic level after 24 h, 48 h and 72 h. These results indicate there is a remote recognition between the fungus and the root of the seedling, capable of modulating the growth speed of the fungus and changing the shape of the colony.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *Trichoderma atroviride*, plants, fungi, mycelium, hypha, morphology, microscopy, interaction, growth rate

# 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la ciencia de los materiales es multidisciplinario y está centrado en la investigación de las propiedades, estructura, procesamiento y aplicaciones de los materiales (Callister, 1985). El área de los biomateriales y la biofísica, al ser campos interdisciplinarios, tienen un papel crucial en el desarrollo de materiales en contextos biológicos y médicos. Por lo anterior, se ha planeado el estudio de diversos organismos modelo (plantas, animales y hongos), en los cuales se pueden aplicar los principios y métodos de la física, química y matemática, con el fin de comprender principios de organización y funcionamiento de los sistemas biológicos.

Una de las investigaciones que ha aportado más información en este campo se debe a los hongos filamentosos, debido a que estos microorganismos pueden ser usados para producir biomateriales y polímeros sostenibles y biodegradables a base de micelio (Jones, 2018) (Goh, 2014).

Los hongos del género *Trichoderma* spp. ha sido utilizado en el área de los materiales, ya que son conocidos por su capacidad para producir enzimas y metabolitos valiosos para la producción de materiales de origen biológico, y en la producción de polímeros biodegradables (Silva, 2017). Del mismo modo, se ha estudiado el impacto que existe en la interacción entre los hongos y plantas (Wubben, 2018), en las cuales los hongos confieren beneficios a las mismas al promover el crecimiento, la inducción de la resistencia a enfermedades, una mejora en la tasa de germinación y tolerancia al estrés biótico y abiótico. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales *Trichoderma* mejora el crecimiento y desarrollo de la planta; aun así, el entendimiento del proceso por el cual se establece esa relación hongo-planta aún no está claro. Se ha llegado a la conclusión de que el hongo tiene la habilidad de incrementar la asimilación de nutrientes y su solubilidad en el suelo, y la modificación en la morfología de la raíz; lo cual contribuye a la búsqueda de agua y nutrientes, síntesis de fitohormonas y la producción de compuestos volátiles (Salazar-Badillo et al., 2015).

Existen interacciones entre hongos filamentosos y plantas, las cuales producen asociaciones simbióticas que pueden ocasionar efectos positivos al estimular en el crecimiento de ambos organismos o, por otro lado, interacciones negativas que incluyan competencia o parasitismo que den como resultado un daño en el crecimiento de uno o ambos organismos (Rebolledo-Prudencio et al., 2020).

En este proyecto, se usará al hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, teniendo como antecedente que se ha demostrado que, este hongo aumenta la producción de raíces laterales, incrementa la longitud de las raíces, hace resistente a la planta ante enfermedades y estimula el crecimiento de los pelos radiculares (Nieto-Jacobo et al., 2017). Este beneficio que le otorga el hongo a la planta es de gran importancia porque le proporciona a la raíz

un anclaje que contribuye a la fácil adquisición de agua y nutrientes provenientes del suelo (Contreras-Cornejo et al., 2009).

En esta investigación, nos enfocaremos en esta respuesta de reconocimiento del micelio en presencia de la raíz de la planta empleando videomicroscopía, con el fin de determinar de manera cualitativa y cuantitativa los cambios morfológicos del hongo durante esta interacción. La manera en que mediremos esta respuesta será obteniendo el promedio de la velocidad de crecimiento en el micelio en dos situaciones, al estar creciendo solo y en presencia de la raíz de la plántula. De igual forma, mediremos de manera macroscópica los cambios que presente el micelio a nivel colonia al paso de 24, 48 y 72 horas.

## **1.1 La importancia de las interacciones biológicas en los ecosistemas**

Las interacciones biológicas son procesos indispensables para los ecosistemas, ya que influyen en la supervivencia y la evolución de las especies. Estas interacciones abarcan una amplia gama de relaciones entre las especies de los ecosistemas complejos, dando forma a la estructura, la dinámica y el funcionamiento de los mismos. En cada uno de los procesos de las interacciones hay consecuencias únicas que pueden variar, desde relaciones cooperativas hasta luchas competitivas, y desempeñan un papel crucial en la determinación de la distribución, abundancia y diversidad de especies dentro de un hábitat determinado (Connell, 1983).

Las interacciones biológicas son dinámicas y pueden cambiar debido a factores como cambios ambientales, cambios climáticos o introducción de nuevas especies. Comprender las implicaciones evolutivas y la importancia ecológica de las relaciones entre especies es fundamental; por ejemplo, para entender la conexión entre especies que impulsa sus adaptaciones a lo largo del tiempo o el equilibrio que mantiene la estructura y el funcionamiento de un ecosistema (Callaway, 2007).

### **1.1.1 Clasificación de las interacciones biológicas**

La interacción entre organismos de distintas especies se conoce como simbiosis, la cual involucra una gran variedad de fenómenos que comparten aspectos centrales como “la vida en común y en contacto entre organismos de diferentes especies” (Margulis, 2002). La simbiosis incluye diferentes tipos de interacciones, por lo que los organismos que están en esta relación se conocen como simbiosiontes y estos pueden verse beneficiados mutuamente, no verse afectados o verse perjudicados en esta relación. En base al tipo de interacción, se presenta la siguiente clasificación:

## Mutualismo

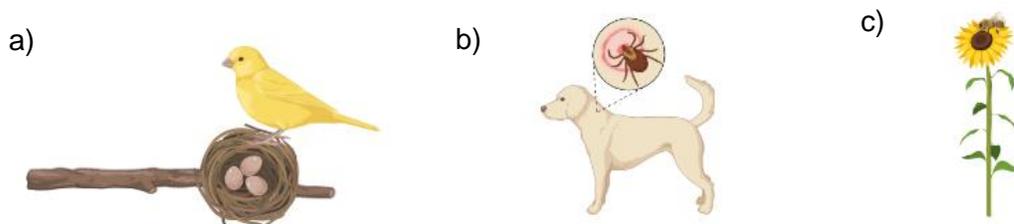
En esta interacción, las especies interactuantes se ven beneficiadas en igual medida, esto implica que la asociación es necesaria para la supervivencia de ambas especies (Sánchez-Guillén, 2021). Un ejemplo de este tipo de simbiosis es el beneficio que le otorga algunos tipos de hongos a las plantas al promover el crecimiento de las mismas, mientras que las plantas le ofrecen refugio al hongo. Otro caso, son las abejas que se alimentan del polen de plantas, mientras que las abejas se llevan el polen de estas esparciéndolo para polinizar otras plantas (Figura 1.c).

## Comensalismo

En este caso, una de las especies involucradas se beneficia, mientras que la otra no recibe ni daños ni beneficios (Sánchez-Guillén, 2021). Un ejemplo de esta simbiosis es la relación que hay entre las lombrices de tierra a diversos tipos de plantas, ya que las lombrices ayudan a crear canales de irrigación que benefician a las plantas. Por otro lado, está el caso de los pájaros que establecen sus nidos en ramas de árboles ya que estos árboles no se ven afectados por dicha alteración, generando un hábitat para el pájaro en el árbol (Figura. 1.a).

## Parasitismo

En este caso, una de las especies interactuantes se ve afectada y en ocasiones esta relación puede ser letal. En este tipo de simbiosis, una especie se beneficia de la otra, siendo denominadas parásito y hospedador, respectivamente. El parásito se nutre del huésped, quitándole los recursos que adquiere y debilitándolo (Sánchez-Guillén, 2021). Un ejemplo de este tipo de simbiosis, son las termitas que infectan a los árboles y los destruyen casi por completo. Otro ejemplo son las garrapatas que habitan el pelaje de animales como los perros, que generan alteraciones en su salud (Figura 1.b).



**Figura 1.** Ejemplos de los tipos de simbiosis. a) Comensalismo, los pájaros establecen sus nidos en ramas de árboles que no se ven afectados por dicha alteración, generando un hábitat para el pájaro en el árbol. b) Parasitismo, en este caso las garrapatas habitan el pelaje de animales como los perros, que generan alteraciones en su salud. c) Mutualismo, en este caso las abejas se alimentan del polen de plantas, por otro lado, las abejas se llevan el polen de las plantas esparciéndolo para polinizar otras plantas.

## **1.1.2 El interés en el estudio de las interacciones entre los hongos y las plantas**

Las interacciones entre hongos y plantas presentan diferentes facetas simbióticas, como relaciones mutualistas en las cuales los hongos ayudan a la planta para absorber nutrientes, dándoles la capacidad de potenciar su crecimiento y resiliencia. A su vez, la planta proporciona carbohidratos a los hongos, presentando así un intercambio beneficioso (Zeilinger et al., 2015). Por lo tanto, se han encontrado evidencias de eventos de una señalización y reconocimiento en esta interacción hongo-planta para ofrecer un intercambio benéfico (Camarena-Gutiérrez 2012).

Las interacciones entre plantas y hongos son un aspecto importante de la ecología y la biología, ya que son caracterizadas por relaciones simbióticas que pueden conducir a adaptaciones significativas en la morfología de ambos organismos, estos cambios les permiten prosperar y coexistir en diversas condiciones ambientales. Estas interacciones son cruciales para la adquisición de nutrientes, la adaptación ambiental y la dinámica general del ecosistema. La importancia del estudio de estas relaciones proporciona información valiosa sobre las complejidades de la interconexión del mundo natural.

Los hongos interactúan de manera positiva o negativa con las raíces de las plantas, ya sea en el ambiente o en el laboratorio de forma controlada, que van desde asociaciones mutuamente beneficiosas o letales. Es por eso por lo que, los hongos se conocen por ser adaptables y diversos teniendo un papel fundamental en el desarrollo vegetal. Por otro lado, las plantas proporcionan alimento y refugio a una gran variedad de especies de hongos. Sin embargo, las interacciones entre estos dos organismos son asociaciones complejas que ocasionan resultados diversos (Zeilinger et al., 2015), puesto que también se tiene relaciones negativas; por ejemplo, existen hongos patógenos que causan enfermedad en las plantas proporcionando una desestabilidad en el huésped.

La parte esencial de estas interacciones está en el intercambio de nutrientes, donde los principales órganos involucrados son las raíces de las plantas y las hifas de los hongos (Camarena-Gutiérrez 2012), en donde ocurre un cambio de recursos que son importantes para su supervivencia. Al ser un proceso que ha ido evolucionando con el paso del tiempo, ha dado como resultado una gran variedad de mecanismos y estrategias por parte de ambos sistemas para lograr una relación positiva, por ejemplo, las plantas han desarrollado estrategias para establecer un crecimiento estable y hacer frente a cualquier estrés biótico o abiótico, por lo tanto, las plantas tienen procesos de reconocimiento selectivo entre los organismos que son beneficiosos o perjudiciales para ellas. Con esto en mente, hace más de 30 años se pensó en una nueva hipótesis, la cual postulaba que los hongos que crecían en el suelo compartían una relación simbiótica beneficiosa con las plantas terrestres (Humphreys et al., 2010).

## 1.2 Las alteraciones morfológicas en hongos en respuesta a señales externas

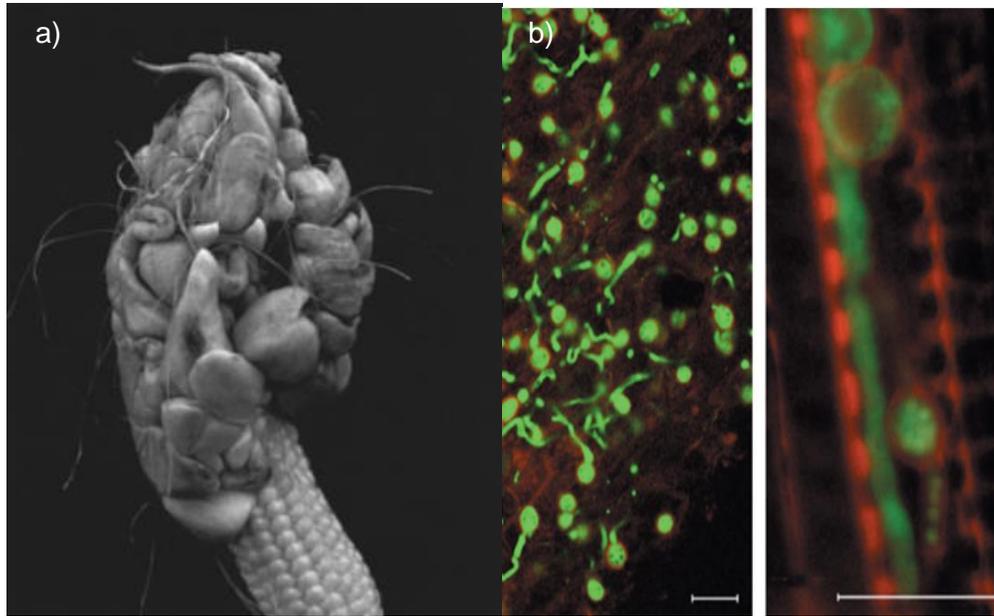
Las rutas de señalización en los hongos desempeñan un papel fundamental en la comprensión de los análisis en los procesos biológicos. Algunos ejemplos de estos procesos son, el crecimiento, la reproducción, la respuesta ante cambios en el medio ambiente. Las vías de señalización fúngica implican la detección y la transducción de señales externas, las cuales son detectadas por receptores o sensores específicos en la superficie de la célula fúngica o dentro de la célula (Santner & Estelle, 2009).

Los hongos conforman un grupo diverso de microorganismos y son componentes integrales de los ecosistemas de todo el mundo. Los hongos muestran cambios morfológicos en respuesta a una variedad de señales externas en su entorno, estos cambios son fundamentales para su supervivencia, crecimiento e interacciones ecológicas. El estudio de cambios morfológicos en hongos es importante para diversas aplicaciones en la biotecnología, las ciencias ambientales, la agricultura y la medicina.

Uno de los aspectos importantes cuando se estudian cambios morfológicos presentes en el hongo es analizar su tasa de crecimiento (Antal et al., 2000). El estudio del crecimiento del hongo se centra típicamente por las extensiones de las hifas, las ramificaciones y la producción de estructuras reproductivas como las esporas. Cabe señalar que los hongos muestran diferentes tasas de crecimiento según la especie y las condiciones específicas en las que se cultivan. Los hongos pueden tener una tasa de crecimiento rápida y pueden producir colonias visibles en un período corto de tiempo, mientras que otros hongos pueden mostrar tasas de crecimiento más lentas y tomar un tiempo más largo para formar colonias visibles. Por ejemplo, los hongos de crecimiento rápido como los son ciertas especies de los géneros *Aspergillus* o *Penicillium* pueden colonizar sustratos y formar redes de micelio visibles en cuestión de días, mientras que otros hongos pueden tardar semanas o incluso meses en mostrar un crecimiento visible.

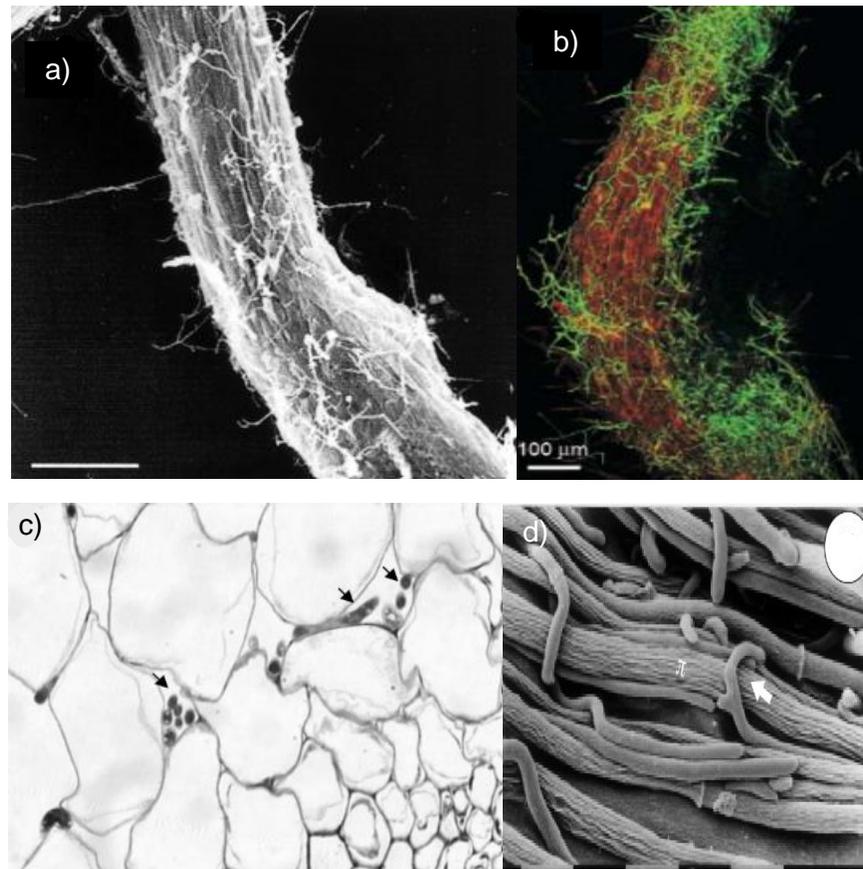
En cuanto a los hongos del género *Trichoderma* spp. en los cuales se han hecho análisis para comparar el desarrollo bajo diferentes tipos de estrés son; *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma aureoviride*. Los análisis realizados en estas cepas son: estudios a nivel macroscópico midiendo el radio de la colonia después de 4, 11 y 17 días (Antal et al., 2000) La importancia de este tipo de estudios es comprobar información útil sobre cómo aplicar distintas cepas de biocontrol en suelos agrícolas con relación específica de agua, pH y niveles de nutrientes (Begoude, 2007).

Otro tipo de hongos que presentan cambios en su forma son los denominados patógenos, estos hongos son una representación de cómo los cambios morfológicos juegan un papel importante en las interacciones con las plantas huéspedes. Estos cambios en su forma les permiten iniciar infecciones, superar las defensas de las plantas y establecerse dentro de los tejidos del huésped. Como muestra de algunos cambios morfológicos en los hongos patógenos se tiene *Ustilago maydis* (Figura 2.a), el cual es un patógeno que infecta a las plantas de maíz. Este hongo presenta un ciclo de vida dimórfico, empezando por ser células similares a levaduras hasta formarse en hifas filamentosas. Las células parecidas a levaduras son responsables de la invasión inicial de los tejidos vegetales, mientras que las hifas se forman hasta estar dentro del huésped provocando la formación de tumores conocidos como carbón de maíz (Huitlacoche) (Bölker, 2001). Del mismo modo, el hongo *Magnaporthe oryzae*, es un patógeno devastador, sufre una transición morfológica de una forma hifal vegetativa a una estructura de infección especializada llamada apresorio (extremo de la hifa que se encuentra hinchado). El apresorio genera una inmensa presión de turgencia, lo que permite que el hongo penetre en la cutícula de la planta e inicie la infección (Talbot, 2003). De igual forma, el hongo *Fusarium oxysporum*, (Figura 2.b) es un patógeno que vive en el suelo e infecta una amplia gama de especies de plantas y causa su marchitez. Este hongo muestra distintas morfologías que incluyen hifas vegetativas, clamidosporas y estructuras especializadas llamadas microconidias y macroconidias. Estos cambios se dan según su etapa de vida y las interacciones con el huésped (Michielse & Rep, 2009). Finalmente, los hongos *Erysiphe* spp, son patógenos biotróficos ( solo se alimentan de células vivas) que infectan una amplia gama de plantas hospedantes, que revelan cambios morfológicos únicos durante las interacciones con el huésped, formando estructuras especializadas llamadas haustorios (extremo de la hifas de un hongo parásito que penetran el tejido del huésped pero permanece afuera de la membrana) que penetran en las células del huésped para adquirir nutrientes (Takamatsu, 2013).



**Figura 2.** a) Tumores en una mazorca de maíz inducido por *Ustilago maydis* (Bölker, 2001). b) Imágenes de microscopia confocal de clamidosporas de proteína verde fluorescente (GFP) como marcador en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en raíces de tomate. Izquierda: exterior de una raíz de tomate (7 días después de la inoculación). Derecha: 22 días post-inoculación. Nótese las paredes celulares rojas autofluorescentes de las clamidosporas (Michielse & Rep, 2009). Barras de escala, 20  $\mu$ m

En lo que respecta a otros estudios que han aportado en investigaciones sobre las alteraciones morfológicas en hongos en presencia de plantas, está el hongo *Trichoderma harzianum* en interacción con las raíces de pepino durante las primeras etapas de colonización con microscopia electrónica de barrido (SEM) (Figura 3.a), donde se muestra los cambios de la hifa a estructuras parecidas a apresorios para adherirse a la raíz (Yedidia I. et al., 2000). Por otro lado, se ha estudiado la capacidad del hongo *T. harzianum* para colonizar las raíces y estimular el crecimiento en plantas de tabaco (*Nicotina benthamiana*) y plantas de tomate en la cual, se observó por microscopía de campo claro y microscopía de barrido láser confocal (CLSM) (Figura 3.b y 3.c), en donde el extremo de la hifa cambió su forma al ser más hinchada que lo usual (Chacón et al., 2007). Por último, se observa la actividad micoparásita de cinco cepas de hongos antagonistas los cuales son; *Gliocladium roseum* (GR11), *Penicillium frequentans* (PF), *Trichoderma atroviride* (TA312), *T. longibrachiatum* (TL9) y *T. harzianum* (TH144), que fueron colocados contra tres patógenos *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* y *F. nivale*. Se estudiaron mediante SEM donde las observaciones dieron como resultado la interacción entre el antagonista y el patógeno el cual, estableció un contacto íntimo entre hifas dando diferentes estructuras para la colonización entre organismos, donde las hifas cambian su forma a estructuras parecidas a pinzas o ganchos para adherirse a las raíces (Figura 3.d) (Pisi et al., 2006).

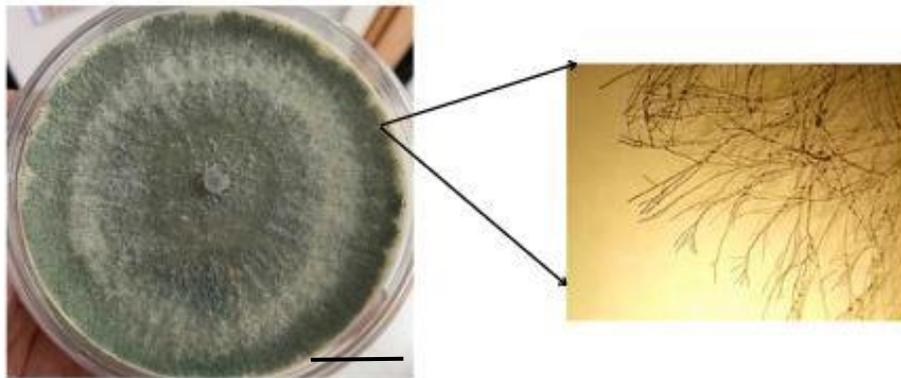


**Figura 3.** a) Fotografías de microscopía electrónica de barrido de raíces de pepino cultivadas en hidroponía 72 h después de la inoculación con *T. harzianum*. Colonización extensa de la superficie de la raíz (200x) (Yedidia I. et al., 2000). b) Análisis CLSM de la colonización de raíces de tomate con *T. harzianum* GFP22. Colonización extensa de la superficie de la raíz del tomate después de 24 h (Chacón et al., 2007). c) Fotografías de microscopía óptica de secciones transversales ultrafinas de raíz de tomate 18 h. Las hifas (flechas) se muestran mediante tinción con azul de (Chacón et al., 2007). d) Acción parasitaria de *Trichoderma atroviride* (TA312) contra *Fusarium culmorum* (FC) y *F. nivale* (FN). Gancho TA312 (flecha), punta de hifa (cabeza de flecha) y crecimiento paralelo formado contra FN (Pisi et al., 2006).

### 1.3 El hongo *Trichoderma atroviride* como modelo de estudio

El hongo *Trichoderma atroviride* crece mediante filamentos conocidos como hifas. Además, cuenta con un proceso llamado anastomosis en el cual, las hifas delgadas se fusionan con otras hifas para formar una red llamada micelio (Flores-Enríquez, 2022). Esta estructura facilita el intercambio de líquidos, nutrientes e información entre diferentes partes del sistema del hongo, no tiene límite de crecimiento siempre y cuando tenga los nutrientes suficientes. Este hongo presenta un crecimiento radial que se le conoce como colonia (Figura 4).

La reproductividad de este tipo de hongo es característica dado que se reproduce mediante estructuras asexuales especializadas conocidas como conidios. Este tipo de estructuras reproductivas generan una típica esporulación verde. Este fenómeno de reproducción es desencadenado por la exposición del hongo a la luz, específicamente a pulsaciones de luz azul (400-480 nm), por lo que se utiliza como modelo fotomorfogénico. Este hongo filamentoso tiene la capacidad de obtener información del entorno. Debido a esto, se han desarrollado varias investigaciones donde describen y analizan las alteraciones morfológicas presentadas por este hongo bajo condiciones de luz y oscuridad (Casas-Flores et al., 2004).



**Figura 4.** Caja de Petri con colonia de *Trichoderma atroviride* (IMI206040) después de 7 días de incubación a 28°. Ampliación del frente de colonia donde se observa las hifas del hongo (4x). Barra de escala: 2 cm.

La formación de halos de conidios verdes oscuros en el hongo al ser expuesto a la luz no es dañina para él, más bien le provee de una advertencia. Para el caso de la longitud de onda correspondiente al rojo y rojo lejano ( $\lambda=600-650$  nm) ha habido investigaciones donde se han percatado que esta luz no presenta un efecto que sea notorio en el desarrollo del hongo, puesto que no hay cambios en su morfología (Casas-Flores et al., 2004). En la naturaleza *T. atroviride* se encuentra comúnmente creciendo en el suelo como saprobio o colonizando raíces de las plantas, por lo que de forma natural no siempre está en contacto directo con la luz natural.

*T. atroviride* es bien conocido por sus interacciones con las plantas, que pueden provocar diversos cambios morfológicos tanto en el hongo como en la planta. *T. atroviride* se utiliza a menudo en la agricultura como agente de biocontrol (microorganismo usado para controlar enfermedades de plantas en la agricultura) para promover el crecimiento de las plantas y protegerlas de patógenos (Lorito, 2010). *T. atroviride* puede sintetizar compuestos que promueven el crecimiento de

las plantas, como auxinas y citoquininas, que estimulan el desarrollo de las raíces, aumentan la absorción de nutrientes y mejoran el crecimiento general de las plantas (Nieto-Jacobo et al., 2017).

**Hifa:** es una estructura tubular en forma de hilo que constituye el componente básico del cuerpo del hongo, conocido como micelio. Las hifas son las unidades estructurales y funcionales de los hongos, responsables de diversas funciones esenciales como la absorción de nutrientes, el crecimiento y la reproducción. Las hifas crecen por elongación en sus puntas y pueden ramificarse y fusionarse para formar una extensa red llamada micelio. Estas estructuras desempeñan un papel crucial en el ciclo de vida de los hongos (Alexopoulos, 1996).

**Ápice:** en el contexto de los hongos, el término "ápice" normalmente se refiere a la punta o el extremo de una estructura fúngica, como una hifa o un conidióforo. El ápice es a menudo una región donde ocurren importantes procesos de crecimiento, desarrollo o reproducción (Alexopoulos, 1996).

**Micelio:** el micelio es la parte vegetativa de un hongo y consta de una red de estructuras en forma de hilos llamadas hifas. Sirve como modo principal de absorción de nutrientes y juega un papel crucial en el ciclo de vida de los hongos. El micelio crece y se propaga a través de su entorno, a menudo en el suelo o en materia orgánica en descomposición, formando una red compleja e interconectada (Alexopoulos, 1996).

## 1.4 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

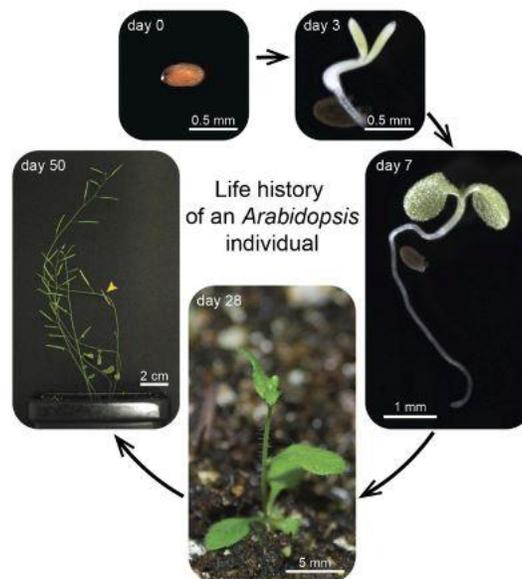
La planta *Arabidopsis thaliana* comúnmente conocida como *Arabidopsis*, es un organismo modelo en biología y genética vegetal, ampliamente utilizado en la investigación debido a su genoma relativamente pequeño, ciclo de vida corto (Figura 5) y facilidad de cultivo. La planta *Arabidopsis* sirve como una herramienta importante para estudiar diversos aspectos de la biología vegetal, incluida la genética, el desarrollo, la fisiología y las respuestas a estímulos ambientales (Bowman et al., 1989).

El estudio de *Arabidopsis* como modelo de plantas data del siglo pasado. En el año de 1943 se obtuvieron las primeras investigaciones acerca de las fortalezas de utilizar esta planta en experimentos genéticos. En la década de los 60's se examinaron grandes cantidades de poblaciones de *Arabidopsis* en busca de mutaciones en los genes (Szymanski, 2001). Pero no fue sino hasta 1998 que se declaró como una planta modelo para el estudio de la biología vegetal (Saraswathy

& Ramalingam, 2011). En lo que respecta al desarrollo y crecimiento de este organismo, se han hecho grandes cantidades de investigaciones para la ciencia moderna. *Arabidopsis* es una planta muy útil y fácil de tratar para establecer patrones de desarrollo respecto a su fisiología bajo condiciones de estrés (Woodward & Bartel, 2018).

Esta planta modelo es pequeña, crece rápidamente y florece en interiores. La supervivencia de esta planta se ve influenciada por varios factores ambientales como; la humedad, la temperatura, el suelo, el fotoperiodo, la longitud de onda, la presencia de microorganismos y las intensidades de la luz. La estructura de *Arabidopsis* está conformada por el tallo, los meristemos apicales, las hojas simples, los tricomas, las estomas que se abren o cierran para regular el intercambio de gases entre la hoja y la atmósfera, las raíces, los pelos radiculares, el vascular y el polen (Woodward & Bartel, 2018).

*A. thaliana* ha contribuido enormemente a la comprensión de conceptos clave desde el enfoque de la biología gracias a su disponibilidad, recursos ambientales, herramientas implementadas y experiencias compartidas. En donde, el estudio de la planta demuestra características importantes que ayudan a la comprensión acerca de rasgos vegetales. Por lo tanto, la planta se ha vuelto un “modelo genético central y un organismo universal en la ciencia de plantas y cultivos”(Krämer, 2015).



**Figura 5.** Ciclo de vida de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En el día cero se fotografió la semilla antes de ser esterilizada y colocada en el medio de cultivo, se dejó en incubación. Al paso de 3 días se observó la radícula (raíz embrionaria). El crecimiento de las hojas, el tallo y la raíz alargada fueron evidentes a los 7 días. Después de 13 días, la plántula se transfirió al suelo y se cultivó a temperatura ambiente bajo luz fluorescente continua, luego se fotografió poco después de la floración (28 días) y después se fotografió las vainas secas que contenían semillas maduras (50 días)” (Woodward & Bartel, 2018).

**Plántula:** una plántula es una planta joven que surge de una semilla y comienza a crecer. Se encuentra en las primeras etapas de desarrollo, caracterizándose por la presencia de hojas embrionarias (cotiledones) u hojas verdaderas, según la especie vegetal. Las plántulas suelen ser frágiles y requieren condiciones ambientales específicas, como humedad, luz, nutrientes y temperatura adecuadas, para prosperar (The American Heritage Science Dictionary, 2022).

## 1.5 Los cambios morfológicos que se observan en interacciones entre *Trichoderma* spp. y *Arabidopsis thaliana*

La interacción entre *Trichoderma* spp. y *A. thaliana* ha sido estudiada ampliamente como sistema modelo para comprender los efectos beneficiosos de *Trichoderma* sobre el crecimiento de las plantas y los mecanismos de defensa. Las interacciones *Trichoderma-Arabidopsis* han arrojado a la luz resultados sobre los cambios moleculares y fisiológicos que ocurren en las plantas durante la colonización por especies del género *Trichoderma*, tomando en cuenta el ajuste de varios parámetros como; la luz, el medio de crecimiento, la temperatura entre otros. Se han utilizado diferentes cepas de *Trichoderma* como *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride*, se ha demostrado que estas cepas otorgan un beneficio a *Arabidopsis*. De igual forma, en cuanto a *Arabidopsis* han sido utilizadas varias mutantes o fenotipos, tal es el caso de Col-0, DR5: uidA y AtERD14 por mencionar algunas (Contreras-Cornejo et al., 2009),

En cuanto a las investigaciones realizadas sobre los cambios que son presentes en la planta al estar con el hongo, se han calculado; el peso fresco y seco, la longitud de la raíz principal, la densidad de raíces laterales, la acumulación de auxinas, el análisis de compuestos orgánicos volátiles (Lee et al. 2015), el rescate de fenotipos defectuosos (González-Pérez et al. 2018), el porcentaje de germinación, el área foliar (O. Kleifeld et al. 1992), la producción de biomasa, la determinación de compuestos indólicos (Contreras-Cornejo et al., 2009) y la evaluación del perfil de poliaminas (Salazar-Badillo et al. 2015).

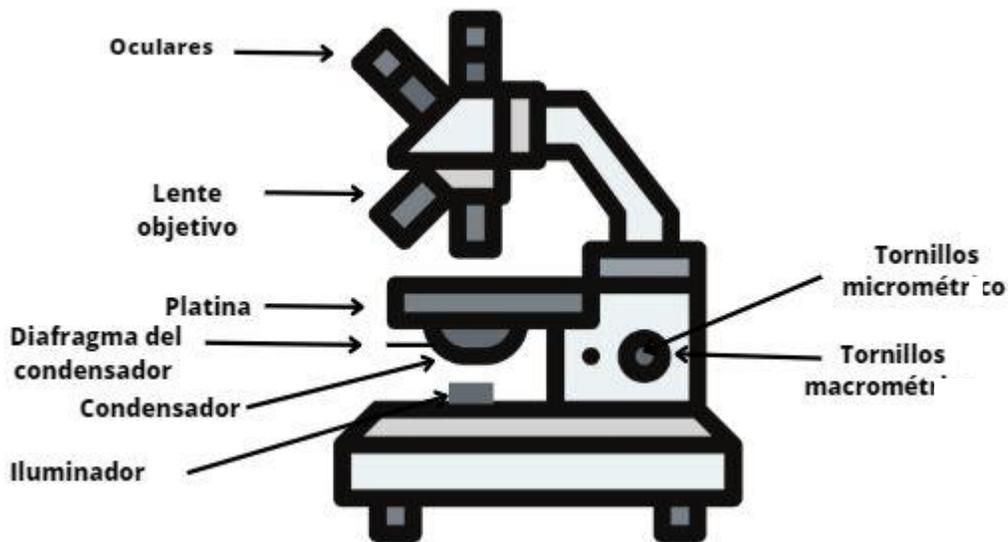
Estos tipos de investigaciones independientemente del medio de cultivo o las condiciones de crecimiento han arrojado que *Trichoderma* spp. presenta un efecto benéfico para *Arabidopsis*. Debido a que las plántulas tratadas con *Trichoderma* promueven una mayor producción de biomasa y un desarrollo de raíces laterales (González-Pérez et al. 2018), además que mejora su salud, la hace resistente

contra enfermedades (Inbar et al., 1996), contribuyen a la nutrición de las plantas e inducen respuestas de defensa (Ojaghian et al. 2019).

Una situación muy importante para considerar son las técnicas de investigación por las cuales podemos analizar las interacciones entre hongo y la planta, por lo tanto, uno de los procedimientos más usados son las técnicas de microscopía avanzada, la cual sirve para caracterizar este tipo de interacciones, que ha llevado a el desarrollo de investigaciones en este campo (Zeilinger et al., 2015). Entre los métodos de microscopía más usados encontramos microscopía de campo claro (BF), microscopía de barrido láser (CLSM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

## **1.6 El microscopio óptico de campo claro**

El microscopio óptico compuesto es un instrumento utilizado para observar ampliamente finos detalles de una muestra (Figura 6) (Sandle, 2016). La microscopía de campo claro se basa en el principio de que la luz se transmite a través de la muestra y el microscopio forma una imagen por diferencias en la absorción y refracción de la luz entre las estructuras de la muestra (Murphy, 2001). Cuando la muestra absorbe luz visualizaremos en la imagen una muestra oscura contra un fondo brillante (Holgate, 2003). La iluminación es de vital importancia, el correcto acomodo de esta dará como resultado la formación de una imagen con buen contraste y resolución, por el contrario, el tener un mal arreglo en la iluminación provocará señales de ruido y una imagen de mala calidad. El microscopio cuenta con dos lentes de suma importancia para la formación de imágenes; el lente objetivo que capta la luz difractada por la muestra y forma una imagen real ampliada (para objetivos de 160 mm); y el lente condensador que se encarga de concentrar la luz en un área pequeña de la muestra (Murphy, 2001). De igual forma, se hacen uso de objetivos adicionales (2x, 4x, 10x, 15x o 20x) que se utilizan en la lente ocular para proporcionar un factor adicional (Guzmán Altamirano, 2015).



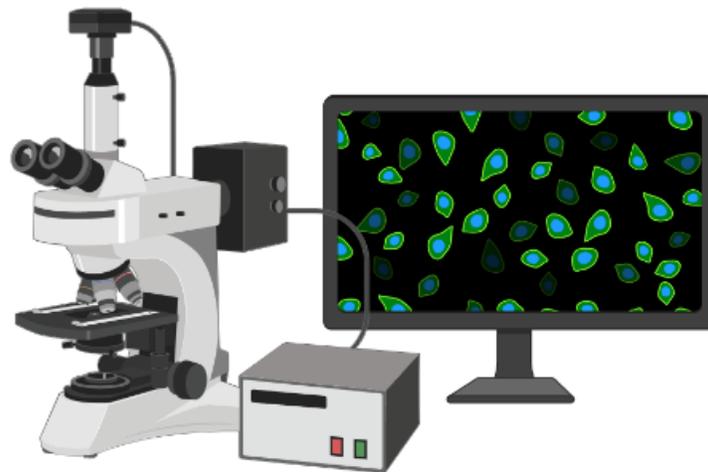
**Figura 6.** Microscopio óptico compuesto, las flechas señalan el nombre de las partes principales que lo forman.

### 1.6.1 Las aplicaciones del microscopio óptico: La videomicroscopía

La videomicroscopía se refiere al uso de técnicas de microscopía combinadas con grabación de video para capturar y analizar procesos dinámicos en muestras biológicas o materiales. Implica el uso de microscopios especializados, equipados con cámaras o sistemas de imágenes digitales para visualizar y registrar el comportamiento en tiempo real de estructuras microscópicas como células u organismos (Wilson T. &, 2019). La captura de una serie de imágenes a alta velocidad proporciona un registro continuo del comportamiento de la muestra, lo que ofrece información valiosa sobre su dinámica y cambios temporales (Gibson, 2019). La microscopía de video permite a las y los investigadores observar y estudiar los procesos biológicos que se desarrollan en el tiempo, como: la división celular, los movimientos celulares, las interacciones moleculares y el desarrollo de tejidos.

Además de la observación visual, la videomicroscopía a menudo involucra varias técnicas de procesamiento digital y análisis de imágenes para extraer información cuantitativa de los videos grabados (Figura 7). Estas técnicas pueden incluir: el seguimiento del movimiento de objetos, la medición de parámetros celulares y subcelulares, el análisis de la intensidad o distribución de ondas fluorescentes y la realización de análisis estadísticos en grandes conjuntos de datos (Wilson, 2019).

La videomicroscopía tiene numerosas aplicaciones en la investigación biológica, la medicina, la ciencia de los materiales y otros campos. Ha contribuido a los avances en biología celular, microbiología, neurociencia, biología del desarrollo, farmacología y más (Prevedel R. Y., 2018). La capacidad de estudiar y comprender los procesos dinámicos a nivel microscópico a través de la videomicroscopía ha ampliado en gran medida nuestro conocimiento de los sistemas biológicos y ha llevado a descubrimientos e ideas que quizás no hubieran sido posibles solo con imágenes estáticas (Liao, 2020).



**Figura 7.** Sistema de videomicroscopía. Para conformar el sistema de observación, utilizamos el microscopio óptico de campo claro que será conectado a una computadora que nos permitirá observar y capturar imágenes de la muestra.

## 1.7 El procesamiento digital de imágenes: Técnicas utilizadas

El procesamiento de imágenes se refiere a la manipulación y el análisis de imágenes digitales utilizando varios algoritmos y técnicas. Implica aplicar operaciones y transformaciones matemáticas a los arreglos de números que conforman las imágenes digitales para mejorar la calidad de la imagen, extraer información útil o modificar su apariencia. El procesamiento de imágenes se puede realizar en fotografías, gráficos o cualquier otra forma de imágenes digitales (Rafael Gonzalez, 2017).

El objetivo principal del procesamiento de imágenes es mejorar la percepción visual de las imágenes o extraer información valiosa de ellas. El procesamiento de imágenes se puede utilizar para una amplia gama de aplicaciones, que incluyen:

**Mejora de la imagen:** ajuste de las propiedades de una imagen para mejorar su calidad visual, como el ajuste del brillo, el contraste o la nitidez.

**Restauración de imágenes:** reparación o reconstrucción de imágenes degradadas o dañadas causadas por ruido, desenfoque u otros artefactos.

**Compresión de imágenes:** reducir el tamaño de un archivo de imagen mientras se preserva su calidad visual eliminando información redundante o irrelevante.

**Segmentación de imágenes:** dividir una imagen en regiones significativas u objetos en función de ciertas características, como el color, la textura o la forma.

**Extracción de características:** identificar y extraer características o patrones específicos de las imágenes, como bordes, esquinas o texturas.

**Reconocimiento y detección de objetos:** identificar y localizar objetos o patrones específicos dentro de una imagen o una secuencia de imágenes.

**Clasificación y categorización de imágenes:** asignación de imágenes a categorías o clases predefinidas en función de su contenido visual o características.

El campo abarca una amplia gama de técnicas y algoritmos, incluidos el filtrado, la detección de bordes, las operaciones morfológicas, el análisis de Fourier y los enfoques basados en el aprendizaje automático, entre otros. Las técnicas de procesamiento de imágenes se pueden utilizar en varias aplicaciones, incluidas imágenes médicas, vigilancia, visión por computadora, sensores remotos y sistemas multimedia (Rafael Gonzalez, 2017).

## 1.8 Hipótesis

La interacción del hongo *Trichoderma atroviride* con la plántula *Arabidopsis thaliana* induce cambios en la velocidad de crecimiento y alteraciones morfológicas del micelio.

## 1.9 Planteamiento del problema

Estudiar el sistema de micelio del hongo *T. atroviride* con la raíz de *A. thaliana* bajo microscopía de campo claro, con un enfoque en los cambios que presente el micelio en su velocidad de crecimiento al paso del tiempo. Se incluirán muestras con ausencia (control) y presencia de *Arabidopsis*.

Para obtener los datos necesarios se empleará un procesamiento de imágenes mediante el software *ImageJ/FIJI*, el cual nos arrojará elementos como las coordenadas de las puntas de las hifas o el centro del frente de colonia fúngica, que serán analizados usando el programa *Mathematica*, para obtener el promedio de la velocidad de crecimiento del micelio bajo diferentes condiciones. De igual forma, haremos un estudio a nivel macroscópico para observar y analizar cambios morfológicos en la colonia del hongo.

## 1.10 Objetivos

### 1.10.1 Objetivo general

Determinar la respuesta en el micelio del hongo *Trichoderma atroviride* en presencia de la planta *Arabidopsis thaliana*.

### 1.10.2 Objetivos específicos

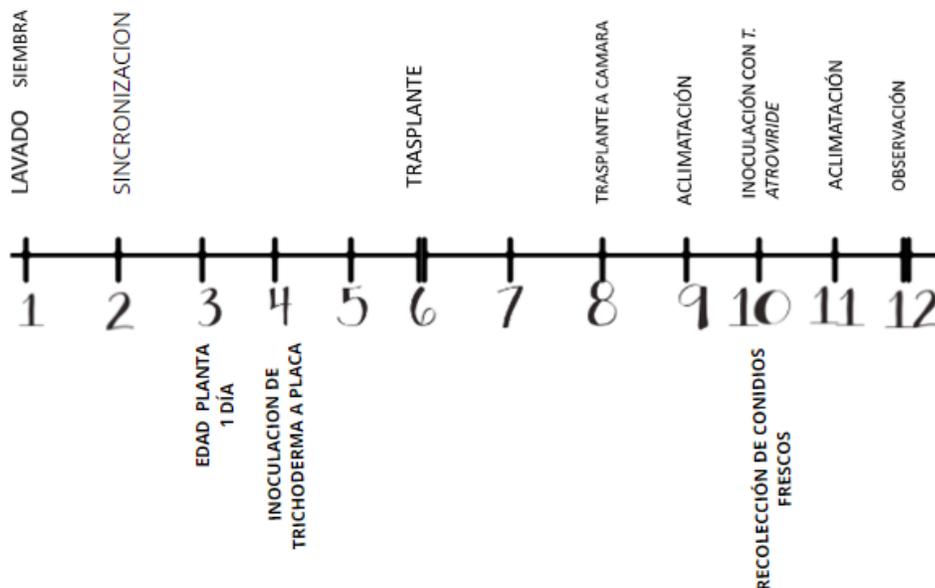
- Estructurar un modelo experimental que permita observar el micelio del hongo de *T. atroviride* en interacción con la raíz de *A. thaliana*.
- Observar mediante microscopía óptica de campo claro la interacción del micelio de *T. atroviride* con la raíz de *A. thaliana* con un “stack” (agrupación de múltiples imágenes) de imágenes en 24 h.
- Analizar los cambios en la morfología en la estructura del micelio mediante procesamiento digital de imágenes.

- Determinar el promedio de la velocidad de crecimiento del micelio en interacción con *Arabidopsis*.
- Estudiar las alteraciones en la forma de la colonia del hongo con presencia y ausencia de la plántula.

## 2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

### 2.1 La preparación de organismo

Para realizar el cultivo del hongo y la planta de manera correcta, y seguir las condiciones óptimas del crecimiento de ambos organismos, se estableció una línea del tiempo para acoplar las fases de crecimiento de los organismos (Figura 8).

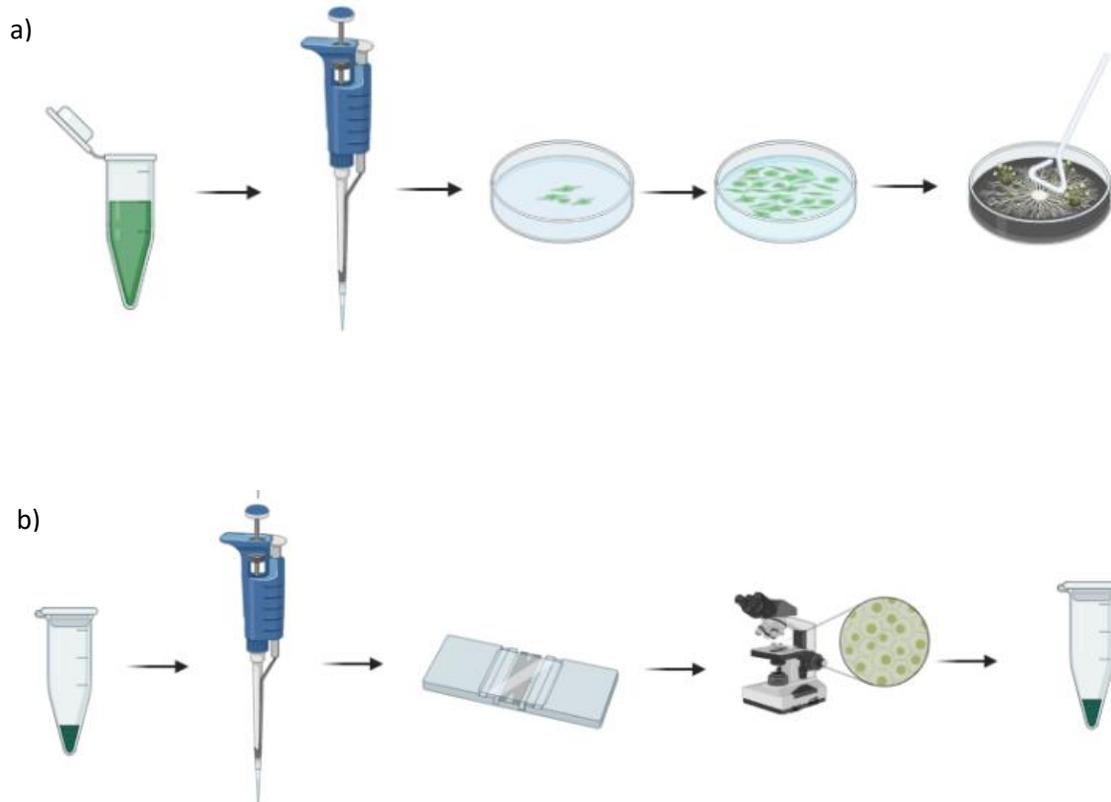


**Figura 8.** Línea de tiempo para el cocultivo de la plántula y el hongo, la cual muestra las diferentes etapas requeridas para cada organismo para su crecimiento de manera dependiente del tiempo para acoplar a ambos sistemas biológicos.

#### 2.1.1 El hongo *Trichoderma atroviride*

Para cultivar el hongo, es necesario hacer la preparación y el conteo de conidios para lograr una suspensión  $1 \times 10^6$  conidios/mL. En un ambiente estéril se inocularon 10  $\mu$ L de la cepa de *T. atroviride* IMI204060 sobre una placa Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar) y se incubó a 27 °C por 7 días (Figura 9.a). Posteriormente, se realizó la recolección de conidios usando agua destilada estéril. Para cuantificar los conidios, se realizó una dilución 1:100 y se depositaron 10  $\mu$ L de conidias en una cámara de Neubauer y se implementó el protocolo descrito en el Apéndice 1,

para obtener la cantidad de conidios que requerimos (Figura 9.b). Cabe señalar que este procedimiento se realizó cada mes para tener conidios nuevos en cada muestra y no pierdan viabilidad.



**Figura 9.** a) Proceso para obtener los conidios frescos. Con ayuda de una micropipeta se inocula 10 ml de una suspensión de conidios en glicerol en el centro de una placa Petri, se deja en incubación por 7 días para obtener crecimiento vegetativo en la placa. Al cabo de los 7 días se recolectarán los conidios raspando la superficie de la placa. b) Proceso de conteo de conidio frescos. Una vez recolectados los conidios de la placa se realizará una dilución 1:100 que será depositada en la cámara de Neubauer para contar los conidios en el microscopio óptico y realizar una nueva dilución para obtener  $1 \times 10^6$  conidios/mL.

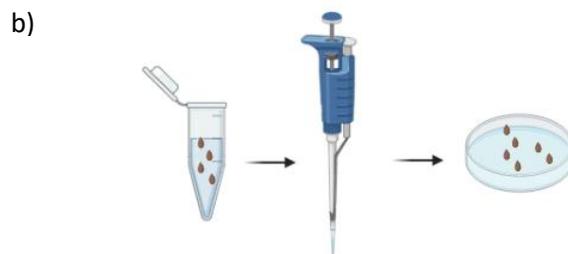
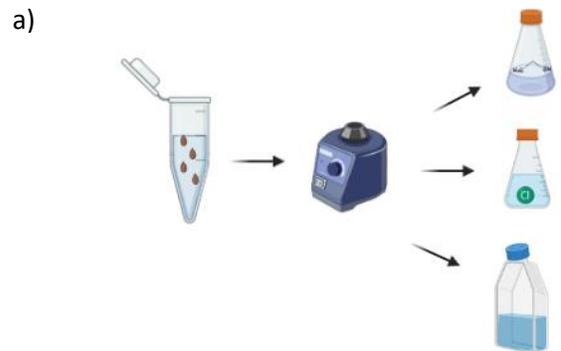
Para nuestra investigación se utilizó el medio MS (Murashige & Skoog), debido a que permite el crecimiento de la planta y el hongo. Para la preparación del medio, se utilizó medio MS, sacarosa y agar, la cantidad requerida dependió de la proporción de medio MS a preparar. El medio MS se esterilizó en la autoclave por 2 h, donde una vez estéril se verterá en placas de Petri antes que se solidifique y serán llevadas al cuarto de 4 °C hasta el momento que se requieran usarlas.

## 2.1.2 La planta *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis* Ecotipo Col-0 se lavaron en un ambiente estéril con etanol al 70% durante 3 minutos, después serán lavadas por cloro al 20% durante 7 minutos y finalmente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril (Figura 10.a).

Una vez estériles, se procedió a sembrarlas en una placa Petri con medio MS. Se tomaron las semillas con una micropipeta y se esparcirán en la superficie de la placa (Figura 10.b), al término de la siembra se cubrió la placa con aluminio y se incubaron a 4° C por dos días, para la sincronización de las semillas. Posteriormente se llevó la placa a la cámara de crecimiento a una temperatura de 22 °C y un ciclo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Al paso de 4 días en la cámara a 22 °C se realizó el primer trasplante de varias plántulas a una nueva placa de Petri con medio MS. Después de dos días, se realizó un segundo trasplante a los 7 a 9 días de edad de las plántulas, colocando una plántula por placa para proceder a observarla junto con el hongo (Figura 10.c).



c)

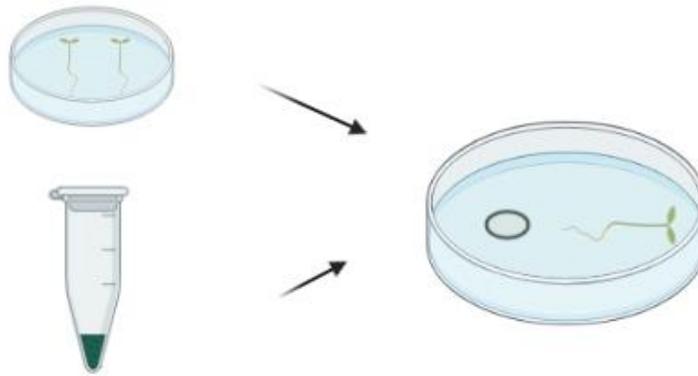


**Figura 10.** a) Para realizar el proceso de lavado de semillas usamos cloro al 20%, etanol al 70% y agua destilada estéril, estos lavados serán hechos con ayuda de un vortex. b) Una vez lavadas las semillas utilizando una micropipeta, tomamos las semillas que viene en el tubo Eppendorf y las depositaremos en la superficie de la placa con medio MS. c) Al cabo de 7 días cuando tengamos las plántulas se trasplantarán a una nueva placas Petri con medio, este trasplante lo haremos usando pinzas estériles

## 2.2 El desarrollo para la elaboración de la minicámara

Con la finalidad de establecer el acomodo apropiado de los organismos que serán observados en nuestra investigación, se harán pruebas para determinar donde se tiene mejor crecimiento y visualización por parte del hongo y la plántula. Debido a que es de gran importancia las observaciones de la interacción entre planta y hongo en el microscopio se decidió realizar la minicámara en placas Petri de 8 cm de diámetro. En esta minicámara se verterá el medio hasta un poco más de la mitad de la placa para tener buena iluminación por parte del microscopio y tener buenas imágenes para examinar.

Se trasplanta la plántula a una edad de 7 a 9 días para que se aclimate por 24 h a 22 °C. Al paso de un día se inoculan 5  $\mu$ l de conidios del hongo, a 5 mm de la punta de la raíz. Posteriormente, se incuban los dos organismos en la oscuridad por 24 h a 22 °C. Este tiempo de incubación tiene como objetivo, que el hongo tenga tiempo suficiente para germinar y sea posible observarlo y evitar la conidiación por presencia de la luz. Cumpliendo estas 24 h, se toma la minicámara y se lleva al microscopio por 24 h más para la observación.



**Figura 11.** Diagrama del proceso de trasplante de la plántula e inoculación del hongo a la cámara de crecimiento. Se hace el trasplante de la plántula con una longitud de 1cm, después de 24 h en incubación se inoculan 5  $\mu$ l de conidios a una distancia de 5 mm desde la punta de la raíz.

## 2.3 Las condiciones experimentales para el sistema de observación

Como tenemos dos organismos que crecen en condiciones controladas, pero en situaciones diferentes, se necesitan contemplar varias propiedades que son; luz, humedad y temperatura. Teniendo en cuenta estas condiciones y conociendo que nuestro microscopio tendrá que tomar imágenes por ciertas horas seguidas del sistema interactuando, se tendrá que colocar el microscopio en un cuarto donde podamos controlar estos parámetros. Se contempla que las propiedades en las cuales se hará nuestra investigación tengan sean las siguientes;

- Luz roja: Filtro Lee 182 ( $\lambda = 600 - 650$  nm).
- Humedad: 65%
- Temperatura: 22 °C

Para poder controlar estas condiciones se ideó una forma para la colocación del microscopio con nuestras muestras. Primero, se situará el microscopio en un cuarto especial de crecimiento de plantas ubicado en el Edificio Alfa, ya que en este lugar será posible vigilar y controlar la temperatura y la humedad.

Por otro lado, ya que necesitamos que nuestro sistema de observación se encuentre en condiciones una constante observación de la muestra bajo el microscopio, se ha decidido que la fuente de iluminación emita luz roja ( $\lambda = 600 - 650$  nm). Esta elección

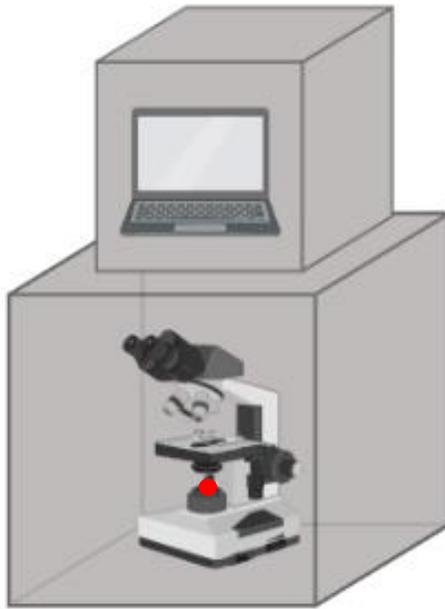
se debe a que *Trichoderma atroviride* no presenta efectos en su conidiación al estar expuesto a este rango de longitudes de onda,  $\lambda=600-650$  nm (Casas-Flores et al., 2004). Así, podremos imitar las condiciones del hongo al estar creciendo por debajo del suelo. Con base a lo mencionado anteriormente, se tendrá que planear un método para la elaboración de una caja negra que contenga el microscopio e impida el paso de luz del exterior.

## **2.4 La construcción de la caja negra**

Para realizar las observaciones del desarrollo del micelio utilizando el microscopio óptico, es necesario contemplar el parámetro de luz. Por lo tanto, debido a los antecedentes registrados de la fotoconidiación del hongo se utilizará un filtro rojo que solo deje pasar la longitud de onda ( $\lambda= 600-650$  nm). Por tal razón se construirá una caja negra para colocar en ella todos los instrumentos que formen el sistema de observación. El sistema de observación incluye el microscopio con la cámara acoplada y la computadora para hacer la captura de las imágenes. El filtro se acoplará a la lámpara del microscopio dejando pasar la luz roja que entrará en contacto con los organismos de la muestra para brindarles la iluminación que requiere el sistema.

La caja negra tiene la finalidad de manipular las condiciones de luz que nosotros necesitamos para el proyecto y cuidar que no tengamos contaminación de otras longitudes de onda que provengan del exterior. Esta caja será colocada en el cuarto para plantas donde las condiciones de temperatura y humedad están controladas (T = 22 °C, Humedad relativa = 65%).

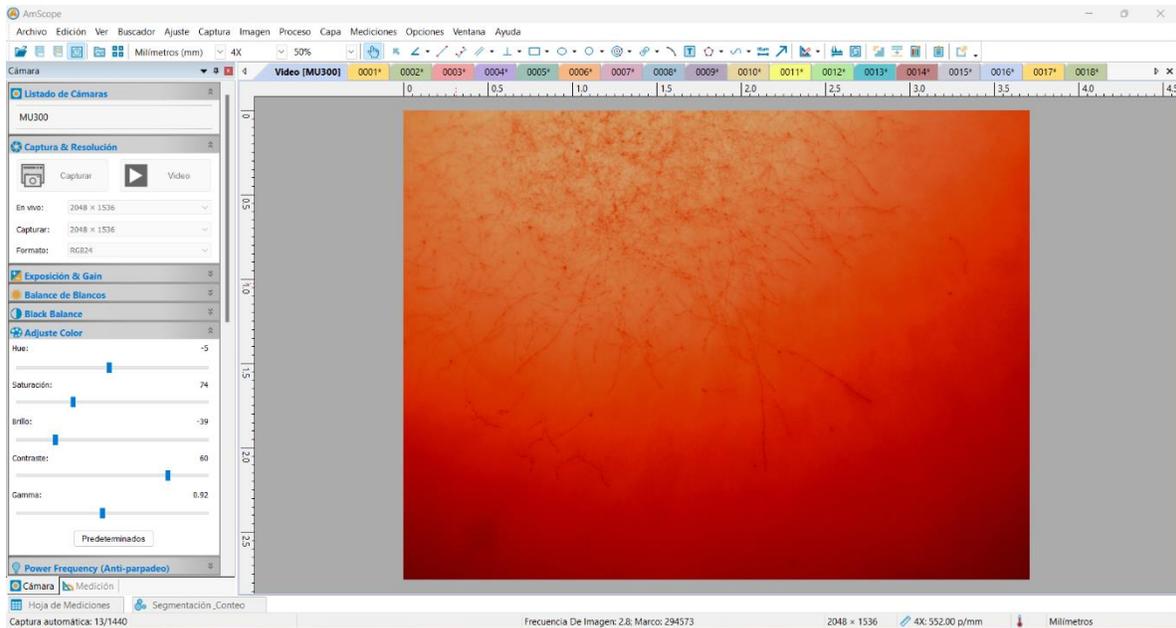
Una vez hecha la caja con las dimensiones adecuadas para el microscopio, permitiéndonos además tener un espacio para su manipulación, se procederá a conectar con la computadora haciendo uso de un software especial, para el microscopio y la cámara, procediendo a la captura de imágenes.



**Figura 12.** Diagrama del acomodo del sistema de observación en la cámara oscura, Se armó una caja negra para el microscopio donde se colocará el instrumento para controlar la luz y evitar contaminación del exterior por parte de otras longitudes de onda. De igual forma se construyó una caja para colocar una computadora que estará conectada al microscopio.

## 2.5 La adquisición y el procesamiento de imágenes

Al tener todo el sistema montado, el hongo y plántula en crecimiento en la minicámara, siendo observados en el microscopio adaptado en la caja negra, ahora se procederá a la toma de imágenes. Se estableció que para ver el crecimiento del micelio con la plántula más a detalle, la captura de las imágenes serían cada 60 s por 24 h. Para la captura de las imágenes, se utilizará la cámara de microscopio AmScope MU300 (2048x1536 pixeles).



**Figura 13.** Programa para la captura de imágenes de AmScope. Este software nos ayudará a tomar las imágenes de manera automática por 24 h.

Para la observación y toma de las imágenes se utilizará el software de AmScope instalado en la computadora (Figura 13), el cual nos brinda opciones para crear una visualización mejorada de las imágenes que estamos observando en el microscopio. Este programa nos permitirá hacer una tomada de imágenes de manera automatizada, creando una secuencia de lapso de tiempo (*time-lapse*) de captura de imágenes por 60 s en 24 h de cada muestra.

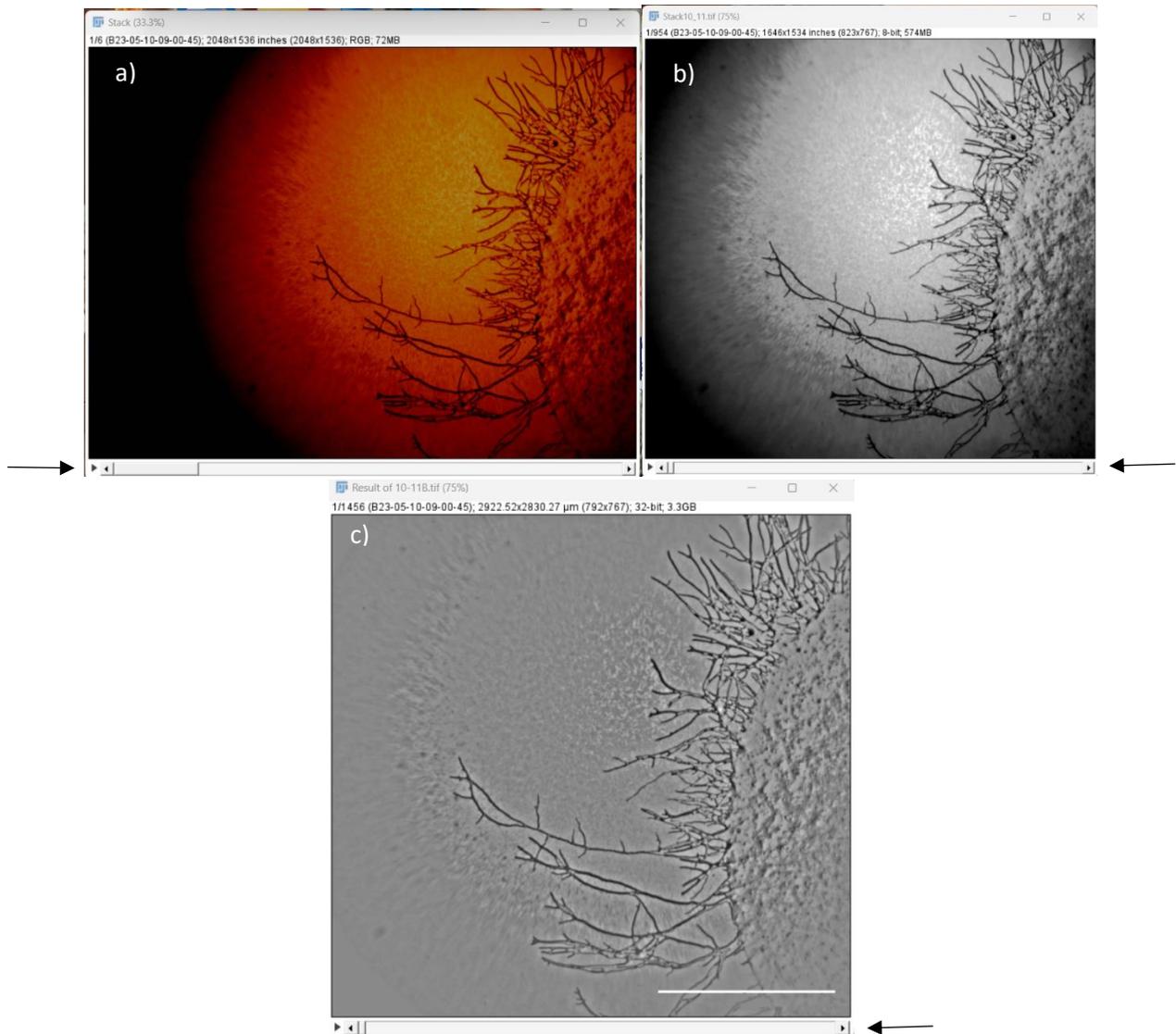
Cuando se tengan todas las imágenes necesarias, ahora se hará uso del software *ImageJ* para procesar las imágenes; inicialmente lo usaremos para crear un stack de imágenes por cada una de las muestras tomadas. Para comenzar este procedimiento, fue necesario hacer una reducción en la cantidad de imágenes, lo que se refiere a realizar un diezmado al stack original (imagen cada 10 minutos), por lo tanto, la cantidad total de imágenes por stack fueron 140 imágenes.

**Stack de imágenes:** Procesamiento digital de agrupar múltiples imágenes de una sola muestra (video o pila). Las pilas de imágenes combinan grupos de imágenes con cuadros de referencia similares, Una vez combinadas dentro de una pila, podrá procesar las distintas imágenes en una vista compuesta para eliminar contenidos no deseados o posibles ruidos. (Adobe, s.f.)

Para comenzar el procesamiento de los stacks diezmados, será necesario realizar una segunda reducción de tamaño de los stacks, ya que estos nos ayudarán a facilitarnos la manipulación y el análisis. Después, para tener una mejor visualización y detección del micelio, será necesario procesar el stack para eliminar ruidos que se hayan provocado a la hora de la toma de las imágenes. (Flores-Enríquez, 2022)

### **2.5.1 Reducción del tamaño del stack**

En la primera etapa del procesamiento de imágenes como fue mencionado se comenzará por realizar una compresión de imágenes para disminuir el tamaño de los stacks y hacer un procesamiento adecuado de las imágenes. Se comenzará realizando la calibración espacial de las imágenes que conforman el video (Analyze-> Set Scale). Después se convertirá a escalas de grises (8 bits). Al hacer este paso, lo que se producirá es una reducción de tamaño y eliminar algunas interferencias cromáticas que se hayan dado al hacer la captura de imágenes (Image -> Type-> 8 bits). Lo siguiente a realizar es segmentar la imagen, para solo tener el campo de observación en el cual podamos extraer información (Edit-> Select-> Specify). Después, se duplicará la imagen ya con las medidas adecuadas, para proceder a realizar los demás pasos del procesamiento (Image -> Duplicate). Siguiendo con el procesamiento, nuestro stack aún es de un tamaño considerable, por lo tanto, se hará otro paso para hacer una reducción del tamaño del archivo (Image -> Transform -> Bin), lo que se le hace en este paso es promediar conjuntos de 2x2 o 4x4 píxeles en la imagen. Finalmente, ya que, por las instrucciones que sigue el programa AmScope para capturar las imágenes son necesarios dos stack para completar un día de observación, se concatenarán los stacks que son necesarios para realizar la muestra de 24 h (Image -> Stack -> Tools -> Concatenate).



**Figura 14.** a) Stack de imágenes de las imágenes tomadas ante el microscopio. b) Stack de imágenes después de realizarles el procesamiento de reducción de tamaño y área. c) Stack de imágenes después de realizarles el procesamiento de calibración y eliminación del fondo. La flecha indica que se trata de una recopilación de imágenes. Barra de escala: 1000  $\mu\text{m}$ .

## 2.5.2 Calibración y eliminación de ruido

En la siguiente etapa de procesamiento se empezará por colocar la barra de escala en las imágenes que conforman el video (Analyze-> Tools -> Scale Bar). Después se hará una eliminación del ruido de la imagen causado por el fondo o ruido procedente del medio, por lo tanto, se aplicará un filtro gaussiano (Process-> Filters -> Gaussian Blur). Finalmente, se procederá a sustraer el fondo (Process -> Image Calculator) (Figura 15.c).

### **2.5.3 Selección de intervalo espacial**

Para realizar el análisis a cada stack es necesario empezar con el seguimiento del ápice de una hifa elegida, por lo tanto, se elige una ROI (*Region Of Interest*) haciendo un intervalo espacial donde solo este la hifa de interés o cuando llegue el momento el frente de colonia. Como se va haciendo un seguimiento del desarrollo de la hifa, fue necesario hacer un traslado de área cada vez que la hifa llegaba a la orilla del campo de visión del microscopio. Este traslado de área nos generará una sección del stack original que lo denominaremos sub-stack, el cual emplearemos una serie de procesos para limpiar las imágenes que lo forman (Figura 15.a).

### **2.5.4 Ajuste de contraste y brillo**

Con este proceso se hará una homogenización del fondo y se generará un contraste entre las hifas o colonia y el medio de crecimiento. Esto lo realizamos de la siguiente manera. Image > Adjust > Brightness and contrast (Figura 15.b).

### **2.5.5 Threshold**

Se debe realizar un ajuste en la umbralización del stack para proceder hacer una binarización. Image > Adjust > Threshold (Figura 15.c).

### **2.5.6 Binarizar y eliminar partículas**

Posteriormente se realizará una binarización al stack, para solo tenerlo en escala de blanco y negro Process > Binary > Make Binary. Lo que se hará es segmentar la imagen en blanco y negro, esto es, los pixeles de mayor intensidad son los blancos y los negros son de intensidad baja (Figura 16.d). Al tener las imágenes binarizadas se observará algunas manchas presentes que pueden ser debidas a partículas en el medio de cultivo, polvo en las lentes del microscopio, o a un mal alineamiento de la fuente de iluminación. Para poder eliminarlas se usará las herramientas que nos da el programa y hacerlo de manera manual; la forma en que se hará la eliminación de partículas es seleccionando el área que queremos eliminar y pintando con la escala de pixeles que ya tenemos establecida en el área de interés. Elegimos el

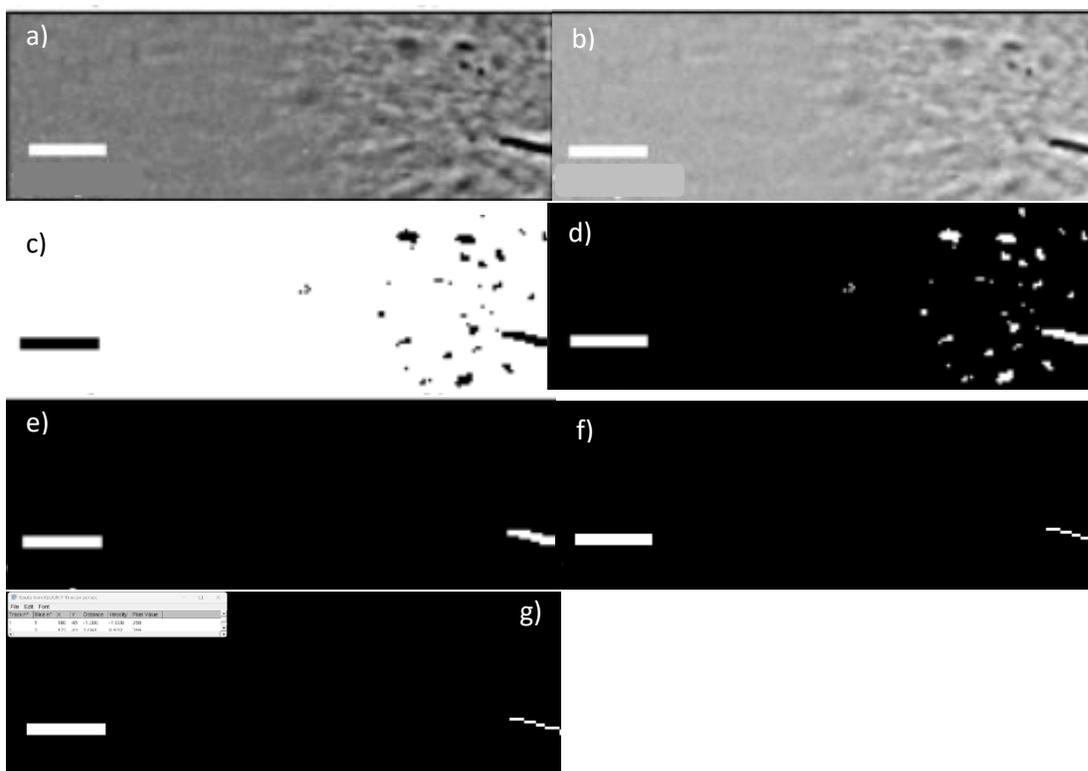
pincel o el lápiz > Color que determinamos > aplicación en el área que lo requerimos (Figura 15.e).

### **2.5.7 Esqueletización**

Finalmente, para tener el stack en condiciones en las cuales podamos estudiar y extraer información de las imágenes. Se hará una esqueletización donde los píxeles reducen su tamaño, lo cual nos permitirá determinar la forma que tiene nuestra hifa a lo largo de su crecimiento. Process > Binary > Skeletonize (Figura 15.f). Este procedimiento solo será posible realizarlo cuando estemos en la etapa del análisis por hifa.

### **2.5.8 La herramienta Tracking Mate**

Una vez procesado el stack ahora extraeremos la información que necesitamos, en este caso, son las coordenadas del ápice de la hifa o el centro del frente de colonia cada 10 minutos. Por lo tanto, usaremos un plugin que tiene FIJI, el cual nos permite hacer un seguimiento de este ápice o frente de colonia, donde de manera manual seleccionaremos la punta o frente y de forma automática se generarán las coordenadas que se guardarán en un archivo Excel. Plugins> Tracking> Manual Tracking (Figura 15.g).



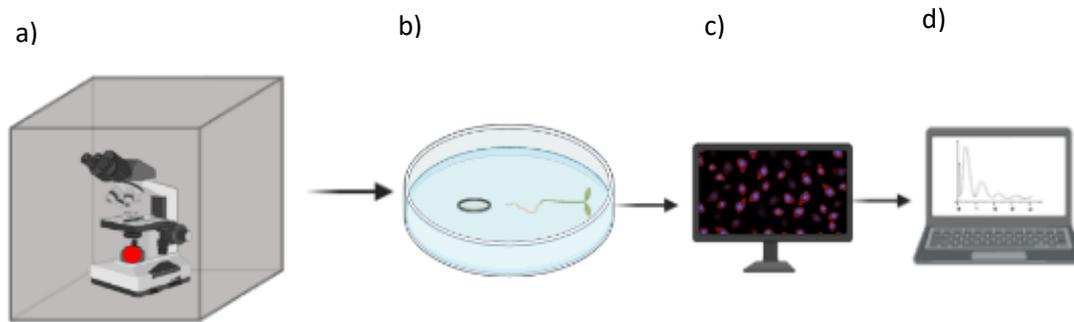
**Figura 15.** Pasos para el procesamiento de nuestro stack. a) Intervalo espacio, del ápice de una hifa. Elegimos la hifa que seguiremos a lo largo del video. b) Sub-stack con ajuste de contraste y brillo, acomodamos el contraste y brillo de las imágenes para mejorar la observación. c) Sub-stack con umbralización. d) Sub-stack binarizado, convertimos el stack a escala de blancos y negros. e) Sub-stack en donde eliminamos elementos que no son parte de la hifa, removemos partículas. f) Sub-stack esqueletizado, hacemos un proceso donde adelgazamos el tamaño de la hifa. g) Sub-stack con Tracking Mate, elegimos este comando para obtener las coordenadas de ápice o frente de colonia: Barra de escala 1000  $\mu\text{m}$ .

## 2.6 El análisis de datos

Teniendo nuestro stack procesado ahora podemos hacer una serie de estudios para ver el desarrollo que tiene esta interacción en ambos organismos. Por consiguiente, se hará un análisis del crecimiento que tenga el micelio al estar creciendo solo y creciendo en dirección a la raíz de la plántula. Para establecer un promedio de la velocidad de crecimiento, procederemos con la ayuda de un programa que construiremos en *Mathematica*. Con estos dos estudios se podrá establecer si existen una respuesta que tenga el hongo en su desarrollo mediante los análisis de los stacks.

También se planea hacer mediciones de las distancias recorridas por el hongo en un intervalo de tiempo y ver su cambio al crecer con la raíz y por sí solo. Para completar nuestro estudio de manera macroscópica se establecerán los cambios en

la morfología de la colonia para determinar cómo ocurre la respuesta de reconocimiento entre los dos sistemas biológicos.



**Figura 16.** Proceso para la obtención de datos haciendo una captura y análisis de imágenes. a) Caja negra para colocar el microscopio con la cámara para capturar imágenes y solo tener luz roja en su interior. b) Minicámara donde se colocarán la plántula y el hongo para su crecimiento juntos. c) Captura y procesamiento de imágenes para obtener información. d) Análisis estadísticos de los datos obtenidos.

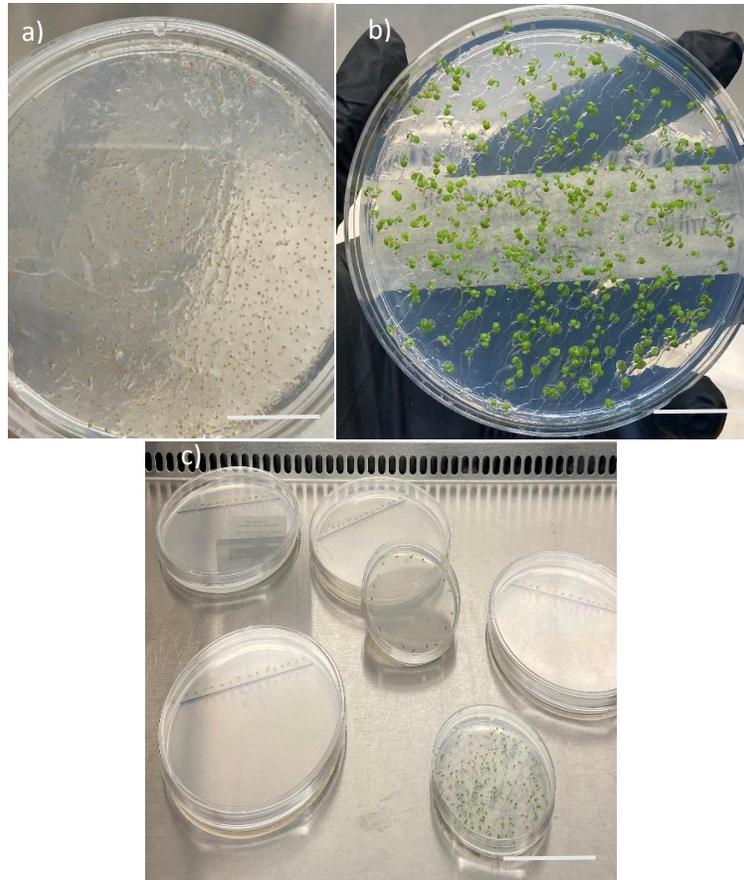
## 3. RESULTADOS

### 3.1 El crecimiento de organismos: *Trichoderma atroviride* y *Arabidopsis thaliana*

Con la finalidad de obtener los conidios frescos de *T. atroviride* que serán usados como inóculo para observar al hongo en la interacción con la plántula, se recolectaron y contaron los conidios como se describió en el capítulo anterior haciendo uso de la cámara de Neubauer y el microscopio óptico. Lo que se obtuvo fue una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/mL.

Para obtener las plántulas de *Arabidopsis* con una edad y longitud específicas, se esterilizaron las semillas para seguir con su siembra, después se realizó una sincronización e incubación para tener un crecimiento adecuado de las semillas a las plántulas. Se obtuvieron las plántulas de 7 a 9 días con una longitud de aproximadamente un centímetro de raíz.

Por lo tanto, tomando las condiciones y los tiempos adecuados pudimos obtener los organismos con edad y crecimiento correcto que serán estudiados en nuestra investigación.



**Figura 17.** a) Semillas sembradas en placas Petri. b) Plántulas en la placa, después de 4 a 5 días de edad. c) Trasplante de plántulas, después de 6 días trasplantamos nuestras plántulas a nuevas placas Petri. Barra de escala 2 cm.

## 3.2 La minicámara de crecimiento

Con el objetivo de realizar una minicámara de crecimiento para colocar al hongo y la plántula para analizar su interacción fue necesario seguir un orden cronológico. Primero se trasplantó la plántula a la placa, donde se aclimató por un día a 22 °C. Posteriormente, se inocularon 5  $\mu$ L de conidios frescos a una distancia de 5 mm desde la punta de la raíz. Para detectar el crecimiento del hongo se incubó a ambos organismos por 24 h más en la oscuridad a 22 °C. Al término de estas 24 h en incubación se llevó la minicámara de crecimiento al microscopio.

En cuanto a las pruebas control solo se inoculó el hongo al centro de la minicámara de crecimiento y se creció bajo las mismas condiciones. Al término de estas 24 h, se llevó la placa para observaciones al microscopio para la recolección de datos.

Con la elaboración de la minicámara de crecimiento se desarrolló una forma de tener un buen crecimiento tanto del hongo y la plántula. De igual forma, se evitó la contaminación y se puede ajustar la microcámara al sistema de microscopía y obtener buena información de la interacción de ambos organismos.

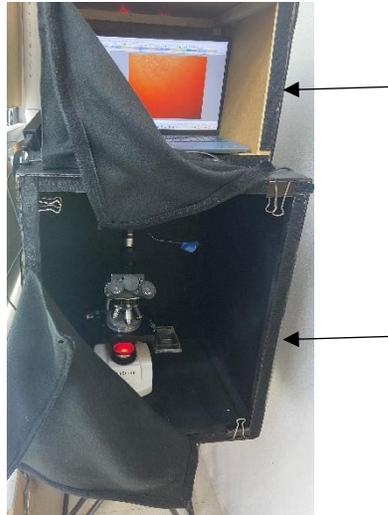


**Figura 18.** Plántula y conidios día uno, en la cámara de crecimiento. En la minicámara que formamos colocamos la plántula y los conidios a una distancia de 5 mm: Barra de escala 2 cm.

### 3.3 La construcción de la caja negra

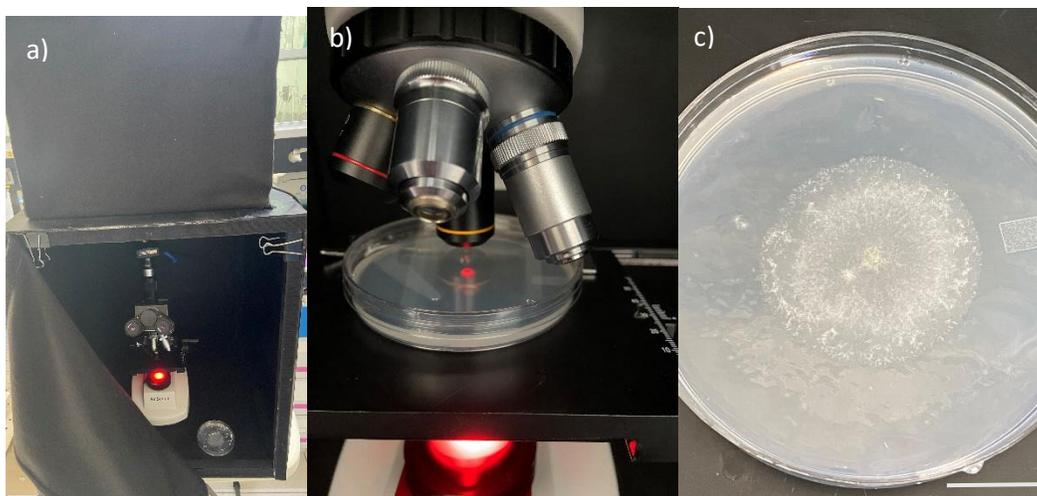
Paralelamente, se hizo la construcción de la caja negra para el microscopio, con la finalidad de evitar contaminación por luz del exterior. La cámara se hizo en base a las medidas del microscopio para colocarlo y manipularlo. De igual forma, se fabricó otra caja para colocar a la computadora.

Un factor importante en este sistema es la luz roja a utilizar ( $\lambda = 600-650 \text{ nm}$ ), por lo que se usó un filtro que solo permita pasar la longitud de onda requerida.



**Figura 19.** Sistema de observación, cámara oscura para el microscopio y caja para computadora. En la caja de arriba colocamos la computadora que hará la captura de imágenes. En la cámara oscura de abajo instalamos al microscopio con el filtro rojo.

Al haber hecho la construcción de ambas cajas, fue necesario hacer la comprobación de la estabilidad del microscopio en la caja negra, esto es, que tenga un soporte para todos los instrumentos que conlleva el sistema y no tenga una movilidad considerable que después sea perjudicial en la captura de imágenes. Por otro lado, también se tiene que hacer una comprobación en cuestión al parámetro de luz, lo que quiere decir, que la caja no deje pasar otras longitudes de onda del exterior que no sea la que queremos y que el filtro que usamos efectivamente sea el adecuado para este estudio, donde no le dé ningún tipo de estrés al hongo. Para poder hacer esta comprobación, se realizó una prueba donde se hizo una muestra de *T. atroviride* inoculada en una placa de Petri y se dejó en observación durante 3 días en el microscopio en un contacto con el filtro rojo, sin perturbarlo en ninguna situación en este periodo de tiempo.



**Figura 20.** a) Microscopio con el filtro de  $\lambda=650$  nm al interior de la cámara oscura. b) Muestra de *T. atroviride* en contacto con el filtro rojo, se realizó la observación por tres días. c) Colonia de *T. atroviride* a los 3 días de observación, se distingue que no hay una conidiación. Barra de escala 2 cm.

Como se observa, al final de este análisis, no hubo conidiación de *Trichoderma* lo que indica que no estuvo en contacto con longitudes de onda en el azul o UV que hayan desencadenado el fenómeno de conidiación, lo que concuerda con estudios previos sobre la conidiación por parte de *T. atroviride*.

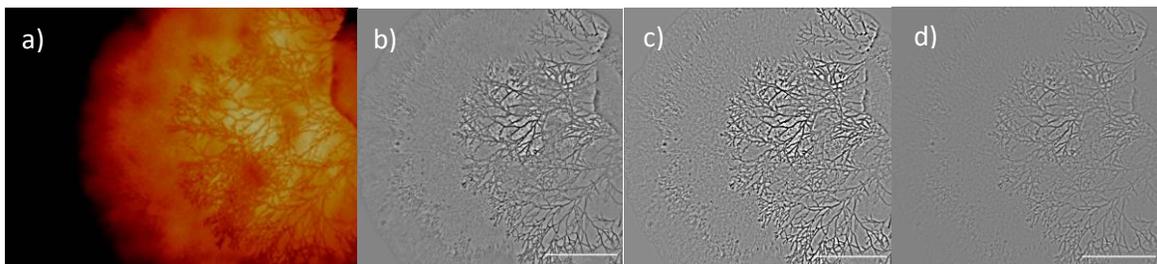
### 3.4 La adquisición y el procesamiento de imágenes

Para poder tener información de la interacción entre el hongo y la planta, se tuvo como objetivo crear una forma para capturar imágenes y construir una manera de procesarlas para extraer los datos del crecimiento del hongo. Para el proceso de la captura de imágenes, se hizo uso del software AmScope, donde se programó para obtener un *time-lapse* de 24 h en la cual, se tomaron las imágenes cada 60 s por muestra. En total se hizo una captura de 10 muestras, 5 correspondientes a las pruebas control y 5 correspondientes a las pruebas de interacción hongo-planta. En cada muestra se capturaron un total de 1440 imágenes referentes a 24 h de observación. Estas imágenes se almacenaron de manera automática en carpetas que indicaban el día de la toma de las muestras.

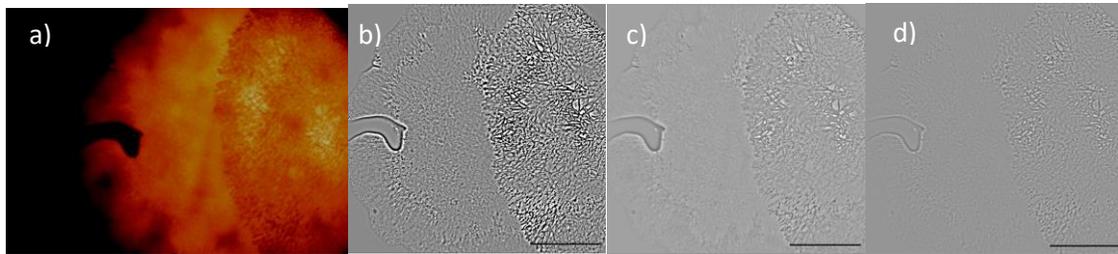
Con ayuda del software de AmScope y una regleta de calibración especial para el microscopio se pudo determinar que para el objetivo de 2x, un píxel equivale a 3.69  $\mu\text{m}$ , cantidad necesaria para poder hacer una calibración de los stack al realizar los análisis.

Una vez realizada la captura de imágenes, se realizó el procesamiento de estas. Para cada muestra tomada, el stack correspondiente estuvo comprendido por un total de 1440 imágenes, en donde percibimos con totalidad el desarrollo del micelio. Al contar con una cantidad de imágenes considerable, se concluyó que para disminuir esta cantidad de imágenes y tener una mejor percepción del crecimiento del hongo que fuera mejor vista la diferencia de imagen a imagen, se haría un proceso de diezmar el stack. Esto consistió en tomar las imágenes que fueron tomadas cada 10 minutos en lugar de cada minuto y realizar un nuevo stack, de tal modo que se redujo la cantidad de imágenes por stack a 140 por muestra. Con este proceso realizamos un rápido y eficiente procesamiento de stacks y se observó un mejor crecimiento del micelio.

Para limpiar los stacks, se empezó por la calibración del stack donde convertimos de pixeles a  $\mu\text{m}$  (un pixel equivale a  $3.69 \mu\text{m}$ ). Se cambió a 8 bits para disminuir su tamaño, además este paso elimina algunos ruidos que se presentan en las imágenes a la hora de su captura. Lo siguiente, es especificar el área de captura del objetivo. También, realizamos una segunda transformación al stack para reducir aún más su tamaño y finalmente aplicar un filtro gaussiano para mejorar la calidad de la imagen. Concluido este primer proceso de modificación para los stacks, colocamos la barra de escala. Aun así, tuvimos algunas interferencias en las imágenes provenientes por la luz o por el medio, por lo que se eliminaron esos ruidos sustrayendo el fondo de las imágenes que forman a los stacks.



**Figura 21.** a) Imagen original capturada del frente de la colonia. b) Conversión de la imagen original a escala de grises (8 bits) para reducir el tamaño de la imagen y disminuir el campo de visión. c) Ajuste de contraste y brillo a la imagen para tener mejor visualización del micelio. d) Sustracción de fondo de la imagen, para solo tener el micelio eliminamos el fondo de la imagen para eliminar ruidos. Barra de escala  $1000 \mu\text{m}$ .



**Figura 22.** a) Imagen original capturada del hongo en presencia de la raíz de la plántula. b) Conversión de la imagen original a escala de grises (8 bits) para reducir el tamaño de la imagen. c) Ajuste de contraste y brillo a la imagen para tener mejor visualización del micelio. d) Sustracción de fondo de la imagen, para solo tener el micelio eliminamos el fondo de la imagen para eliminar ruidos. Barra de escala 1000  $\mu\text{m}$ .

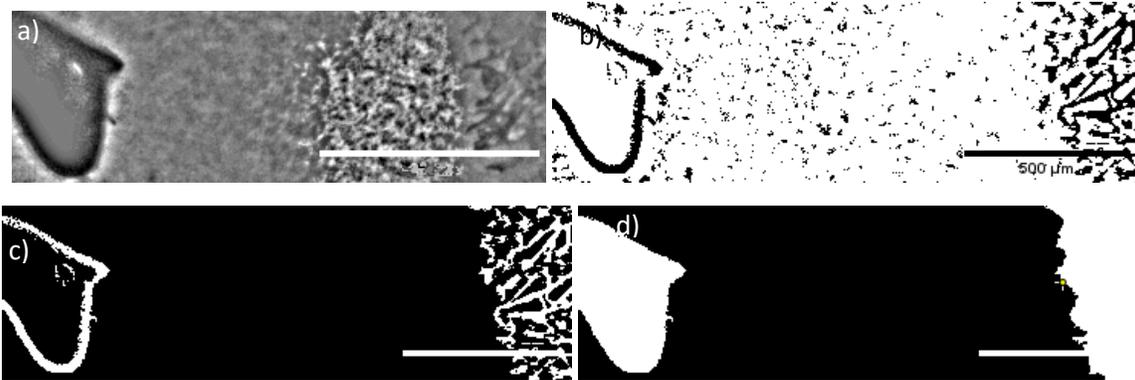
Para obtener la información de los stacks, nos centraremos en adquirir las coordenadas de un ápice elegido o cuando llegue el momento del frente de colonia. Se eligió una hifa para seguirla en el transcurso del stack para obtener las coordenadas del ápice en cada imagen y determinar su crecimiento. La hifa llegó a un punto donde no fue posible seguirla ya que, por la alta cantidad de ramificaciones se generó una densidad de hifas alta, cuando llegó este momento obtendremos las coordenadas de un punto central en el frente de la colonia.

Para empezar con este proceso, a medida que el stack avanzó y la hifa creció, fue necesario hacer movimientos en el campo de visión de manera manual, a causa de que el objetivo del microscopio solo alcanzó a detectar hasta cierta parte del hongo conforme se va desarrollando, es por esta razón que observamos en el stack cambios de área. Cabe señalar que, a partir de estos traslados de campo en el stack, segmentamos el stack en regiones (sub-stack) que nos permitió realizar el procesamiento de una forma más rápida, regularmente para cada stack completo tenemos un total de 5 sub-stack para procesar.

Para cada sub-stack se seleccionó un intervalo espacial de solo la hifa que se eligió seguir, esto quiere decir que elegimos una ROI (Región de interés). Comúnmente se seleccionó la hifa que tenía mayor crecimiento, en vista que era la más fácil de detectar en el transcurso del stack. Esta ROI se hizo para eliminar las otras hifas del micelio que no nos servirían en este proceso y podrían dificultar la obtención de resultados. Al haber hecho este recorte de área, se procedió a realizar una binarización al nuevo sub-stack. Se partió de hacer algunos ajustes al contraste y brillo para resaltar los elementos del micelio que queremos estudiar. Lo siguiente es hacer cambios en la umbralización que nos permitió realizar el paso de la binarización que necesitamos, una vez binarizada, tendremos el stack en blanco y negro. Finalmente se visualizaron algunas partículas que no pertenecen a la hifa o la colonia, por lo tanto, se removieron de manera manual, para tener un stack limpio y binarizado. Para concluir este proceso cuando es el caso del estudio a nivel hifa, se hizo una esquelización de la hifa, esto es, hacer un adelgazamiento de los

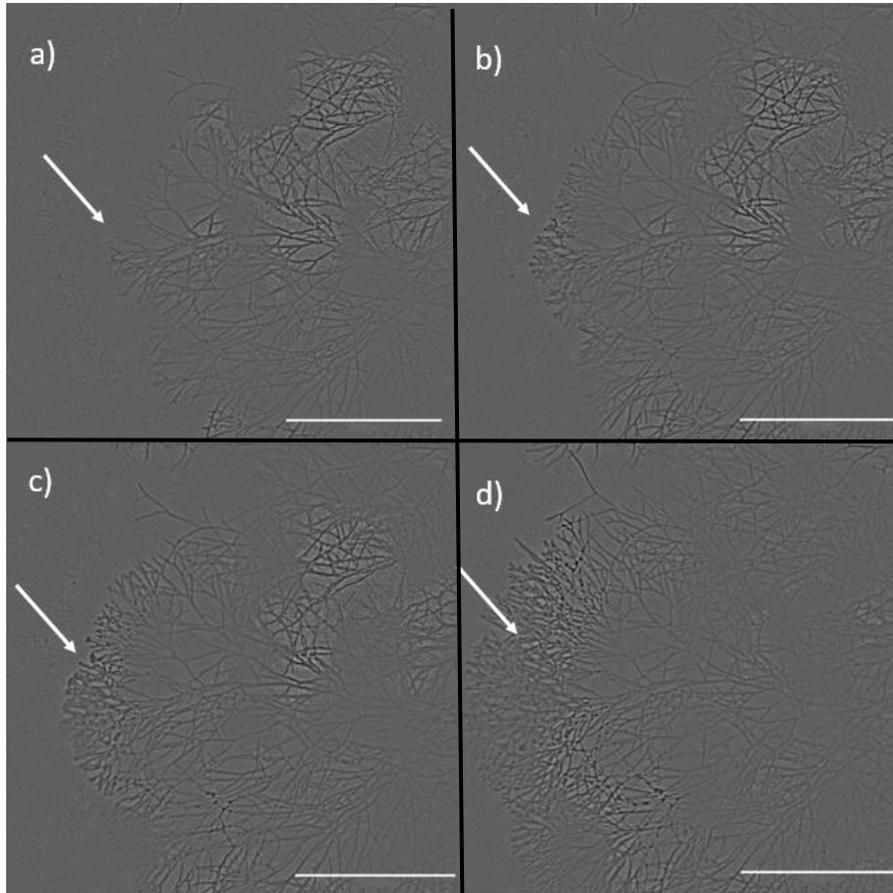
pixeles que forman la hifa. En caso de estar en el proceso a nivel colonia solo llegamos al paso de tener el stack limpio y binarizado.

Con todo el procesamiento de los stacks concluido, con ayuda de un plugin de *ImageJ/FIJI*, llamado *Tracking Mate*, se seleccionó el ápice de la hifa conforme pasa las imágenes. Al hacer uso de esta herramienta, las coordenadas (x,y) se guardaron de manera automática en un archivo Excel, por lo tanto, por muestra se tiene un total de 140 coordenadas. Cuando se llegó el momento de obtener las coordenadas por el método de frente de colonia, lo que se hizo fue elegir el centro del frente de la colonia.



**Figura 23.** a) Selección de intervalo espacial, al tener el frente de colonia elegimos la zona que estará opuesto a la raíz. b) Umbralización de la imagen. c) Binarización de la imagen y eliminación de partículas, realizamos una limpieza de las imágenes. d) Obtención de datos por frente de colonia, en este paso homogenizamos todo el frente de la colonia. Barra de escala 1000  $\mu\text{m}$ .

Al momento de analizar algunos stack de las imágenes, nos percatamos que en el desarrollo del micelio hay un punto donde se hace una ramificación considerable, por ello, se hace el frente de colonia denso. Con esta nueva información podemos darnos una idea de cómo es que se va transformando el micelio de hifas a colonia (Figura 24).



**Figura 24.** a) Hifas antes de la ramificación (6:00). b) Inicio de la ramificación. c) Formación de un frente con una densidad considerable. d) Terminó del proceso de ramificación densa a partir de esto el crecimiento sigue de la misma manera. Barra de escala 1000  $\mu\text{m}$ . Las flechas blancas indican el área de ramificaciones.

Por lo tanto, se desarrolló una estructura para la adquisición y procesamiento de imágenes que nos fue posible aplicar en 10 muestras para obtener información acerca del crecimiento del hongo con presencia y ausencia de la plántula. De igual forma, fue posible observar la interacción de ambos organismos de una manera dinámica y comprender mejor el desarrollo tanto del hongo como de la plántula conforme pasa el tiempo

### 3.5 El análisis de datos

Para realizar el análisis de datos, que tiene la finalidad de obtener información cuantitativa acerca de la respuesta que tenga el hongo ante la presencia y ausencia de la plántula, realizamos un proceso de construcción y análisis de datos, utilizando el software *Mathematica* para automatizar este procedimiento. En el software programamos una serie de instrucciones que nos permita insertar las coordenadas

del archivo proveniente de *FIJI*, obtener la distancia de punto a punto con ayuda de la distancia Euclidiana, obtener las gráficas de la trayectoria de la hifa por secciones y finalmente obtener el promedio de la velocidad en función del tiempo para cada muestra con su gráfica correspondiente.

En nuestro experimento obtenemos un conjunto de coordenadas  $\{(x_i, y_i)\}$ , en donde  $i = 1, \dots, n$ , las cuales definen la trayectoria del ápice de una hifa. Para calcular la velocidad instantánea de avance de la hifa ( $v_i$ ), consideramos la distancia entre puntos consecutivos:

$$\Delta_i = \sqrt{[(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2]} \quad 1.$$

y dividimos entre el intervalo de tiempo entre cuadros ( $\Delta t = 10 \text{ min}$ ):

$$v_i = \frac{\Delta_i}{\Delta t} \quad 2.$$

Finalmente, la distancia total de avance de la hifa es:

$$D = \sum_i \Delta_i \quad 3.$$

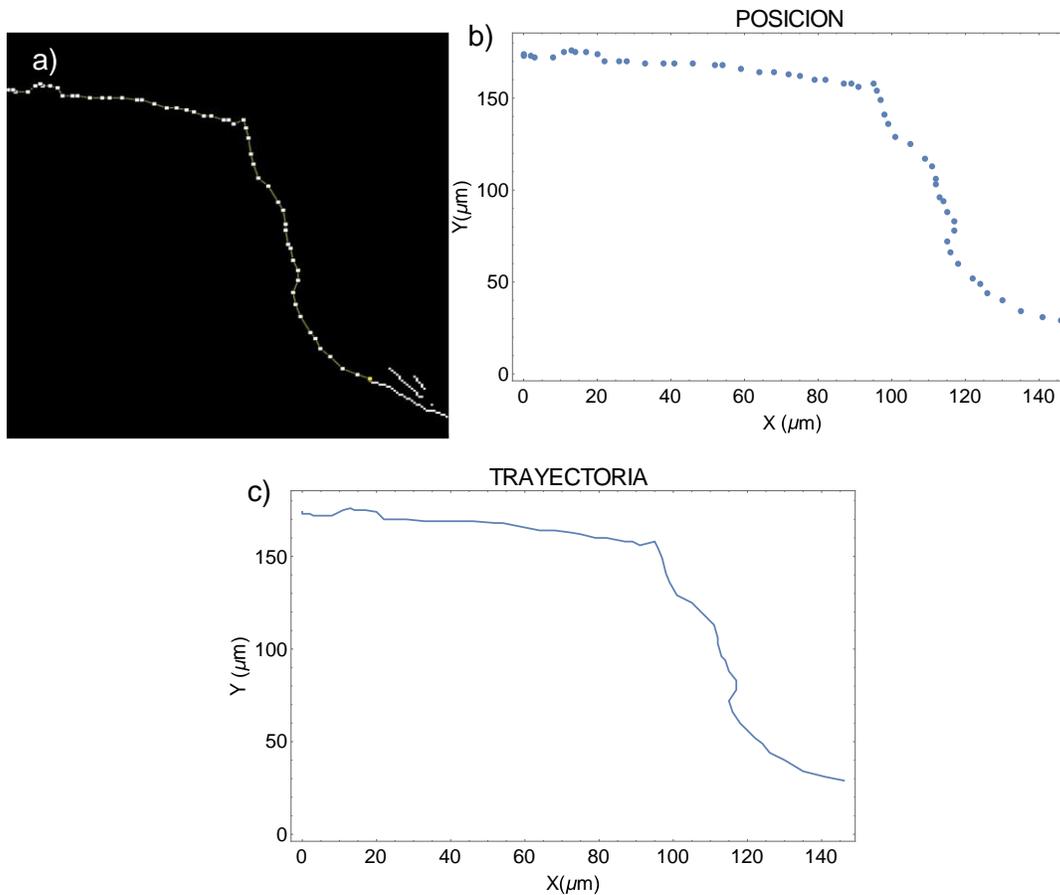
y la velocidad promedio de la hifa:

$$v_{\text{promedio}} = (1/N) \sum_i v_i \quad 4.$$

en donde N es el número de cuadros en el stack.

De igual forma usamos la información de las coordenadas que obtuvimos de cada muestra para realizar un gráfico por secciones de la posición de los ápices conforme pasa el tiempo cuando tenemos el caso a nivel hifa (Figura 25.a). Con esta misma información de las coordenadas se pudo determinar la trayectoria por secciones que recorrió la hifa (Figura 25.b).

Con los datos de la velocidad por muestra se trasladó a manera de gráfica para poder ver el comportamiento de las velocidades en el transcurso de las 24 h de cada muestra. Al tener los datos de las velocidades tomadas cada 10 minutos podemos ver en la gráfica un total de 1440 minutos (24 h). Cabe señalar mediante el protocolo que realizamos en la construcción de nuestra minicámara sabemos que antes de ser observado al microscopio el sistema hongo-plántula ya tenía 24 h juntos, por lo tanto, consideramos la 0 h cuando colocamos la minicámara ante el microscopio, al término de las observaciones de 24 h en el sistema de observación en total las muestras estuvieron 48 h juntas.



**Figura 25.** a) Obtención de la posición de las coordenadas conforme crece el ápice en el programa de *FIJI*. b) Gráfica de la posición a partir de las coordenadas. c) Trayectoria de la hifa con las coordenadas que se obtuvo en el procesamiento de imágenes en *Mathematica*. Se observa que podemos realizar la trayectoria que tenga la hifa a partir de las coordenadas (x,y).

### 3.5.1 La distancia de crecimiento del micelio

Comenzamos con los datos que se obtuvieron de las pruebas control, se hicieron un total de 5 muestras control para hacer la comparación con las pruebas hongo-plántula. De manera cuantitativa podemos ver en la **tabla 1** la distancia recorrida en las muestras de 24 h del hongo control.

Hongo control	Distancia total ( $\mu\text{m}$ )
1	6045.78
2	5827.76
3	6134.13
4	4874.97
5	4254.91

**Tabla 1.** Distancias totales recorridas de las cinco muestras control.

En la **tabla 2**, observamos los datos obtenidos de la distancia total de las pruebas del hongo creciendo con la plántula al paso de 24 h.

Hongo-planta	Distancia total ( $\mu\text{m}$ )
1	3200.15
2	3251.52
3	3832.22
4	3447.68
5	3080.93

**Tabla 2.** Distancias totales recorridas de las cinco muestras del hongo cuando esta ante la presencia de la plántula.

Como podemos observar en ambas tablas, tenemos la información suficiente para hacer una comparación de datos de las pruebas control con las pruebas hongo-plántula. Se muestra que, cuando el micelio estuvo creciendo solo, sin ninguna interacción de algún tipo, la hifa presentó una mayor distancia recorrida en el tiempo de 24 h, por lo tanto, tuvo un crecimiento más rápido a comparación de la prueba hongo-plántula. Por otro lado, cuando el micelio estuvo en presencia de la plántula, la hifa recorrió una distancia más corta, lo que indica un crecimiento más lento.

### 3.5.2 La velocidad de crecimiento apical y frente de colonia

En cuanto a la velocidad, obtuvimos de igual forma información para cinco muestras en cada caso. Haciendo uso de los datos que obtuvimos de la distancia total

recorrida por cada muestra y el tiempo de 10 min, que es el tiempo que transcurre entre cada punto. Se hizo uso de la fórmula 2, para obtener la velocidad promedio que tiene cada una de las muestras. Los datos obtenidos se pueden observar de manera cuantitativa en las **tablas 3 y 4**.

<b>Muestra hongo control</b>	<b>Promedio de la velocidad (<math>\mu\text{m}/\text{min}</math>)</b>
1	4.40
2	4.19
3	4.38
4	3.88
5	3.01

**Tabla 3.** Velocidad promedio del hongo en las cinco muestras control.

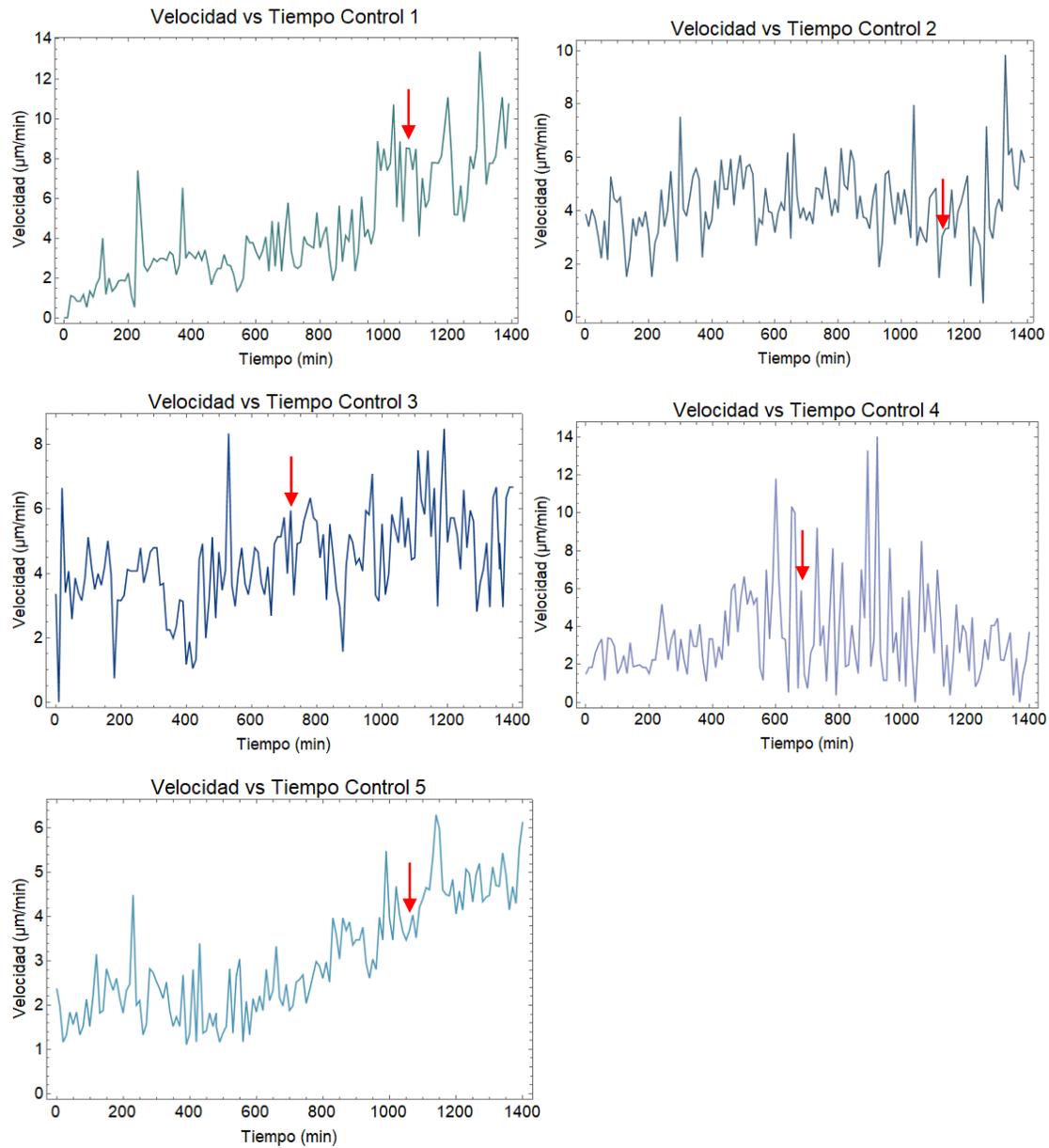
Para el caso del hongo junto con la planta, se siguió el mismo procedimiento ahora tomando en cuenta la información que tuvimos con respecto a las pruebas del hongo interactuando con la plántula.

<b>Muestra Hongo-planta</b>	<b>Promedio de la velocidad (<math>\mu\text{m}/\text{min}</math>)</b>
1	2.25
2	2.37
3	2.75
4	2.48
5	2.16

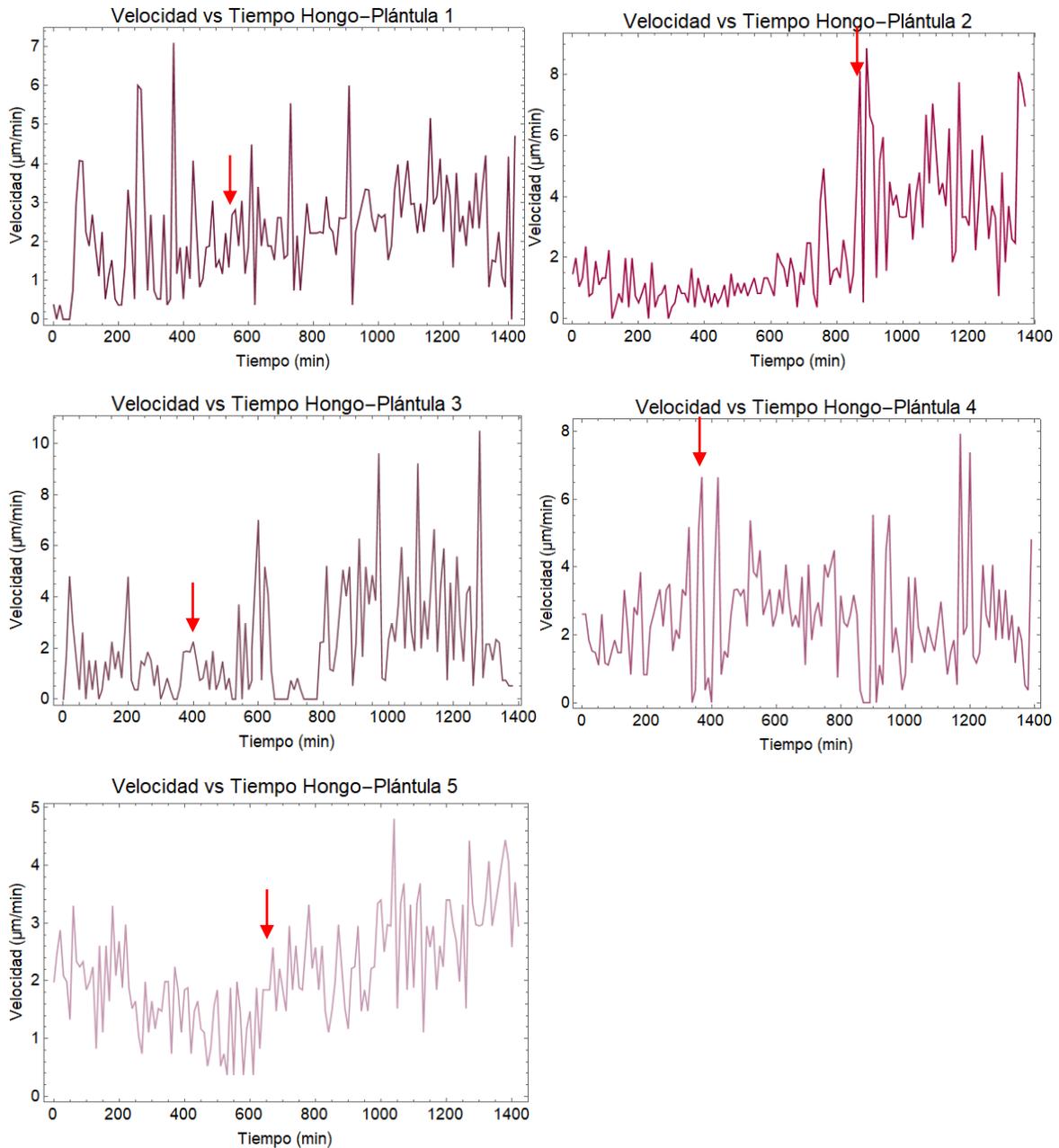
**Tabla 4.** Velocidad promedio del hongo de las cinco muestras de la interacción hongo-plántula.

De igual forma, al trasladar los datos de la velocidad a gráficas, conforme pasó el tiempo se puede observar el comportamiento del micelio bajo las dos condiciones. Las flechas en las gráficas indican la transición del análisis de nivel hifa a nivel colonia, como lo indican las flechas el momento del cambio es variado, por lo tanto,

no concluimos un patrón que fuera presente en esta transición del estudio (Figura 26).



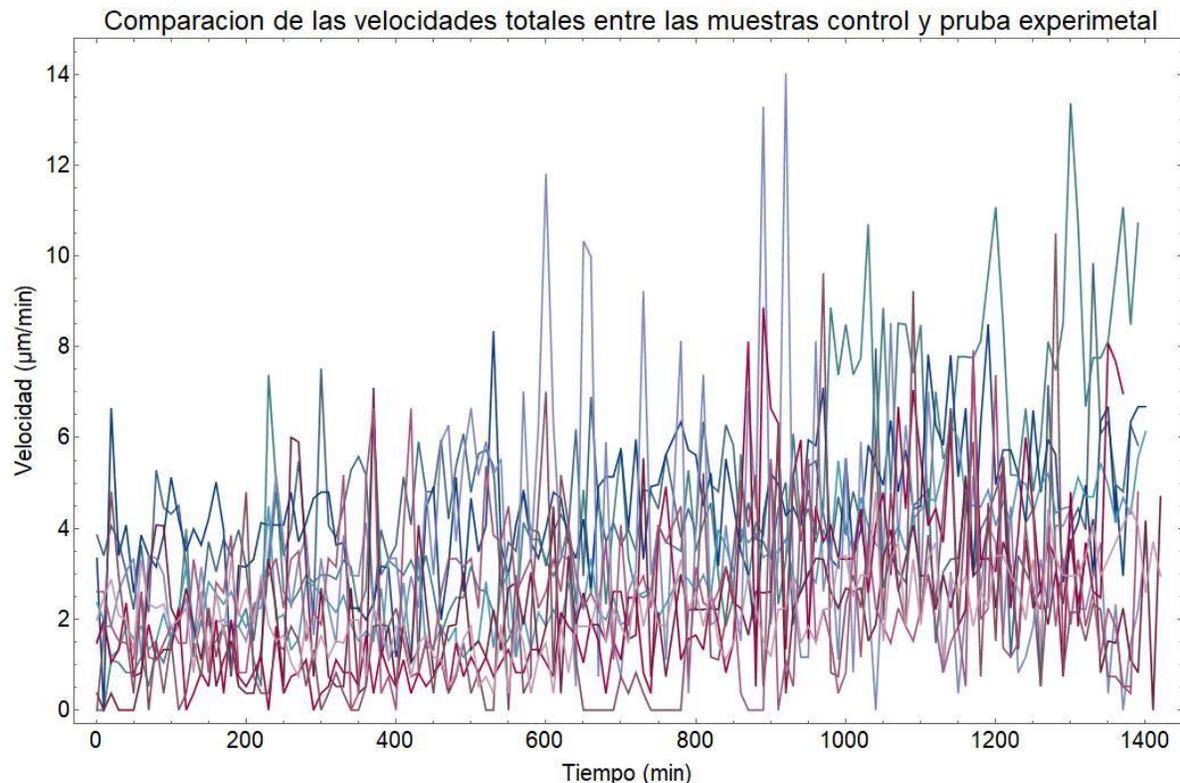
**Figura 26.** a) Gráfica correspondiente a la velocidad promedio de las muestras del control. Las flechas corresponden a el tiempo en donde el análisis pasa de forma de hifa a frente de colonia.



**Figura 27.** a) Gráfica correspondiente a la velocidad promedio de las muestras de la interacción hongo plántula. La flecha indica el cambio del análisis nivel hifa a frente de colonia.

En cuanto a la información de ambas tablas, observamos que existe diferencias en cuanto a la velocidad promedio del control con la velocidad promedio de la prueba hongo-plántula (Figura 29). Obtuvimos una velocidad promedio total de 4.10 (Figura 26)  $\mu\text{m}/\text{min}$  de las pruebas control y una velocidad promedio total de 2.40  $\mu\text{m}/\text{min}$  de las pruebas hongo-plántula (Figura 27). Con esta información podemos sugerir que el hongo detecta la presencia de la plántula aun sin contacto físico, ya que

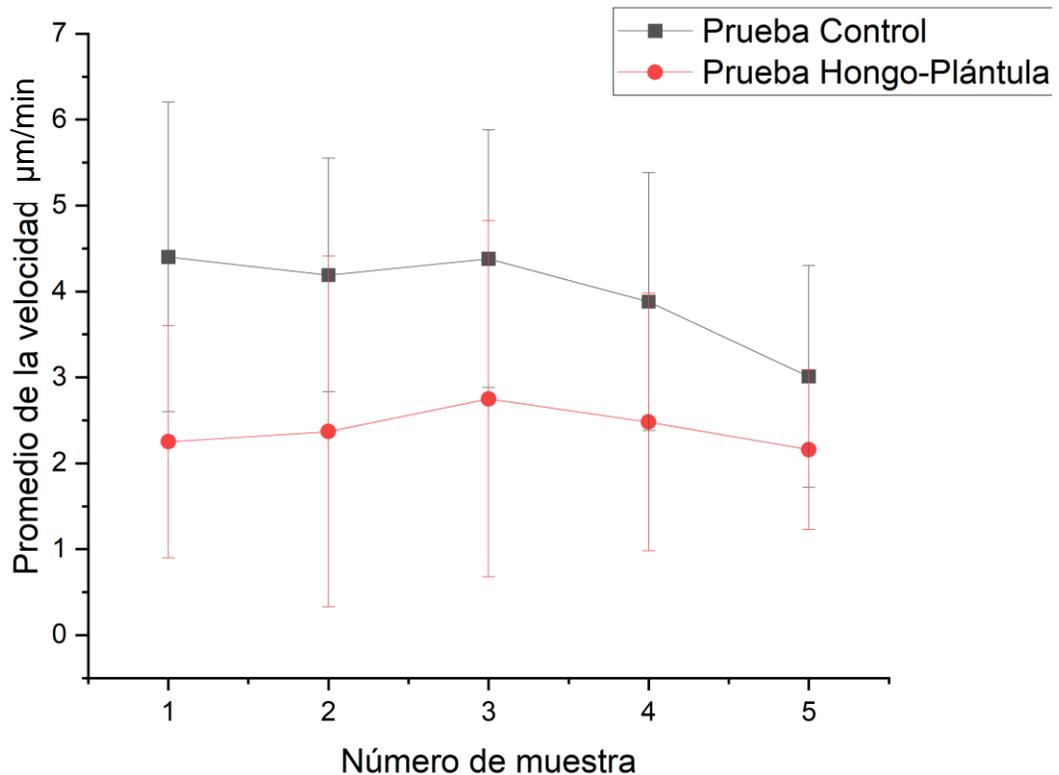
disminuye aproximadamente a la mitad su velocidad promedio (Figura 29). Pero si observamos más detenidamente las gráficas de las 10 muestras (Figura 26) (Figura 27), podemos obtener más información acerca del desarrollo de la velocidad en cada uno de los casos, siendo muy distinto el comportamiento que presenta el hongo en las pruebas control, a el comportamiento que tiene en las pruebas hongo-plántula (Figura 28).



**Figura 28.** a) Grafica comparativa de todas las muestras. Las gráficas de color azul corresponden a las muestras control y las gráficas en color rosa corresponde a las muestras hongo-plántula. Podemos observar que las muestras con planta tienen velocidades menores en comparación a las muestras control.

Para detectar de mejor manera los distintos comportamientos del hongo en los dos casos, recolectamos todas las velocidades tanto control como de las pruebas hongo-plántula en una sola gráfica (Figura 29). Como podemos observar en la gráfica, en el caso de las muestras control (líneas azules) tiene una velocidad más aleatoria desde un inicio, pero no disminuye la velocidad hasta llegar a cero, esto indica que, aunque las velocidades sean aleatorias siempre tendrán un valor. En cambio, para la velocidad de las muestras hongo-plántula (líneas rosas), la velocidad promedio es más pequeña que el control. En la gráfica de la Figura 28, existe una etapa primaria en la cual, el hongo tiene una velocidad más lenta hasta

llegar a un punto donde cada vez va aumentando. Lo segundo a notar, es que en la gráfica tenemos la presencia de puntos donde la velocidad no aumenta solo se permanece en cero, por lo cual no hay una contribución a la velocidad. En este tipo de situaciones podemos sugerir que el hongo tiene una reacción ante la presencia de la plántula por lo que detiene su crecimiento.



**Figura 29.** Gráfica de comparación de los promedios de las velocidades totales de las diez muestras a estudiar con su desviación estándar. La línea gris corresponde a las cinco pruebas control y la línea roja corresponde a las cinco pruebas hongo-plántula.

### 3.5.3 Análisis del crecimiento de colonia a nivel macroscópico

Para realizar un estudio más completo de los cambios que puede tener el hongo en ausencia y presencia de la plántula, realizamos un análisis de la colonia fúngica, debido a que, nos interesa conocer todo el panorama de alteraciones que pueda ocurrir en la estructura del micelio.

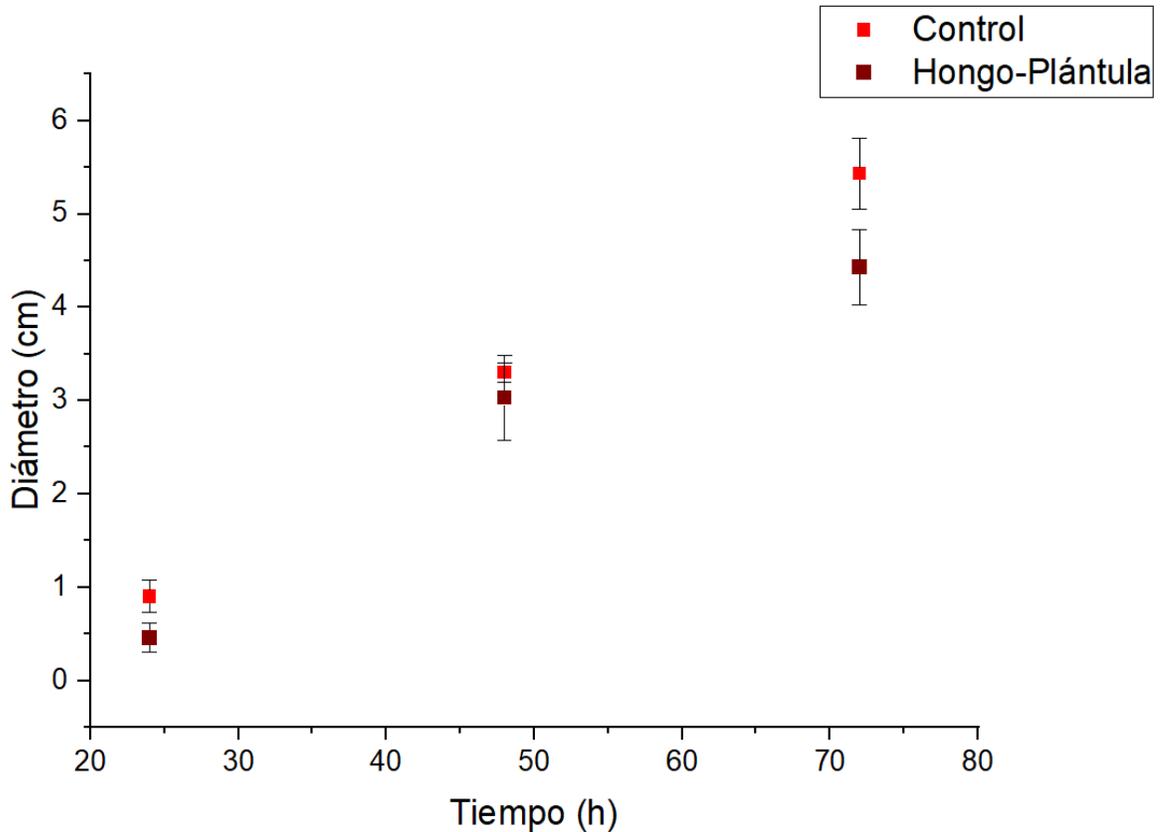
Para este estudio se analizaron las 3 muestras de las pruebas control y tres muestras para las pruebas de interacción hongo-plántula. Lo realizamos de tal manera en que sincronizamos todas las muestras para tratar de disminuir las variaciones lo más posible. Lo que hicimos fue medir el diámetro del micelio de las muestras en ambos casos, cuando trascurrieran 24 h, 48 h y 72 h para lograr tener más información de los cambios morfológicos a nivel colonia al tener más tiempo de estudio. Para obtener los datos de manera general y así poder graficar en ambas situaciones obtenemos el promedio de diámetro de las tres pruebas en cada caso con su respectiva desviación estándar, para trasladarlos a manera de grafica.

<b>Micelio Control</b>	<b>Promedio del diámetro (cm)</b>	<b>Desviación estándar</b>
24 h	0.9	0.17
48 h	3.3	0.10
72 h	5.43	0.37

**Tabla 5.** Promedio del diámetro del micelio control al trascurrir 24 h, 48 h y 72 h.

<b>Micelio Planta-Hongo</b>	<b>Promedio del diámetro (cm)</b>	<b>Desviación estándar</b>
24 h	0.46	0.15
48 h	3.03	0.45
72 h	4.43	0.40

**Tabla 6.** Promedio del diámetro del micelio ante la presencia de la plántula al trascurrir 24 h, 48 h y 72 h.



**Figura 30.** Gráfica correspondiente a los diámetros promedio de 24 h, 48 h y 72 h con el hongo control y el hongo con la plántula. Podemos observar que las muestras control tienen un diámetro mayor conforme pasa el tiempo comparándolo con las muestras hongo-plántula véase **Tabla 5 y 6**.

Como podemos observar en la gráfica de la Figura 30, se observa que el micelio control presentó un crecimiento mayor en comparación al micelio ante la presencia de la plántula. Algo que notamos fue que, al momento de tomar las mediciones del diámetro del micelio al estar con la plántula, el micelio crecía de manera desigual. Por lo tanto, se tomaron medidas de los radios del hongo donde notamos que el crecimiento de la colonia era distinto (Figura 32.c). Nos percatamos que las diferencias del crecimiento eran más notorias en el frente de la colonia en las horas de 48 h y 72 h porque a 24 h el micelio aun crecía homogéneamente.

De modo que, solo registramos las medidas de los radios del micelio en las horas 48 h y 72 h y denotamos que el lado A es el radio que está del lado de la plántula. El lado B es el radio que esta de manera contraria a la plántula (Figura 32.c).

Hora 48	Lado A	Lado B
	2.5 cm	0.5 cm
	2.6 cm	0.9 cm
	1.8 cm	0.8 cm

Hora 72	Lado A	Lado B
	2.1 cm	1.9 cm
	3.3 cm	1.2 cm
	2.6 cm	2.2 cm

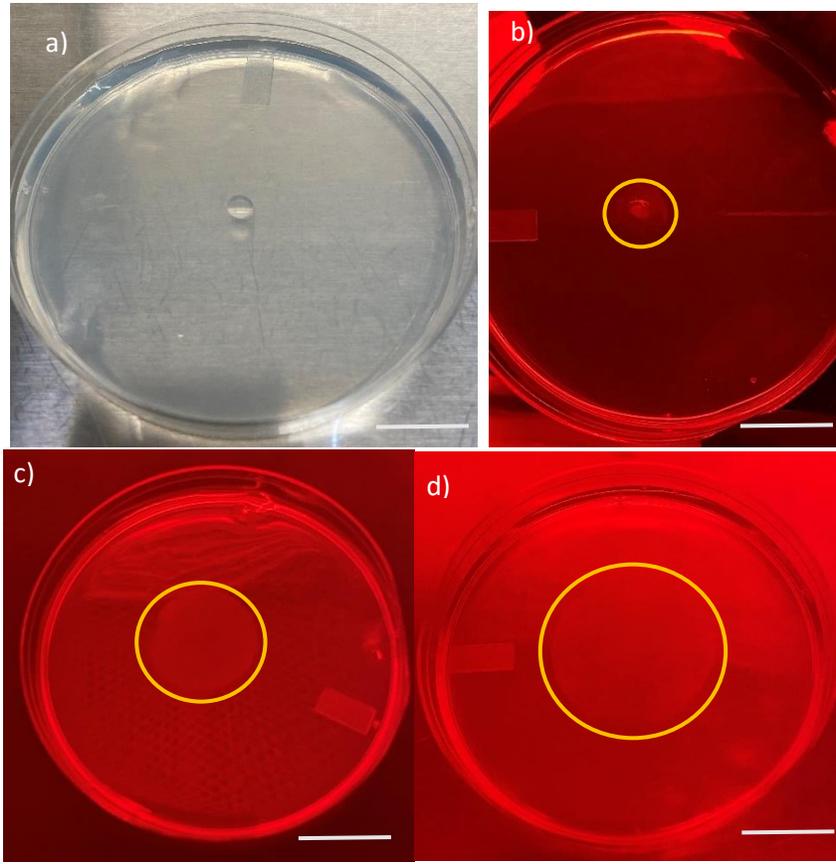
**Tabla 7 y 8.** Medidas del radio al paso de 48 h, lado A es el que da a la plántula y lado B es el que está al contrario de la plántula. Medida del radio al paso de 72 h, lado A y lado B.

Hora 48	Lado C
	1.7 cm
	1.6 cm
	1.65 cm

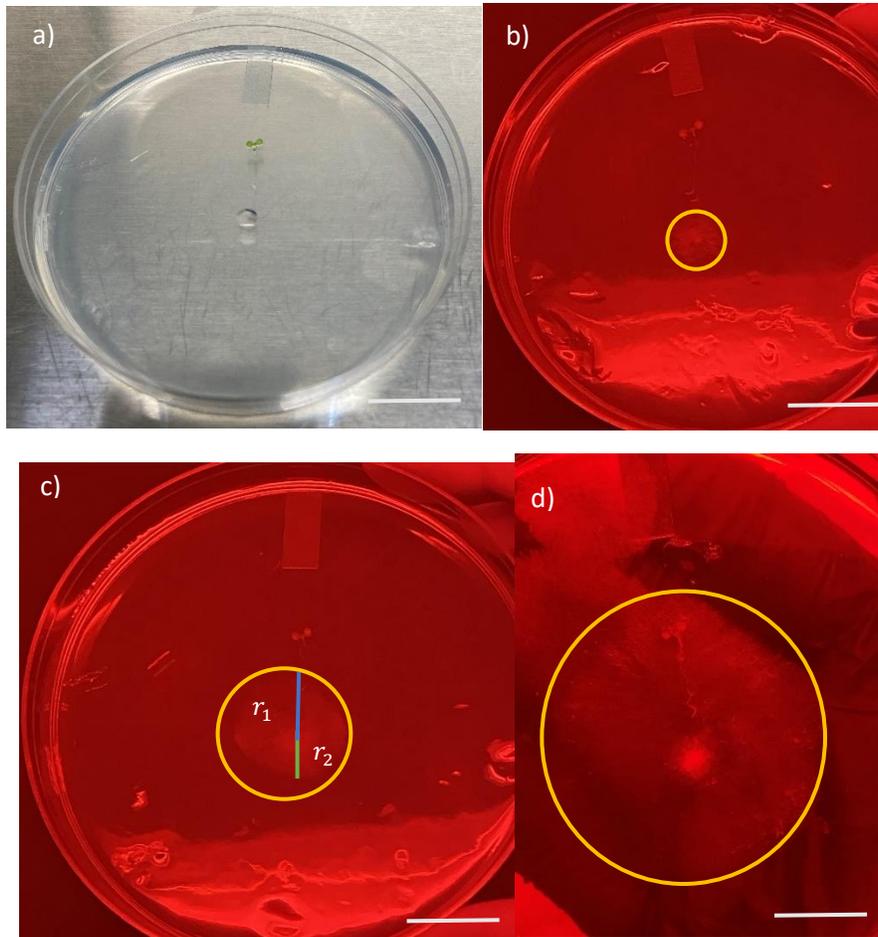
Hora 72	Lado C
	2.8 cm
	2.85 cm
	2.5 cm

**Tabla 9 y 10.** Medidas del radio al paso de 48 h, lado C corresponde al radio de la colonia del hongo control. Medida del radio al paso de 72 h, lado C.

Pudimos percatarnos de una tendencia del hongo de crecer más rápido cuando está en un contacto más directo con la plántula, teniendo una diferencia significativa en comparación a cuando el micelio está al lado opuesto del frente de la colonia con respecto a la raíz. Con esto podemos sugerir que el hongo detecta a la raíz y tiene un desarrollo mayor a cuando el micelio esta más alejado de la plántula. En la captura de imágenes macroscópicas podemos observar el desarrollo del micelio al largo de 24 h, 48 h y 72 h. Detectamos en las pruebas de interacción hongo-plántula que el frente de colonia sufre algunos cambios en su morfología ya que no crece de una manera homogénea por ambos lados, en comparación con las muestras control que siempre fue persistente un crecimiento homogéneo.



**Figura 31.** a) Inoculación de hongo. b) Micelio después de 24 h. c) Micelio después de 48 h, tiene un crecimiento radial y homogéneo. d) Micelio al cabo de 72 h. Barra de escala 2 cm.



**Figura 32.** a) Inoculación del hongo creciendo con plántula. b) Micelio después de 24 h. c) Crecimiento del hongo con la plántula después de 48 h, se observa un crecimiento irregular, línea azul corresponde al radio  $r_1$  (lado A) y línea verde corresponde al  $r_2$  (Lado B). d) Micelio del hongo después de 72 h. Barra de escala 2 cm.

## 4. CONCLUSIONES

A lo largo de este estudio pudimos concluir varios aspectos, que fueron posibles para el desarrollo y análisis de información en este proyecto.

✓ **Preparación de organismos: *Trichoderma atroviride* y *Arabidopsis thaliana*.**

Siguiendo los protocolos de preparación del hongo y la plántula, se pudo cultivar a ambos organismos libres de contaminación en tiempos correctos para su observación y análisis.

✓ **Construcción de la minicámara de crecimiento y la caja negra.**

Se estableció una estrategia para crecer ambos organismos en un solo sistema, el cual denominamos minicámara de crecimiento.

De igual forma, fue posible desarrollar un sistema de microscopia, en el cual, nos permitió observar la interacción del hongo y la plántula microscópicamente, cumpliendo con las condiciones que establecimos para su crecimiento y observación.

✓ **Adquisición y procesamiento de imágenes.**

Al capturar la interacción de ambos organismos de forma dinámica (stack), fue posible detectar la manera en que se da este acercamiento entre *Trichoderma atroviride* y *Arabidopsis thaliana* y poder extraer información de los stacks por procesamiento de imágenes y desarrollar un análisis estadístico.

✓ **Análisis de datos.**

De forma cuantitativa y cualitativa vemos el crecimiento del micelio en dos situaciones diferentes, cuando esta solo y cuando esta ante la presencia de la plántula, concluyendo que efectivamente existe una respuesta por parte del hongo, ya que se presentan diferencias en el comportamiento del micelio en ambos casos.

✓ **La velocidad de crecimiento apical y frente de colonia.**

En cuanto a el promedio de la velocidad control total del hongo se tiene un promedio de 4.10  $\mu\text{m}/\text{min}$  el cual, efectivamente concuerda con estudios anteriores que han determinado que el promedio de la velocidad del hongo es de 4.32  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Sánchez-Orellana et al., 2019). En caso de el promedio de la velocidad total del hongo en presencia de la raíz se tiene que es 2.40  $\mu\text{m}/\text{min}$  siendo menor que el control.

Con estos datos podemos concluir que la respuesta del hongo en interacción con la plántula, crece más lento, comparo con las condiciones control en

ausencia de la planta. De igual forma, observamos en las gráficas que la velocidad en la interacción tiende a ser muy lenta en el principio del estudio, dándonos un indicio que el hongo tarda más en reaccionar para crecer en comparación a cuando se encuentra solo.

✓ **El análisis del crecimiento de colonia a nivel macroscópico.**

Por otro lado, al hacer un análisis de manera macroscópica vemos que, en una situación de colonia, el micelio control crece de una manera más rápida y homogénea a cuando esta con la plántula cuando esta con la raíz, el crecimiento de todo el micelio es lento además que tiene irregularidades en su frente. Los cambios que presentó el micelio, fueron debido a que es notoria la diferencia de los radios de la colonia, porque cuando está más cerca de la plántula tiene una radio mayor a cuando está más lejos de la plántula.

Con estos datos, vemos que el hongo presenta cambios en su morfología en presencia de la plántula, debido a que, el hongo presenta cambios en su comportamiento, alterando su forma de crecimiento y características de su desarrollo. De igual forma, vemos que el hongo responde ante la presencia de la plántula, ya que, en este caso el hongo detecta la presencia de la plántula sin contacto físico, respondiendo de una forma diferente a como si creciera solo, proporcionando información de como el hongo percibe condiciones distintas en su entorno.

## 5. PERSPECTIVAS

Como trabajos futuros a realizar, se puede realizar este estudio de una manera automatizada.

Se podría aplicar la observación del hongo con la planta no solo 24 h si no tiempos más largos. Además de probar con distintas edades de plantas para confirmar los cambios que presentaría el hongo con estas nuevas condiciones.

Un análisis que nos ayudaría a complementar como se dan estos cambios en la morfología de los hongos es aplicar este estudio, pero con otros tipos de hongos filamentosos y plantas modelo. Este análisis nos daría una idea más amplia de como en la naturaleza existe esta comunicación entre organismos.

Otra situación para estudiar sería analizar de manera microscópica más a detalle la transformación del hongo de nivel hifa a cuando pasa a una colonia densa, ya que observamos que existe un momento donde el micelio alcanza una gran densidad de hifas formando una colonia densa.

## 6. REFERENCIAS

- Alexopoulos, C. J. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons.
- Antal, Z., Manczinger, L., Szakács, G., Tengerdy, R. P., & Ferenczy, L. (2000). Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycological Research*, *104*(5), 545-549.
- Begoude, B., Lahlali, R., Friel, D., Tondje, P., & Jijakli, M. H. (2007). Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and won the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal Of Applied Microbiology*, *103*(4), 845-854. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03305.x>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*(1), 11-21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bölker, M. (2001). *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, *147*(6), 1395-1401. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1395>
- Bowman, J. L., Smyth, D., & Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *1*(1), 37-52. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.1.37>
- Brotman, Yariv, J. Gupta Kapuganti, y Ada Viterbo. 2010. "Trichoderma". *Current Biology* *20*(9): R390–91.
- Brown, A. J. (2014). Morphogenesis in fungal pathogens: shape, size, and surface. *PLoS Pathogens*, *10*(12), e1004596.
- Callaway, R. M. (2007). Positive Interactions and Interdependence in Plant Communities. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6224-7>
- Callister, W. D. (1985). *Materials Science and Engineering: An Introduction*. [http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/53063/1/Callister%20-%20Materials%20Science%206th%20SOLUTION\\_www.khailtamasha.com.pdf](http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/53063/1/Callister%20-%20Materials%20Science%206th%20SOLUTION_www.khailtamasha.com.pdf)

- Camarena-Gutiérrez, Gabriel. (2012). interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, vol. 18, núm. 3, 409-421 <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Casas-Flores, S., Ríos-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., & Herrera-Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 150(11), 3561-3569. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27346-0>
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A., & Delgado-Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *PubMed*, 10(1), 19-27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17407057>
- Connell, J. (1983) On the Prevalence and Relative Importance of Interspecific Competition: Evidence from Field Experiments. *The American Naturalist*, 122, 661-696. <https://doi.org/10.1086/284165>
- Contreras-Cornejo, H. Á., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M., & Dewdney, J. (2008). Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in *Arabidopsis* Seedlings. *Molecular Plant*, 1(3), 423-445. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn019>  
(Denoux et al., 2008)
- Flores-Enríquez, A. F. (2022). Estudio de las características y la dinámica de la red asociada al micelio del hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*. *Benemérita Universidad Autónoma de Zacatecas*, 1-117.
- Sánchez-Orellana, G., Casas-Flores, S., & Gutiérrez-Medina, B. (2019). Automated, continuous video microscopy tracking of hyphal growth. *Fungal Genetics And Biology*, 123, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.11.006>
- Gibson, S. F. (2019). Introduction to the use of fluorescence microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, 88.

- Goh, C. S. (2014). Filamentous Fungi in the Production of Food Ingredients, Enzymes and Antibiotics. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes, and Nutraceuticals*. 3-24.
- Gómez-Daza, F. Características generales de los hongos e infecciones sistémicas y oportunistas de las micosis tropicales. 1-20. *Médica panamericana*.
- González R, R. W. (2017). *Digital Image Processing*. Pearson.
- González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). The Arabidopsis-Trichoderma interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34500-w>
- Gow, N. A. R., Brown, A. J. P., & Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion In Microbiology*, 5(4), 366-371. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00338-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00338-7)
- Gilbert, S. F. (2016). *Developmental Biology*. Sinauer Associates.
- Guzmán Altamirano, M. A. (2015). Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía óptica de campo claro. *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.*, 1-106.
- Green, J., & Sharpe, J. (2015). Positional information and reaction-diffusion: two big ideas in developmental biology combine. *Development*, 142(7), 1203-1211. <https://doi.org/10.1242/dev.114991>
- Gupta, K. J., Mur, L. A. J., & Brotman, Y. (2014). Trichoderma asperelloides Suppresses Nitric Oxide Generation Elicited by Fusarium oxysporum in Arabidopsis Roots. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 27(4), 307-314. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-13-0160-r>
- Humphreys, C. P., Franks, P. J., Rees, M., Bidartondo, M. I., Leake, J. R., & Beerling, D. J. (2010). Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1105>
- Inbar, J., Menéndez, A., & Chet, I. (1996). Hyphal interaction between Trichoderma

harzianum and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology & Biochemistry*, 28(6), 757-763. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(96\)00010-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00010-7)

- Jones, M. M. (2018). Mycelium Biofabrication: A review of Fungal Biopolymer Production and its Applications. In *Microbial Biopolyester Production, Performance, and Processing*. Springer, 175-199.
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/elife.06100>
- Kredics, L., László, M., Zsuzsanna, A., Péntzes, Z., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2004). In vitro water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential\*. *Journal Of Applied Microbiology*, 96(3), 491-498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02167.x>
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310-350. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.2.310>
- Lander, A. D. (2019). Biological patterning and tissue morphogenesis. 176(5), 947-963.
- Lavagnino, N., Massarini, A., & Folguera, G. (2014). SIMBIOSIS y EVOLUCIÓN: UN ANÁLISIS DE LAS IMPLICACIONES EVOLUTIVAS DE LA SIMBIOSIS EN LA OBRA DE LYNN MARGULIS. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*, 14(29), 161-181. <https://doi.org/10.18270/rcfc.v14i29.1654>
- Lee, S., Hung, R., Yap, M., & Bennett, J. W. (2015). Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Archives Of Microbiology*, 197(5), 723-727. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1104-5>
- Lecuit, T., & Goff, L. L. (2007). Orchestrating size and shape during morphogenesis. *Nature*, 450(7167), 189-192. <https://doi.org/10.1038/nature06304>
- Liao, H. &. (2020). Video Microscopy: The Fundamentals. In *Dynamic Imaging in Microscopy*. Springer, 3-29.
- Lorito, M. (2010). Spotlight on biocontrol agents: *Trichoderma* spp. against plant pathogens. *Microbial Biotechnology*, 207-210.
- 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. <http://mail.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/download/41/34>
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>
- Murphy, D. B. (2001). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York: Wiley-Liss.
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J. T., Jiménez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers In Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>
- Ojaghian, S., Wang, L., Xie, G., & Zhang, J. (2019). Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136, 103999. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.103999>
- Passardi, F., Dobiáš, J., Valério, L., Güimil, S., Penel, C., & Dunand, C. (2007). Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal Of Plant Physiology*, 164(8), 980-992. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.06.008>
- Prevedel, R. (2018). Next-generation imaging techniques for neural circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 50, 242-250.
- Pisi, A., Cesari, A., Zakrisson, E., Filippini, G., Roberti, R., & Mantovani, W. (2001). SEM Investigation about Hyphal Relationships between Some Antagonistic Fungi against «*Fusarium*» spp. Foot Rot Pathogen of Wheat., 40, 37–44. [https://doi.org/10.14601/phytopathol\\_mediterr-1588](https://doi.org/10.14601/phytopathol_mediterr-1588)
- Rebolledo-Prudencio, O. G., Dautt-Castro, M., Estrada-Rivera, M., Del Carmen González-López, M., Jijón-Moreno, S., & Casas-Flores, S. (2020). *Trichoderma* in the rhizosphere. En *Elsevier eBooks* (pp. 3-38). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819453-9.00001-5>
- Salazar-Badillo, F. B., Sánchez-Rangel, D., Becerra-Flora, A., López-Gómez, M.,

- Nieto-Jacobo, M. F., Mendoza-Mendoza, A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2015). Arabidopsis thaliana polyamine content is modified by the interaction with different Trichoderma species. *Plant Physiology And Biochemistry*, *95*, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.003>
- Sandle, T. (2016). Microbiology laboratory techniques. En *Elsevier eBooks* (pp. 63-80). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100022-9.00006-2>
- Santner, A., & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, *459*(7250), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08122>
- Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Genomes of model organisms. En *Elsevier eBooks* (pp. 29-48). <https://doi.org/10.1533/9781908818058.29>
- Singh, A., Sarma, B. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S. (2014). Trichoderma. En *Elsevier eBooks* (pp. 533-542). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59576-8.00040-0>
- Szymanski, D. B. (2013). Arabidopsis thaliana. En *Elsevier eBooks* (pp. 172-175). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.00088-7>
- Takamatsu, S. (2013). Origin and evolution of the powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales). *Mycoscience*, *54*(1), 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.004>
- Talbot, N. J. (2003). On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of Magnaporthe grisea. *Annual Review Of Microbiology*, *57*(1), 177-202. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090957>
- Vargas, W., Mandawe, J., & Kenerley, C. M. (2009). Plant-Derived Sucrose Is a Key Element in the Symbiotic Association between Trichoderma virens and Maize Plants. *Plant Physiology*, *151*(2), 792-808. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141291>
- Wang, L., & Lin, X. (2012). Morphogenesis in Fungal Pathogenicity: Shape, Size, and Surface. *PLOS Pathogens*, *8*(12), e1003027. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003027>
- Wilson, D. &. (2017). Microbial colonization and pathogenesis: the role of morphogenesis in infection and disease pathogenesis. *PLOS Pathogens*, *13*(11).

- Wilson, T. &. (2019). Video Microscopy. In Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. *Academic Press*, 457-498.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2018). Biology in Bloom: A Primer on the Arabidopsis thaliana Model System. *Genetics*, 208(4), 1337-1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>
- Wubben, J. P. (2018). Recent advances in pectin-degrading enzymes from phytopathogenic fungi: impact on plant host interactions. *Fungal Biology and Biotechnology*.
- Wucherpennig, T., Kiep, K., Driouch, H., Wittmann, C., & Krull, R. (2010). Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations. En *Advances in Applied Microbiology* (pp. 89-136). [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(10\)72004-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(10)72004-9)
- Yedidia, I., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. (2000), Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 863-873. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01198-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01198-0)
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. D. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K. M., & Nayak, C. (2015). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *Fems Microbiology Reviews*, 40(2), 182-207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>

## PAGINAS WEB

Adobe (s.f.). Obtenido de <https://helpx.adobe.com/es/photoshop/using/image-stacks.html>

Laboratory info. (s.f.). Obtenido de <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

Sánchez-Guillén, N. A. (23 de octubre de 2021). *Comportamiento de los seres vivos*. Obtenido de <https://comportamientode.com/etologia/simbiosis-tipos/>

## 7. ANEXOS

### Apéndice 1

Para tener la cantidad de  $1 \times 10^6$  conidios/ml, se hará la recolección de conidios usando agua destilada estéril por lo cual, se preparará una dilución 1:100 haciendo uso de 10  $\mu$ l de los conidios recolectados y 990  $\mu$ l de agua destilada estéril. Como paso siguiente se colocará la cantidad de 10  $\mu$ l de esta solución diluida en una cámara de Neubauer para realizar el conteo por duplicado en un microscopio óptico siguiendo los pasos que describe en “Manual Cell Counting With Neubauer Chamber”

Una vez hecho este conteo, se procedió hacer un promedio de los conidios contados en las pruebas y se aplicó este dato en las siguientes formulas.

$$\text{Conidios por } \mu\text{l} = \frac{\text{Conidios contadas en 80 cuadros de } 0.0025 \text{ mm}^2}{\text{Superficie contada (} 0.2 \text{ mm}^2 \text{) x (profundidad de la cámara (} 0.1 \text{ mm) x (dilución)}} \quad 3.$$

$$C1V1=C2V2 \quad 4.$$

La fórmula 3, nos indica la cantidad de conidios que tenemos por  $\mu$ l y con la segunda fórmula establecimos la concentración de conidios que es necesaria depositar en un ml de nuestra suspensión que será en base a un buffer de *Trichoderma* (Sacarosa y MS).

Como se mencionó, este procedimiento fue hecho cada mes para tener conidios frescos, por lo tanto, la cantidad de concentración de conidios que se obtuvo vario en cada una de las pruebas realizadas. Al tener la dilución de conidios frescos contenida en un tubo Eppendorf, se llevó a un cuarto a 4° y solo fue sacado cada vez que fuera necesario realizar las muestras.

### Referencias

*Laboratory info.* (s.f.). Obtenido de <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

## Apéndice 2

### Macro realizado en *ImageJ/FIJI* para la primera parte de segmentación de los stacks.

```
run("Images to Stack", "use");
run("8-bit");
run("Specify...", "width=1646 height=1534 x=464 y=0 slice=1");
run("Duplicate...", "duplicate");
selectWindow("Stack");
close();
selectWindow("Stack-1");
run("Bin...", "x=2 y=2 z=1 bin=Average");

run("Concatenate...", "open image1=Stack-1 image2=Stack-2");
run("Set Scale...", "distance=271 known=1000 unit=um");
run("Duplicate...", "duplicate");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2 scaled stack");
imageCalculator("Subtract create 32-bit stack", "Untitled", "Untitled-1");
selectWindow("Result of Untitled");
selectWindow("Untitled-1");
close();

run("Scale Bar...", "width=1000 height=393 thickness=4 font=14 color=White background=None
location=[Lower Right] horizontal bold overlay");
selectWindow("Untitled");
close();
selectWindow("Result of Untitled");
```

## Apéndice 3

### Programa realizado en *Mathematica* para obtener el análisis estadístico: Distancia, Trayectoria y Velocidad.

```
DATOS11 = Import["D:\\IMAGENES TESIS\\DATOS\\PRUEBAS\\PREUBA2\\
CONTROL\\4 - 5\\REGION 1 - 18\\REGION1 - 18.xlsx"];

□ coordenadas11
= {{55.,14.},{55.,14.},{55.,14.},{55.,17.},{53.,15.},{51.,16.},{49.,17.},{46.,18.},{45.,19.},
{42.,21.},{40.,23.},{36.,25.},{31.,27.},{22.,33.},{19.,34.},{14.,36.},{11.,38.},{7.,39.}}

□ □ Length[coordenadas11]

▣ ListPlot[coordenadas11, Frame → True, FrameLabel → {"X", "Y"}, ImageSize
→ Large, LabelStyle → {GrayLevel[0]}, PlotLabel → "POSICIÓN"]

▣ ListPlot[coordenadas11, Frame → True, FrameLabel → {"X", "Y"}, Joined → True, ImageSize
→ Large, LabelStyle → {GrayLevel[0]}, PlotLabel → "TRAYECTORIA"]

TABLAP11 = Table[EuclideanDistance[coordenadas11[[i]], coordenadas11[[i
+ 1]]], {i, 1, Length[coordenadas11] - 1}]

ListPlot[TABLAP11, Frame → True, FrameLabel → {"X", "Y"}, Joined → True, ImageSize
→ Large, LabelStyle → {GrayLevel[0]}, PlotLabel → "DISTANCIA"]

DISTANCIA11UM = 3.69{TABLAP11}
▣ VELOCIDAD11UM = {3.69{TABLAP11}}/10

Tiempo11 = {1,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,160};
DATOENLACEDISTANCIA11 = Thread[{distancia11, Tiempo11}]
data11 = Transpose[{Tiempo11, distancia11}];

g1 = ListPlot[data11, PlotStyle → PointSize[Medium], Frame → True, FrameLabel
→ {"Tiempo (min)", "Distancia (um)"}, Joined → True, PlotLabel
→ "Distancia Sobre tiempo", PlotLabel → "distancia sobre tiempo", ImageSize
→ Large, LabelStyle → {GrayLevel[0]}, PlotStyle → Hue[0.1]]

dataV11=Transpose[{Tiempo11, velocidad11}];
gV11=ListPlot[dataV11, PlotStyle->PointSize[Medium], Frame-
>True, FrameLabel->{"Tiempo (min)", "Velocidad (um/min)"}, Joined-
```

```
>True,PlotLabel->"Velocidad Sobre tiempo",ImageSize-  
>Large,LabelStyle->{GrayLevel[0]}}
```

```
TOTAL
```

```
▣DISTANCIATOTAL11
```

```
= {DISTANCIA11UM, DISTANCIA21UM, DISTANCIA31UM, DISTANCIA41UM, DISTANCIA51UM,  
DISTANCIA61UM, DISTANCIA71UM}
```

```
Length[distanciapt11]
```

```
distanciaT11 = Total[distanciapt11]
```

```
DESVIACION = StandardDeviation[distanciapt11]
```

```
TIEMPOTOTAL11
```

```
= {Tiempo11, Tiempo21, Tiempo31, Tiempo41, Tiempo51, Tiempo61, Tiempo71}
```

```
▣dataT11 = Transpose[{tiempototal11, distanciapt11}]; ▣gT11 = ListPlot[dataT11, PlotStyle  
→ PointSize[Medium], Frame → True, FrameLabel  
→ {"Tiempo (min)", "Distancia (um)"}, Joined → True, PlotLabel  
→ "Distancia Sobre tiempo", PlotLabel → "distancia sobre tiempo", ImageSize  
→ Large, LabelStyle → {GrayLevel[0]}, PlotStyle → Hue[0.1], PlotRange → All]
```

```
▣VELOCIDADTOTAL11
```

```
= {VELOCIDAD11UM, VELOCIDAD21UM, VELOCIDAD31UM, VELOCIDAD41UM, VELOCIDAD51UM, VELOCIDAD61UM, VELOCIDAD71UM}
```

```
velocidadt11 = Total[velocidadpt11]
```

```
dataVT11=Transpose[{tiempototal11, velocidadpt11}];
```

```
gVT11=ListPlot[dataVT11,PlotStyle->PointSize[Medium],Frame-  
>True,FrameLabel->{"Tiempo (min)", "Velocidad (um/min)"},Joined-  
>True,PlotLabel->"Velocidad Sobre tiempo",PlotLabel->"distancia  
sobre tiempo",ImageSize->Large,LabelStyle-  
>{GrayLevel[0]},PlotRange->All]
```

```
PROMEDIO1 = Mean[velocidadpt11]
```

```
DESVIACION1 = StandardDeviation[velocidadpt11]
```

