



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma spp.* contra
tres hongos fitopatógenos

(*Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia frutícola* y *Botrytis cinérea*).

TESIS

Que para obtener el grado de

Licenciatura en Ingeniería en Agronomía para la Producción Sustentable

PRESENTA:

MARTHA AZUCENA ZUÑIGA HERNÁNDEZ

DIRECTOR:

Dr. ALFREDO MADARIAGA NAVARRETE

CO DIRECTORA

DRA. JUDITH PRIETO MÉNDEZ

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO. SEPTIEMBRE DE 2020.



Fecha: 22 de octubre de 2020
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

M. en C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH.
P R E S E N T E

Con base en lo establecido en artículo 40, Capítulo I del Título Cuarto del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura en Agronomía para la Producción Sustentable **Martha Azucena Zúñiga Hernández**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis titulado **"EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE TRICHODERMA SPP. CONTRA TRES HONGOS FITOPATÓGENOS (SCLEROTINIA SCLEROTIUM, MONILINIA FRUTÍCOLA Y BOTRYTIS CINÉREA)"** ha decidido autorizar la impresión del mismo, después de revisarlo en reunión de sinodales, hechas las correcciones acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes de Jurado:

PRESIDENTE: Dra. Eliazar Aquino Torres

SECRETARIO Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

PRIMER VOCAL: Dra. Judith Prieto Méndez

SUPLENTE: Dra. Nallely Trejo González

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE

Dr. Jaime Pacheco Trejo
Coordinador
Agronomía para la Producción Sustentable



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa,
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono: +52 (771) 71 72000 ext 2461
migueze@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

“El éxito es ir de derrota en derrota, de fracaso en fracaso, de caída en caída, sin perder el entusiasmo y si en algún momento tienes que caminar atravesando una tormenta, si en algún momento tienes que caminar por el infierno, no te detengas y sólo sigue avanzando”

Winston Churchill

Dedicatoria

A Dios

Por darme la oportunidad de vivir, por su invaluable compañía en cada paso de mi vida. Por haberme dado todo lo que me rodea para encontrar la felicidad y su amor incondicional.

A mis padres

Por haberme dado la vida, por creer siempre en mí, por impulsarme desde pequeña a alcanzar mis sueños, porque a pesar de las pruebas difíciles que les puso la vida salieron adelante por mi hermana y por mí, para darnos justamente esto, porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar una de mis más grandes metas, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir y por haber hecho de mí, lo que ahora soy.

A mis sobrinos

Porque ustedes son mi motor y mi fuerza. Por ustedes voy a salir adelante para apoyarlos cada día de mi vida.

A mi hermana Maru

Porque siempre creíste en mí, donde quiera que estés, mi ángel, este logro es para ti.

Esto es un gran esfuerzo mío, para ustedes y para mí misma.

Agradecimientos

Al término de esta etapa de mi vida quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo, confianza y comprensión, me alentaron a lograr ésta realidad.

A mi director de tesis, Dr. Alfredo Madariaga Navarrete, por su confianza depositada en mí y los conocimientos adquiridos. Por el asesoramiento, dirección, paciencia, sabiduría y valioso tiempo dedicado a este trabajo, mi admiración, respeto y agradecimiento infinito.

A mi co directora de tesis, Dra. Judith Prieto Méndez que contribuyó no sólo a la revisión y orientación de este trabajo, sino también a mi formación profesional personal, gracias por su constante apoyo durante la carrera y por haber creído en mí.

A los integrantes del comité académico por compartir su amplia experiencia y amables orientaciones para el presente trabajo.

Un reconocimiento personal a mis profesores de la carrera quienes con sus conocimientos y aportaciones día a día en el aula inspiran a sus alumnos a ser mejores profesionistas y personas.

Finalmente a mi alma máter, la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por el apoyo otorgado para la realización y cumplimiento de las metas de cada uno de sus estudiantes, desde su ingreso hasta la finalización.

CONTENIDO

RESUMEN	9
Palabras clave: Control biológico, <i>Trichoderma</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>B. cinérea</i> , Tukey	9
ABSTRACT	9
Key Words:	9
CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO 2.-ANTECEDENTES.....	13
2.1. Biología de <i>Trichoderma</i>	14
2.1.2. Fisiología	14
2.1.3. Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de <i>Trichoderma</i>	15
2.1.3.1. Temperatura	15
2.1.3.2. Humedad	15
2.1.3.3. pH	16
2.1.3.4. Oxígeno	16
2.1.4. Mecanismos de Biocontrol	16
2.1.4.1. Micoparasitismo.....	16
2.1.4.2. Competencia	17
2.1.4.3. Antibiosis.....	17
2.1.4.4. Crecimiento quimiotrófico	18
2.1.4.5. Colonización de nichos ecológicos	18
2.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
2.2.1. Ciclo de infección y epidemiología.....	18
2.2.2. Taxonomía.....	19
2.2.3. Características generales	19
2.3. <i>Monilinia fructícola</i>	20
2.3.1. Ciclo de infección y epidemiología.....	20
2.3.2. Taxonomía.....	21
2.3.3. Características generales	21
2.4. <i>Botrytis cinerea</i>	23
2.4.1. Ciclo de la infección y epidemiología.....	23
2.4.2. Taxonomía.....	24
2.4.3. Características generales	24

CAPÍTULO 3.- JUSTIFICACIÓN	26
CAPÍTULO 4.- OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Específicos	30
CAPÍTULO 5.- MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1. Diagrama de flujo	32
5.1.2. Obtención del inóculo de <i>Trichoderma spp</i>	33
5.1.3. Obtención del inóculo de <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Monilinia frutícola</i> y <i>Botrytis cinérea</i> ...	33
5.1.4. Pruebas de efectividad biológica	33
5.1.5. Diseño experimental	34
CAPÍTULO 6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1. <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	36
6.2. <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Monilinia frutícola</i>	39
6.3. <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	42
CAPÍTULO 7.- CONCLUSIÓN.....	45
CAPÍTULO 8.- LITERATURA CITADA	47
Referencias.....	48
CAPÍTULO 9.- ANEXOS.....	50
9.1 Análisis estadístico: <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	51
9.2 Análisis estadístico: <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Monilinia frutícola</i>	52
9.3 Análisis estadístico: <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Botrytis cinérea</i>	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Crecimiento en milímetros a partir de la siembra del testigo de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>S. sclerotiorum</i> , así como la media de crecimiento en las pruebas duales.....	36
Tabla 2. Crecimiento en milímetros a partir de la siembra del testigo de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Monilinia frutícola</i> , así como la media de crecimiento en las pruebas duales.	39
Tabla 3. Crecimiento en milímetros a partir de la siembra del testigo de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Botrytis cinerea</i> , así como la media de crecimiento en las pruebas duales.....	42

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma spp.</i> (CENSA,2009).	15
Ilustración 2. Ciclo vital de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y epidemiología en <i>Brassica spp.</i> (Universidad Santiago de Compostela,2017)	19

Ilustración 3. Desarrollo y síntomas de las enfermedades de hortalizas y flores producidas por el hongo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Agrios,G, 1991).....	20
Ilustración 4. Fases sexuales y asexuales de <i>Monilinia spp.</i> dentro del ciclo de infección de podredumbre morena. (INIBIO-UNAM, 2015).	22
Ilustración 5. Ciclo patológico de la pudrición café de los frutos de hueso producida por <i>Monilinia frutícola</i> (Agrios.G, 1991).....	23
Ilustración 6. Desarrollo de las enfermedades producidas por el moho gris <i>Botrytis</i> (Agrios.G, 1991).	25
Ilustración 7.Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> y <i>S. sclerotiorum</i> a las 72 horas.	37
Ilustración 8. Crecimiento de las repeticiones de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>S.sclerotiorum</i> a las 72 horas	37
Ilustración 9. Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> y <i>Monilinia frutícola</i> a las 72 horas.	41
Ilustración 10. Crecimiento de las repeticiones de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>M. frutícola</i> a las 72 horas.....	41
Ilustración 11. Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> y <i>Botrytis cinerea</i> a las 72 horas.....	44

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento en milímetros del control de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la siembra.....	38
Gráfica 2. Media de crecimiento en milímetros de las pruebas duales de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la siembra.....	38
Gráfica 3.Crecimiento en milímetros del control de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Monilinia frutícola</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la siembra.....	40
Gráfica 4. Media de crecimiento en milímetros de las pruebas duales de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Monilinia frutícola</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la siembra.....	40
Gráfica 5. Crecimiento en milímetros del control de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Botrytis cinerea</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la siembra.....	43
Gráfica 6. Media de crecimiento en milímetros de las pruebas duales de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Botrytis cinerea</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la siembra.....	43

RESUMEN

En el presente estudio se realizó un análisis de la efectividad de *Trichoderma spp.* como agente de control biológico sobre los hongos fitopatógenos, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia frutícola* y *Botrytis cinérea*. Las pruebas de antagonismo se realizaron conforme a la técnica de pruebas duales de inhibición del crecimiento radial. Los resultados muestran que la cepa de *Trichoderma spp.* Presentó actividad antagónica para a *S. sclerotiorum* y *Botrytis cinérea*. La cepa de *Trichoderma spp.* resultó ser antagónica con respecto a *S. sclerotiorum* y *Botrytis cinérea*.

Palabras clave: Control biológico, *Trichoderma*, *S. sclerotiorum*, *B. cinérea*, Tukey.

ABSTRACT

In the present study an analysis was made of the effectiveness of *Trichoderma spp.* As biological control agent on Phytopathogenic fungi, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia fruticola* and *Botrytis cinerea*. Antagonism tests were performed according to the technique of dual test of radial growth inhibition. The results show that the strain of *Trichoderma spp.* presents antagonistic activity for *S. Sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. The strain of *Trichoderma spp.* proves to be antagonistic with respect to *S. Sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.

Key Words: Biological control, *Trichoderma*, *S. sclerotiorum*, *B. cinérea*, Tukey.

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha acentuado el discernimiento sobre la importancia de preservar el medio ambiente y los recursos naturales para satisfacer las necesidades tanto de las generaciones actuales como de las futuras. De tal forma que los objetivos actuales de la producción agrícola son brindar a los consumidores productos inocuos producidos mediante métodos conservacionistas.

Ante la situación planteada, resulta evidente la exigencia de la población mundial, por ello, los agricultores deben implementar complejos sistemas de manejo integrado de las enfermedades, en los que se pretende reducir el uso de fungicidas, recurriendo a prácticas y productos de bajo impacto ambiental, respetando la salud de trabajadores y consumidores (Universidad de la Republica, 2016).

En este propósito, el control biológico de las enfermedades en plantas resulta una herramienta indispensable al momento de diseñar sistemas de manejo integrado.

Baker y Cook (1974) definen el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero, o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas.

Diversas especies del género *Trichoderma* han sido reportadas como agentes potenciales de control biológico de hongos fitopatógenos. El uso de estas para el control de las enfermedades de las plantas es una alternativa muy prometedora al uso de compuestos químicos y representan bajo riesgo de impactos adversos en la salud ambiental y humana. (UFLA, 2015).

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas muestran diferentes mecanismos de acción en sus interacciones antagónicas con patógenos fúngicos. Estos incluyen antibiosis, a través de la producción de una variedad de compuestos con actividad antibiótica, micoparasitismo o hiperparasitismo, competencia por nutrientes y la inducción de resistencia sistémica a patógenos en la planta (Vinale, 2006). De igual manera actúan como hiperparásitos competitivos, que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa, (Ezziyyani et al., citados por Chávez, 2006).

La capacidad de las cepas de *Trichoderma* como agentes de biocontrol se debe a su elevada facultad reproductiva, habilidad de sobrevivir bajo condiciones desfavorables, eficiencia en la

utilización de nutrientes, potencial de modificar la rizosfera, fuerte agresividad frente a hongos fitopatógenos, y eminente eficiencia en la promoción del crecimiento de las plantas y estimulación de los mecanismos de defensa de las mismas (Santamarina, 2005).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el comportamiento de *Trichoderma* como control biológico sobre los fiopatógenos *Monilinia*, *Sclerotinia* y *Botrytis*, analizando su actividad antagónica.

CAPÍTULO 2.-ANTECEDENTES

2.1. Biología de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794. Posteriormente, Rifai hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que se utiliza hasta el presente, a pesar de las dificultades que se presentan para la identificación de especies por este método, debido a la cercanía morfológica y la evolución de las mismas. Son hongos saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. La acción de *Trichoderma* como micoparásito natural se demostró por Weindling en 1932, y su utilización en experimentos de control biológico se implementó a partir de 1970, cuando se incrementaron los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales (CENSA C. N., 2013).

El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (CENSA, 2009)

Trichoderma se ubica taxonómicamente según Villegas en: Reino, Fungi; División, Mycota; Subdivisión, Eumycota; Clase, Hyphomycetes; Orden, Moniliales; Familia, Moniliaceae; Género *Trichoderma*.

2.1.2. Fisiología

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de

sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo. No obstante, las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30°C). Debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (CENSA, 2009).

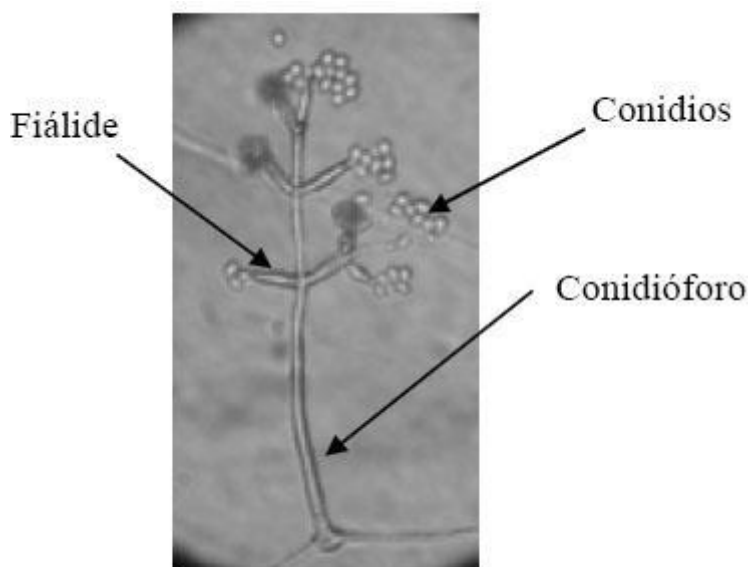


Ilustración 1. Conidios y conidióforos de *Trichoderma spp.* (CENSA, 2009).

2.1.3. Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma*

2.1.3.1. Temperatura

Dentro del amplio rango de temperaturas a las cuales las especies de *Trichoderma* se han adaptado, se puede considerar que la mayoría de estas presentan como óptimo de temperatura el intervalo entre los 25 a 30° C. Especies como *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma saturnisporum*, parecen tener el óptimo de temperatura más alto (entre 38 y 44° C); *Trichoderma viridae* y *Trichoderma polysporum* con el rango óptimo de temperatura más fresco (entre los 20 a 25° C); y en términos medios, especies como *Trichoderma harzianum* con un rango de temperatura cálido que oscila entre los 22 a 33° C, con una temperatura óptima de 27° C (Universidad de la Republica, 2016).

2.1.3.2. Humedad

La mayoría de las especies de *Trichoderma* pasa de un estado latente a uno activo, a medida que aumenta el contenido de humedad del suelo, desarrollándose óptimamente hasta un 60% de la capacidad de campo del mismo (Donati, 2011).

2.1.3.3. pH

Las diferentes cepas tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH que va de 2 a 6, presentando un crecimiento óptimo entre 4 y 6,5, y solo unas pocas especies parecen tolerar un pH menor a 3, según Kubicek y Harman.

Según otros autores, Danielson y Davey, citados por Cabrera y Tejera (2002) *Trichoderma harzianum*, presenta un rango óptimo de crecimiento a pH de 3,7 a 4,7.

2.1.3.4. Oxígeno

Dos componentes del aire son esenciales para los hongos: el oxígeno y el dióxido de carbono. *Trichoderma* es un hongo netamente aerobio obligado, si bien se encuentran algunas especies de *Trichoderma*, como anaerobios facultativos, las cuales tienen la habilidad para crecer en hábitats como suelos profundos donde el oxígeno es relativamente insuficiente (Universidad de la República, 2016).

2.1.4. Mecanismos de Biocontrol

2.1.4.1. Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. Las cepas de *Trichoderma* pueden parasitar un amplio rango de hongos fitopatógenos, esta capacidad difiere de una a otra cepa (HARMAN et al., 2004).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotróficamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (CENSA, 2009).

Para el estudio de dicho proceso se han determinado ciertas etapas que abarcan desde el crecimiento ante un estímulo químico, el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el hospedante, la adhesión y la actividad enzimática.

2.1.4.1.1. Reconocimiento

El reconocimiento se realiza a través de interacciones del tipo lecitinas-carbohidratos, entre las paredes de ambos organismos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Infante et al., citados por Olivera Costa y

Rodríguez, 2014). El reconocimiento entre cepas de *Trichoderma* y especies de hongos fitopatógenos son efectivas sólo contra patógenos específicos, por lo que el reconocimiento molecular es el evento esencial que precede al proceso antagonista (Universidad de la Republica, 2016).

2.1.4.1.2. Adhesión y enrollamiento

Una vez que la respuesta de reconocimiento es positiva, el micoparásito se une al hospedero. En el género *Trichoderma* las hifas del micoparásito se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios y se enrollan alrededor de estas (Universidad de la Republica, 2016).

2.1.4.1.3. Actividad lítica

Al finalizar el proceso de micoparasitismo, se genera una producción de enzimas líticas extracelulares, especialmente quitinasas, glucanasas y proteasas, capaces de degradar las paredes del hongo hospedero, permitiendo así la absorción de nutrientes del interior del hongo fitopatógeno, finalmente al perder el contenido citoplasmático de la célula del hospedante disminuye la actividad patogénica del mismo.

2.1.4.2. Competencia

Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un requerimiento (espacio y/o nutrientes), por lo que competencia puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás.

La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentra, la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en «bloquear el paso» al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (CENSA C. N., 2013).

La competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual), se ejerce principalmente por espacio y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros.

2.1.4.3. Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser

el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistente al antibiótico.

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben a otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas antibióticos.

La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos. Estos resultados ejemplifican la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo (CENSA C. N., 2013).

2.1.4.4. Crecimiento quimiotrófico

El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico. En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.

2.1.4.5. Colonización de nichos ecológicos

La colonización es el principal modo de acción. En él interviene la considerable plasticidad ecológica de *Trichoderma spp.* y la velocidad de crecimiento y desarrollo, los cuales le proporcionan la habilidad de desplazar al patógeno suprimiendo o no expresándose la enfermedad. Este mecanismo se considera esencial para la prevención de enfermedades, pues la zona colonizada no podrá ser ocupada por ningún patógeno (Universidad de la Republica, 2016).

2.2. *Sclerotinia sclerotiorum*

2.2.1. Ciclo de infección y epidemiología

El hongo, *S. sclerotiorum*, produce enfermedades en más de 360 especies diferentes plantas hospederas. Hay por lo menos 61 diferentes nombres comunes que se han utilizado para las enfermedades de *Sclerotinia sclerotiorum* diferentes. Algunos nombres comunes de las enfermedades de los cultivos importantes son: moho blanco (frijol), pudrición acuosa suave (col), gota (lechuga), la pudrición del tallo (papa y tomate), (IFAS, 2009). El hongo crea un algodonoso, característico micelio blanco que aparece en la superficie de los tejidos infectados. Sobre o dentro del micelio blanco aparecen en negro, y envuelto las estructuras de forma irregular (esclerocios), que son alrededor de 3 a 10 mm de ancho. Cuando está activo, esclerocios puedan presentar una

masa blanca de hongos (micelio) o pequeños (5-15 mm de diámetro), de color canela en forma de cuerpos fructíferos como el golf (apotecio) (Guzmán, 2017).

2.2.2. Taxonomía

Reino: Fungi Filum; Ascomycota Clase: Ascomycetes; Orden: Helioteliales; Familia: Sclerotiniaceae; Género: Sclerotinia; Especie: *S. sclerotiorum*

2.2.3. Características generales

Su amplio rango de huéspedes ha hecho de este hongo uno de los menos específicos y más invasivos entre los patógenos de plantas. Entre un 10 y un 80% de las pérdidas de rendimiento anuales entre cultivos oleaginosos, forrajeros y hortícolas de brásicas son causados por *S. sclerotiorum*. Dependiendo del estadio de crecimiento o de los órganos que han sido afectados, la enfermedad puede manifestarse como podredumbre del tallo, podredumbre acuosa o podredumbre de la cabeza, esta última en repollo (*B. oleracea*).

La infección ocurre en la parte aérea y basal del tallo del huésped y los síntomas iniciales aparecen como manchas acuosas en hojas o tallos. Más tarde las lesiones de las hojas se extienden al peciolo e infectan el tallo. Las lesiones en tallos aparecen sobre la parte encima de la superficie del suelo y son desde gris claro a blanco. Según la enfermedad avanza se dispersa a las ramas superiores incluyendo las vainas. Finalmente, el tallo se rompe en el punto de infección, dando lugar a la marchitez y muerte de la planta. Se producen esclerocios sobre o dentro de los tallos agujereados (USC, 2017).

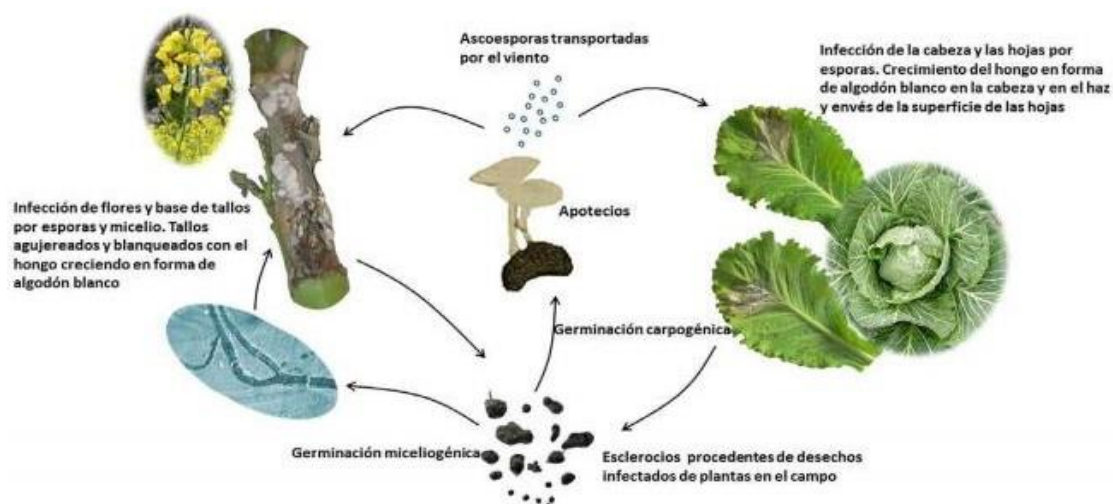


Ilustración 2. Ciclo vital de *Sclerotinia sclerotiorum* y epidemiología en *Brassica* spp. (Universidad Santiago de Compostela, 2017)

El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* y algunas especies emparentadas viven en forma de micelio en plantas vivas o muertas y en forma de esclerocios sobre o en el interior de tejidos infectados,

o en forma de esclerocios que han caído en el suelo. En la primavera o a principios del verano, los esclerocios germinan y producen de uno a varios tallos delgados que terminan en un pequeño apotecio que tiene un diámetro de 5 a 15 mm y tiene forma de copa o de disco, y en el cual se forman las aseas y las ascosporas. Estos apotecios liberan numerosas ascosporas al aire al cabo de 2 a 3 semanas. Las ascosporas son diseminadas y en caso de que se depositen sobre órganos vegetales senescentes, como las flores muy maduras (las cuales proporcionan una fuente de alimento fácilmente aprovechable), germinan y producen infección. En algunas especies de *Sclerotinia*, los esclerocios producen infección al formar filamentos miceliales, los cuales atacan e infectan directamente a los tallos de plantas jóvenes. Cuando hay suficiente humedad, este último método de infección es quizá más común que el que utiliza ascosporas, aunque cabe decir que en *S. sclerotiorum* la mayoría de las infecciones se inician por estas últimas (Agris, 1995).

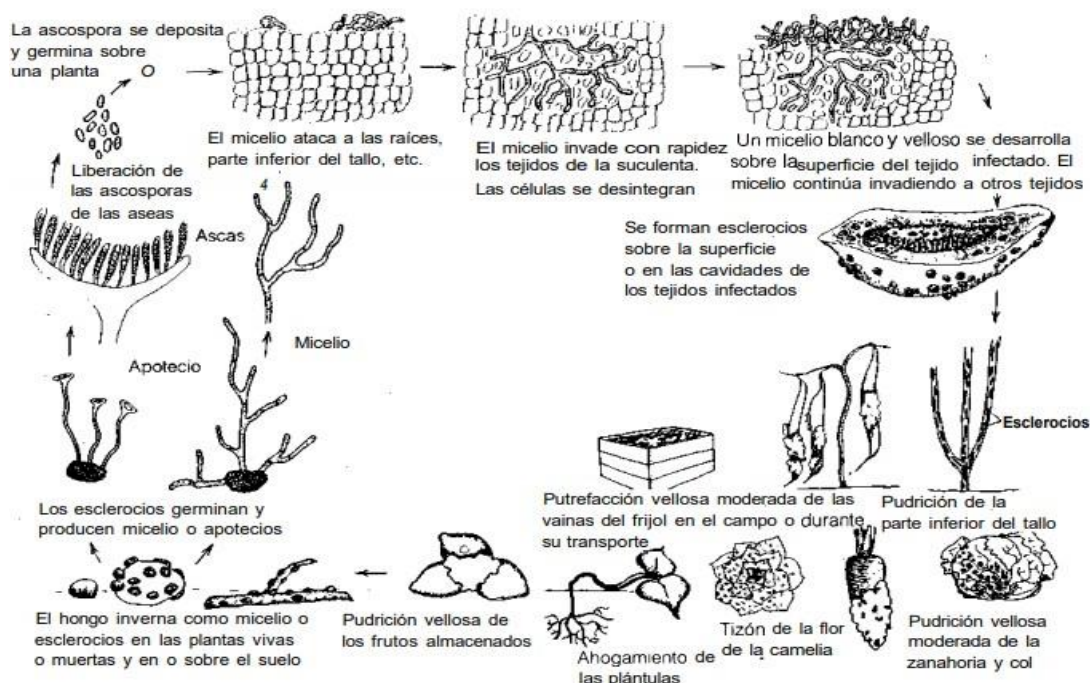


Ilustración 3. Desarrollo y síntomas de las enfermedades de hortalizas y flores producidas por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Agris, G, 1991)

2.3. *Monilinia fructicola*

2.3.1. Ciclo de infección y epidemiología

La Podredumbre morena o parda, causada por *Monilinia spp.*, es una de las enfermedades más importantes que afecta a los frutales de hueso, como drupas y pomos, los cuales incluyen a duraznos, cerezos, ciruelas y almendros, los mismos que poseen un mesocarpio carnoso y un endocarpio endurecido (Gell, et.al, 2007). Esta enfermedad es más severa en frutales de la familia Rosaceae a la cual pertenece *Prunus persica* (Holst, et.al., 1997). Epidemiológicamente *M. laxa* afecta preferentemente a ramas y flores, *M. fructigena* causa daño principalmente en frutos y *M.*

fructicola afecta con la misma incidencia a ramas, flores y frutos (Fulton, et al. 1999). *Monilinia spp.* depende específicamente de una elevada humedad en el ambiente para que las esporas puedan germinar. La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 20-25°C (Agrios, 1995). El ciclo de infección en las tres especies de *Monilinia* es el mismo. Las primeras lesiones típicas de la infección se presentan como manchas cafés en la superficie de inflorescencias y/o frutos, los cuales se tornan de color grisáceo, ya que los conidios (fase asexual) del hongo recubren su superficie (Fulton, et. al, 1999). La podredumbre morena, conocida así por atizonar la fruta, puede llegar a causar una condición, que en el durazno se ha denominado “momia” o fruto momificado (Agrios, 1995), el mismo que constituye el principal reservorio de esporas del hongo y puede adherirse a las ramas, atizonándolas. Las esporas son dispersadas por agentes como el viento, la lluvia e insectos (Gell, et al. 2007).

2.3.2. Taxonomía

Monilinia spp. está clasificada dentro de los hongos superiores. Pertenece a la subdivisión de los Ascomycetos. Sus ascas o sacos contienen grupos de ocho esporas sexuales denominadas ascosporas. La fase asexual del hongo se denomina Monilia y se produce cuando cada hifa termina en conidios, los cuales son las esporas asexuales externas (Agrios, 1995). Las ascas que se forman en la superficie tienen apariencia de copa por lo que están dentro de la clase de los Discomycetes, pertenece al orden Helotiales y a la familia Sclerotiniaceae. A nivel mundial se han reportado tres especies de *Monilinia* causantes de la podredumbre morena: *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola* (Fulton, 1999).

2.3.3. Características generales

La podredumbre morena o momificado de los frutos producida por *Monilinia spp.* ocasiona importantes pérdidas de producción en especies de rosáceas (*Prunus spp.*, manzano [*Pyrus malus* L.] y peral [*Pyrus communis* L.]).

Monilinia fructicola no se distingue de otras podredumbres pardas fúngicas (como *Monilinia laxa* o *Monilinia fructigena*), salvo mediante examen de laboratorio. Sobre todo se produce en frutos de melocotonero y nectarino. Los daños se manifiestan en podredumbres pardas (negruzcas en manzanas), seguidas de aparición de pústulas conidiales grises. En tiempo seco, los frutos se marchitan, formando “momias” arrugadas. Las hojas y flores se vuelven marrones y ofrecen una apariencia marchita. Las infecciones en tallo producen zonas marrones que colapsan formando chancros, frecuentemente con aparición de gomas. Las conidiosporas aparecen en los tejidos infectados bajo condiciones de alta humedad (MARM).

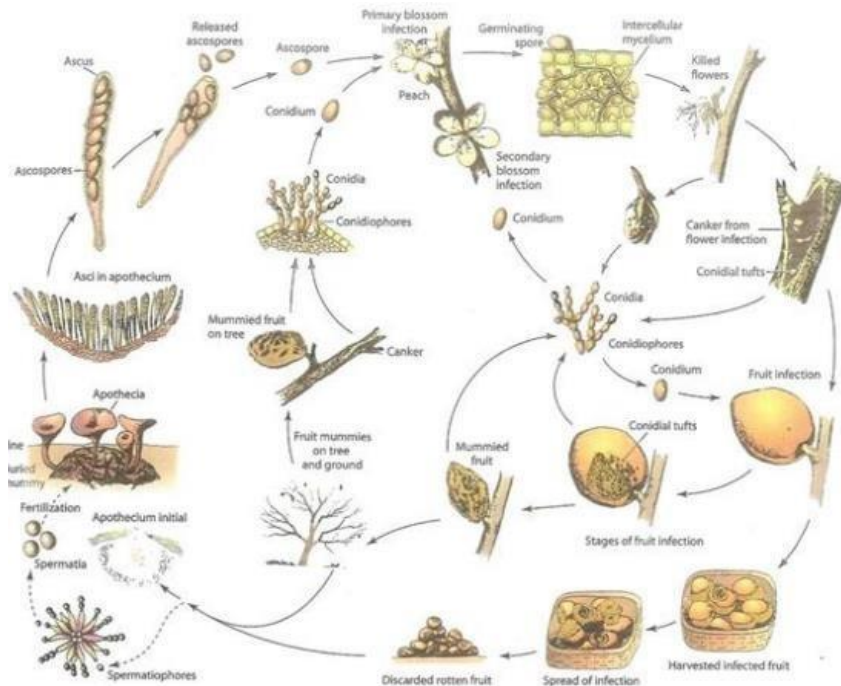


Ilustración 4. Fases sexuales y asexuales de *Monilinia spp.* dentro del ciclo de infección de podredumbre morena. (INIBIO-UNAM, 2015).

La susceptibilidad de los frutos a la infección aumenta con la maduración de éstos. Por lo común, los conidios penetran en los frutos a través de pinchaduras por ramas o bien a través de heridas producidas por los insectos, el granizo, etc., pero en algunos casos dicha penetración se efectúa a través de las estomas o directamente a través de la cutícula de la planta. El hongo crece intercelularmente al principio y mediante la secreción de enzimas produce la maceración y el empardecimiento de los tejidos que ha infectado. El hongo crece con gran rapidez en los frutos. Conforme avanza en el fruto, produce también ramilletes conidiales en la zona ya podrida, lo cual facilita que los conidios puedan ser llevados a grandes distancias e infecten a otros frutos. Un fruto completo puede descomponerse totalmente al cabo de algunos días y puede ocurrir que se mantenga colgado al árbol o que caiga al suelo. Por lo común, los frutos que caen al suelo poco después de haber sido infectados se desintegran bajo la acción de hongos saprofitos y de bacterias. Los frutos que se mantienen suspendidos en el árbol rápidamente pierden humedad y se arrugan y al final de la estación de crecimiento se transforman en momia seca y deforme que presenta una superficie corrugada. La cascara del fruto sigue siendo la cubierta protectora y debajo de ella los restos de las células del fruto se mantienen en su sitio debido a, los filamentos miceliales del hongo que se encuentran estrechamente entretejidos y forman una corteza dura. Una vez que el fruto se ha momificado, puede caer al suelo, pero no es afectado por los microorganismos del suelo y puede persistir ahí durante dos o más años. La infección de los frutos se produce también después de cosecharlos, almacenarlos y transportarlos. Los frutos infectados continúan pudriéndose después de haber sido cosechados y el micelio atacará directamente a los frutos sanos

que entren en contacto con ellos. Los frutos sanos también son atacados por los conidios en cualquier tiempo comprendido entre su cosecha y consumo por el hombre.

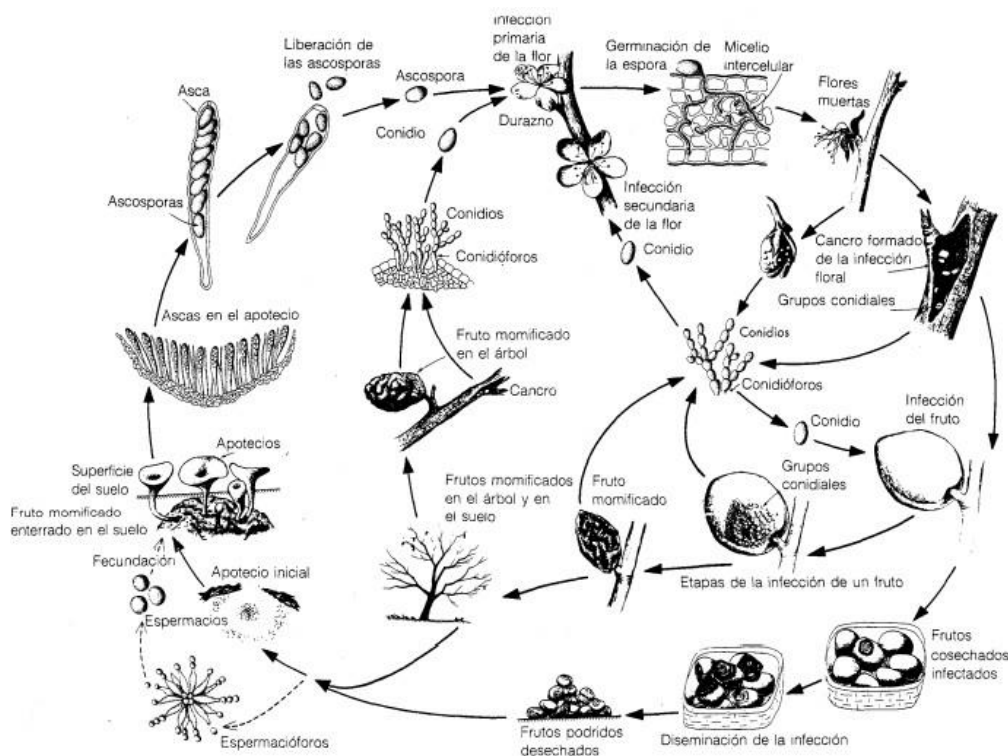


Ilustración 5. Ciclo patológico de la pudrición café de los frutos de hueso producida por *Monilinia fructicola* (Agris.G, 1991)

2.4. *Botrytis cinerea*

2.4.1. Ciclo de la infección y epidemiología

Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire. Una vez que la espора ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias fases: 1) la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped; 2) su penetración en el tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, bien directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas); 3) el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta; 4) en muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en las áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias; 5) transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer

las barreras defensivas de la planta e inicia su disseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Arranz, 2000).

2.4.2. Taxonomía

Fase sexual Phylum: Ascomycota; Clase: Discomycetes; Orden: Heliales Familia: Sclerotiniaceae; Género: Botryotinia (*Botrytis anamórfica*); Especie: *Botryotinia fuckeliana* Whetzel.

El patógeno *Botrytis spp.* Produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas (Romero, 1993). El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son disseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro (Rómulo García Velasco).

2.4.3. Características generales

Las enfermedades causadas por *Botrytis spp.* quizá sean las enfermedades más comunes y más ampliamente distribuidas de hortalizas, plantas de ornato y frutales, cabe mencionar que son las más comunes de las plantas cultivadas en invernaderos.

Botrytis produce principalmente el tizón de las inflorescencias, la pudrición de los frutos, el ahogamiento de las plántulas, así como canchrosis o pudriciones del tallo, manchas foliares y pudriciones de la raíz, tubérculos, cormos y bulbos de muchas hortalizas, flores, pequeños frutos y otros árboles frutales (Agrios, 1995).

Éste patógeno inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición.

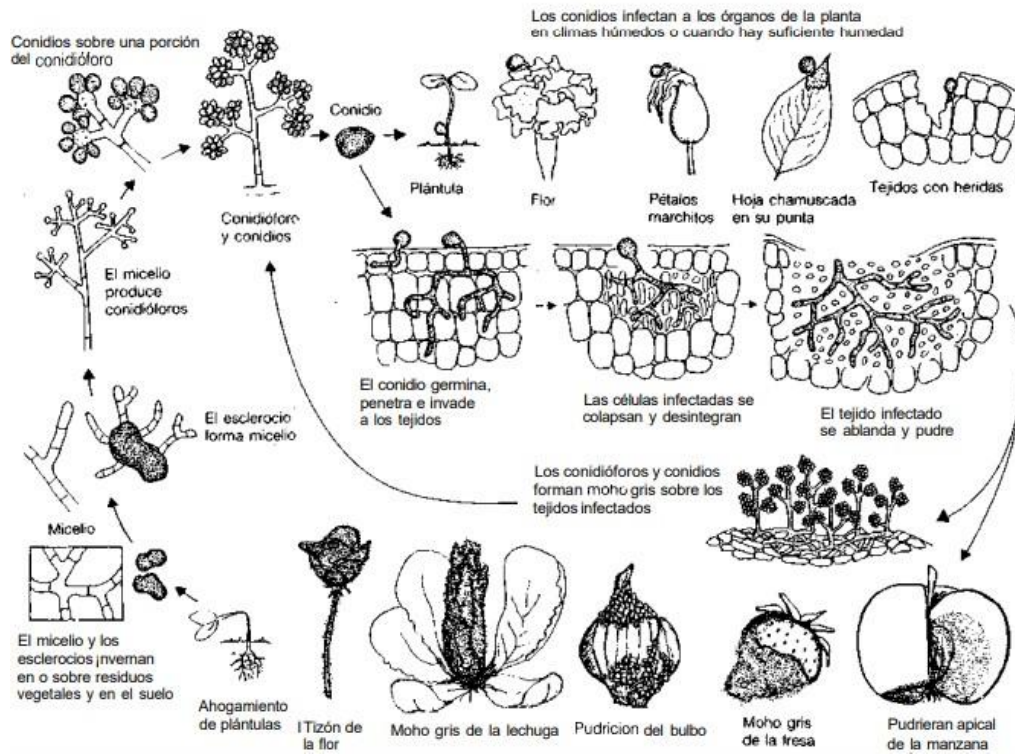


Ilustración 6. Desarrollo de las enfermedades producidas por el moho gris *Botrytis* (Agrios, G, 1991).

Al parecer este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado.

Las esporas que han germinado rara a la vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero penetran en los tejidos de la planta a través de las heridas o después de que se han desarrollado durante cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de las flores senescentes, follaje moribundo de plantas, etc (Agrios, 1995).

Cabe mencionar que el patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre los 0- 10° C.

CAPÍTULO 3.- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el uso de plaguicidas resulta necesario para controlar e incrementar los rendimientos agrícolas, pero en los últimos años el uso abusivo de estos productos ha desencadenado una serie de alteraciones medioambientales, las cuales han influido en el deterioro del suelo, la pérdida de biodiversidad, y el aumento de las enfermedades que atacan a los cultivos debido al desarrollo de resistencia a los fungicidas.

Además, es evidente la preocupación de los consumidores por los efectos directos e indirectos que los plaguicidas tienen sobre la calidad de los alimentos, la salud y el medio natural.

Desde las épocas tempranas del surgimiento y desarrollo del hombre, se tuvo la necesidad de combatir las plagas que afectaban sus cultivos y productos, con el uso de sustancias capaces de eliminarlos. En la llamada “*era de los productos naturales*” (antes de nuestra era hasta mediados del siglo XIX), se tienen evidencias en documentos escritos por Homero, del uso del azufre como sustancia “purificadora” para eliminar los hongos; el rey de Persia, Jerjes, usó las flores de piretro como insecticida y los chinos utilizaron los arsenitos para el control de roedores y otras plagas, alrededor del primer milenio después de nuestra era.

A lo largo del tiempo se sintetizaron otras sustancias potentes como los plaguicidas organoclorados (poseen átomos de carbono, cloro, hidrógeno, en ocasiones oxígeno y son muy estables en el ambiente) y los organofosforados (derivados del ácido fosfórico), que son los más tóxicos y menos estables en el ambiente en relación a los organoclorados (INHEM, 2014).

Los plaguicidas entran en contacto con el hombre a través de todas las vías de exposición posibles: respiratoria, digestiva y dérmica, pues estos pueden encontrarse en función de sus características, en el aire inhalado, en el agua y en los alimentos, entre otros medios ambientales.

Los plaguicidas tienen efectos agudos y crónicos en la salud; se entiende por agudos aquellas intoxicaciones vinculadas a una exposición de corto tiempo con efectos sistémicos o localizados, y por crónicos aquellas manifestaciones o patologías vinculadas a la exposición a bajas dosis por largo tiempo.

Un plaguicida dado tendrá un efecto negativo sobre la salud humana cuando el grado de exposición supere los niveles considerados seguros. Puede darse una *exposición directa* a plaguicidas (en el caso de los trabajadores de la industria que fabrican plaguicidas y los operarios, en particular, agricultores, que los aplican), o una *exposición indirecta* (en el caso de consumidores, residentes y transeúntes), en particular durante o después de la aplicación de plaguicidas en agricultura, jardinería o terrenos deportivos, o por el mantenimiento de edificios públicos, la lucha contra las malas hierbas en los bordes de carreteras y vías férreas, y otras actividades (INHEM, 2014).

La División de Población de las Naciones Unidas ha calculado que, en 2050, la población mundial será de 9700 millones de personas, un 30% más que en 2017, y que la gran mayoría de este crecimiento se producirá en los países en desarrollo.

De acuerdo con las previsiones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el 80% del aumento de la producción de alimentos necesario para hacer frente a este crecimiento demográfico en los países en desarrollo se obtendrá gracias al mayor rendimiento de los cultivos y al aumento de las cosechas anuales en el mismo suelo. Por tanto, solo el 20% del crecimiento de la producción de alimentos provendrá de la expansión de las tierras de cultivo.

Los plaguicidas se continuarán utilizando porque permiten evitar pérdidas importantes de las cosechas. Sin embargo, sus efectos sobre las personas y el medio ambiente son una preocupación permanente (OMS, 2018).

Por ello, se están investigando nuevos sistemas más ecológicos para la protección de los cultivos. La concepción actual del control de las enfermedades se basa en la integración compatible, racional y sostenible de todos los sistemas de control disponibles (control cultural, control químico y control biológico). Estos sistemas de control persiguen reducir de modo importante la dependencia de los plaguicidas químicos, y para ello se apoya en la utilización de los métodos de control biológico y en los mecanismos de defensa de las plantas.

Dado el interés creciente en encontrar alternativas de control para fitopatógenos, en las últimas décadas los investigadores se han interesado en caracterizar el antagonismo de los fitopatógenos. El presente estudio pretendió avanzar en el conocimiento de las interacciones entre *Trichoderma spp.* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia frutícola* y *Botrytis cinérea*. Y considerar así, el uso de *Trichoderma spp.* como herramienta de control dentro de una estrategia de tratamiento integrado de enfermedades.

CAPÍTULO 4.- OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluación in vitro de la actividad biológica de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Monilinia frutícola*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea*.

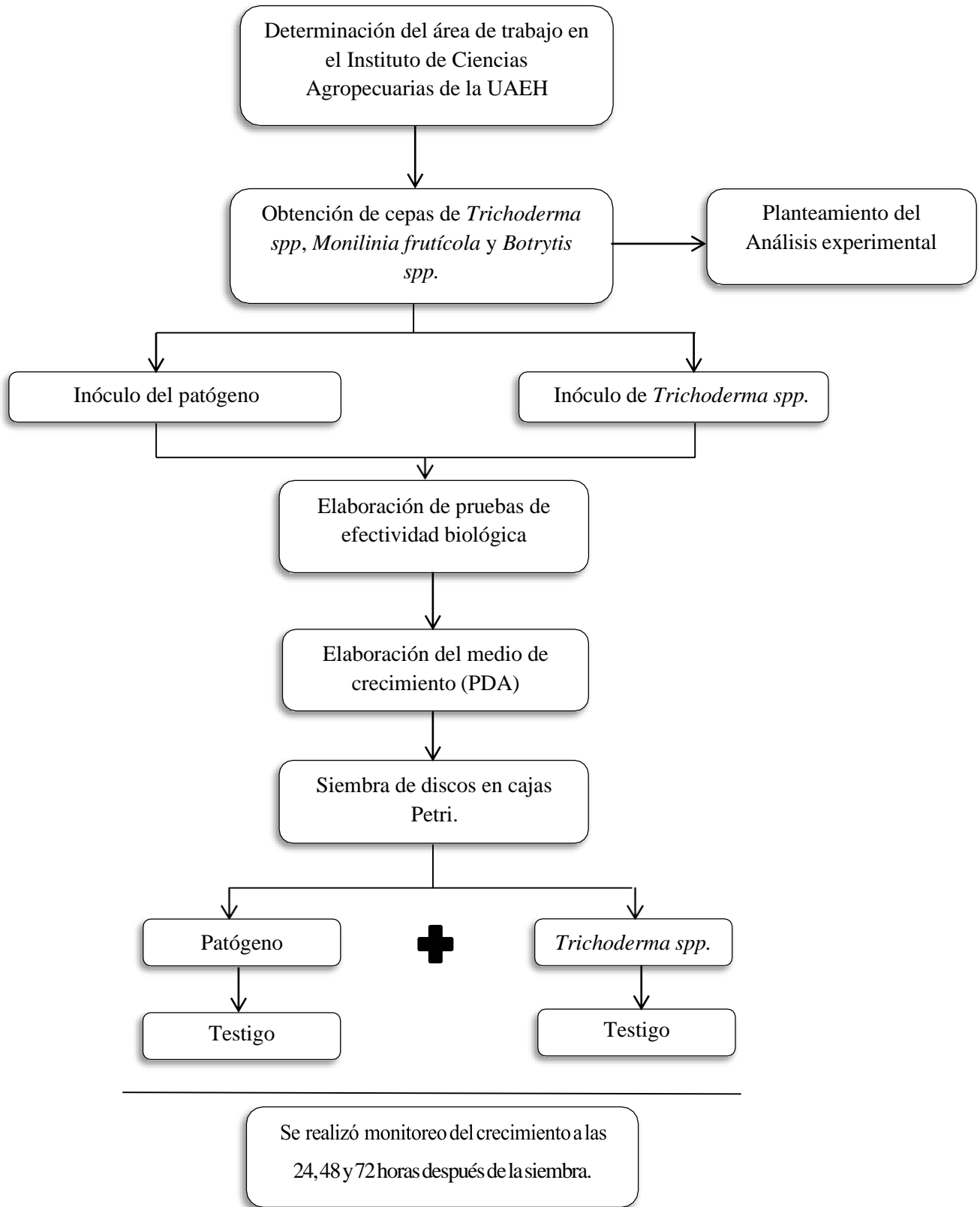
4.2. Objetivos Específicos

- 1) Evaluación de la actividad biológica por las cepas aisladas de *Trichoderma spp* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia spp* y *Botrytis cinerea*. en cultivo dual.
- 2) Observar el efecto de la actividad biológica a lo largo del tiempo.
- 3) Proponer mecanismo de acción biológica de *Trichoderma spp.* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia spp* y *Botrytis cinerea*.

CAPÍTULO 5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diagrama de flujo

El siguiente flujograma muestra la metodología utilizada para la elaboración de medios de cultivos y pruebas de efectividad biológica.



El trabajo se realizó en el laboratorio de anatomía vegetal en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP), perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Se utilizó una cepa de *Trichoderma* spp. Con el fin de evaluar su efecto contra los patógenos: *Monilinia* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis* spp.

5.1.2. Obtención del inóculo de *Trichoderma* spp.

Las cepas se obtuvieron del departamento de química agrícola ambiental del ICAP perteneciente a la UAEH.

Se requirió la resiembra de las cepas madres para las pruebas duales, por lo que se elaboró previamente el medio de cultivo; para lo cual:

Se utilizaron 10.53 gramos de PDA (Papa- dextrosa-agar) medio de cultivo deshidratado BIOXON, pesados con exactitud en una balanza analítica marca EXPLORER.; se aplicaron 270 ml de agua destilada en un matraz, se incluyó en el mismo el PDA previamente pesado. Utilizando una parrilla eléctrica de calentamiento se colocó el material antes preparado agitándose constantemente con la ayuda de un agitador magnético a 285 °C, posteriormente se colocó en la autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

Para el vaciado del medio en placas se utilizó una campana de flujo laminar, previamente se limpió con algodón impregnado con alcohol, se mantuvo por media hora con luz ultravioleta.

Se vertió el medio de cultivo preparado en cada una de las cajas Petri hasta el nivel ideal marcado en cada caja; se dejó enfriar y solidificar el medio de cultivo dentro de la campana de flujo laminar.

Posteriormente se llevó a cabo la siembra, y se dejaron crecer a los antagonistas en una incubadora microbiana a 28 °C durante tres días. Para los ensayos de antagonismo o ensayos duales se tomó un disco de 5 mm de diámetro de una colonia de *Trichoderma* spp. posteriormente se sembró el patógeno a 1 cm del borde, cada cultivo tuvo 5 repeticiones. A partir de las 24 horas se realizaron mediciones diarias del diámetro de crecimiento.

5.1.3. Obtención del inóculo de *S. sclerotiorum*, *Monilinia frutícola* y *Botrytis cinérea*.

Las cepas madre se obtuvieron por parte del Dr. Alfredo Madariaga Navarrete, doctor investigador del ICAP, perteneciente a la UAEH, las cuales se resembraron para poder realizar las pruebas duales, realizando la elaboración del medio de crecimiento, la preparación de las cajas Petri y la siembra con la metodología utilizada anteriormente.

5.1.4. Pruebas de efectividad biológica

Las pruebas duales o pruebas de antagonismo se desarrollan en medios de cultivo. Para los ensayos de antagonismo se extrae una muestra del hongo de 5 mm de diámetro y posteriormente

se siembra el hongo endófito con sus respectivas réplicas. Como controles se analizan por separado (Prada, 2009).

Siguiendo esta metodología propuesta por Harold Prada (Prada, 2019), se prosiguió a preparar el medio de cultivo (Papa-Dextrosa-Agar) y a rotular las cajas Petri a utilizar en cada prueba, dividiendo con un marcador cada una de las cajas en cuatro partes.

Una vez elaborado el medio de cultivo se realizó la siembra en una campana de flujo laminar, en dónde se vertió en cada una de las cajas el PDA, hasta cubrir las y esperar a que se solidifique para poder sembrar los discos de los hongos.

Se colocó un disco de 5 milímetros del patógeno a una distancia de 2 centímetros del centro de la caja Petri y un disco de 5 milímetros de *Trichoderma spp* a una distancia de 2 centímetros partiendo del centro de la caja, es decir a una distancia de 4 centímetros entre *Trichoderma spp* y el patógeno

Posteriormente se hizo crecer a los antagonistas en una incubadora microbiana a 28°C durante tres días. Finalmente se monitoreó realizando una lectura por medio del vernier digital a las 24, 48 y 72 horas.

5.1.5. Diseño experimental

Para determinar los mecanismos de acción sobre los patógenos se emplearon cajas Petri de 8 centímetros, las cuales contenían medio papa-dextrosa-agar, con *Trichoderma spp*. Y el hongo patógeno en cultivo dual en la misma caja.

El diseño experimental utilizado para cada tratamiento de las pruebas duales, fue completamente al azar, la variable medida fue el crecimiento de *Trichoderma* respecto al hongo fitopatógeno.

Se utilizaron 5 repeticiones y 2 testigos en cada experimento, por cada control a evaluar; el testigo consistió en sembrar un disco del hongo patógeno en el centro de la caja Petri.

CAPÍTULO 6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. *Trichoderma spp.* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los resultados obtenidos mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey muestran diferencias significativas de las medias de crecimiento de *Trichoderma spp.* y *S. sclerotiorum* en las pruebas duales respecto al tiempo (Tabla 1) en los cuales medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En la interacción de las pruebas de efectividad biológica se observa que el testigo de *Trichoderma spp.* tiene un crecimiento acelerado a partir de las 24 horas lo cual consiste en casi el doble de crecimiento (5.19 mm) que el testigo *S. sclerotiorum* (2.92 mm).

A las 72 horas mostraron la mayor diferencia los testigos *Trichoderma spp.* (25.25 mm) y *S. sclerotiorum* (11.56 mm) así como diferencias en los resultados de la interacción en las pruebas duales de *Trichoderma spp.* (24.2760 mm) respecto a *S. sclerotiorum* (10.8240 mm).

Tabla 1. Crecimiento de *Trichoderma spp.* y *S. sclerotiorum*, en las pruebas duales.

Control	Crecimiento (mm)		
	Tiempo evaluado		
	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Trichoderma spp.</i>	5.19	14.63	25.25
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2.92	5.83	11.56
<i>Trichoderma spp.</i> + <i>S. sclerotiorum</i>	T= 4.1320 (C) S= 1.6440 (C)	T= 13.2540 (B) S= 5.7460 (B)	T= 24.2760 (A) S= 10.8240 (A)

En la ilustración 7, se puede observar que el crecimiento del testigo de *Trichoderma spp.* a las 72 horas se muestra constante mientras el testigo *S. sclerotiorum* continúa su lento crecimiento en comparación con *Trichoderma spp.* En cuanto a las repeticiones (Ilustración 8) es notorio el crecimiento acelerado de *Trichoderma spp.* sobre *S. sclerotiorum*.

Ilustración 7. Crecimiento de testigos de *Trichoderma spp* (A) y *S. sclerotiorum* (B).

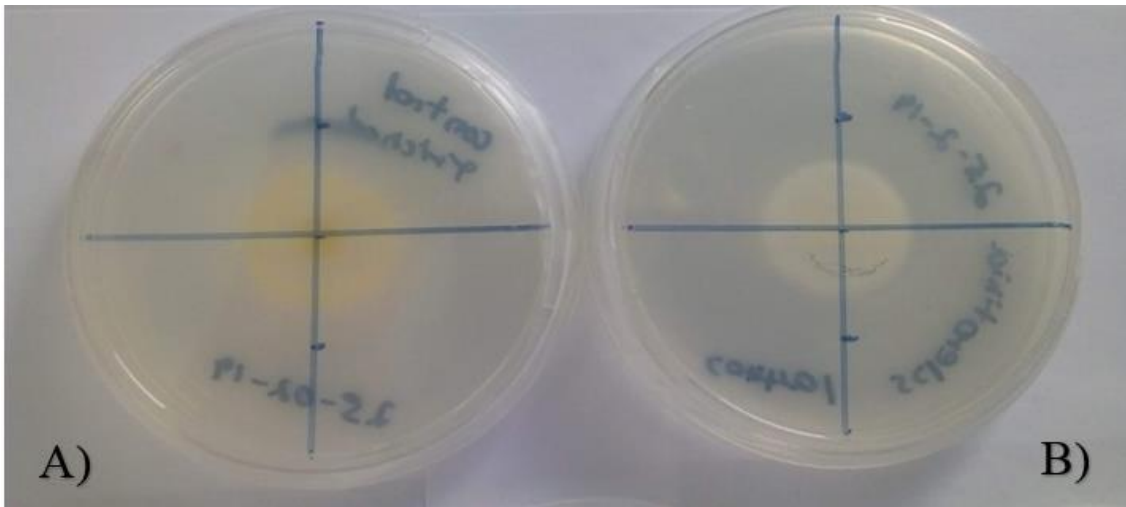
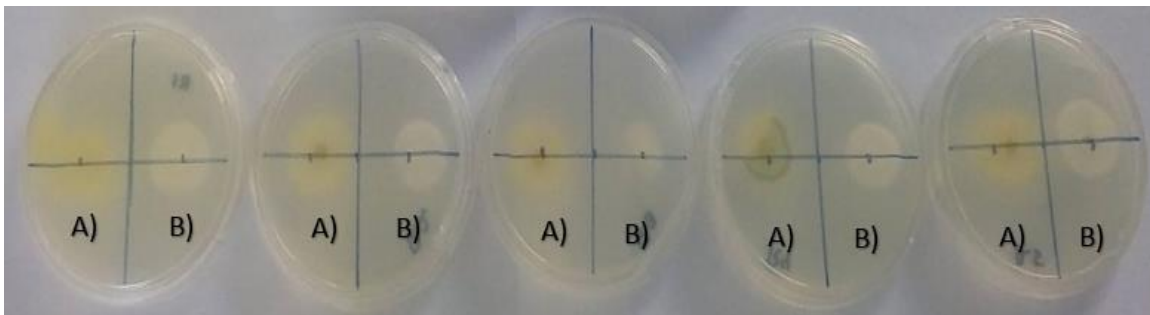
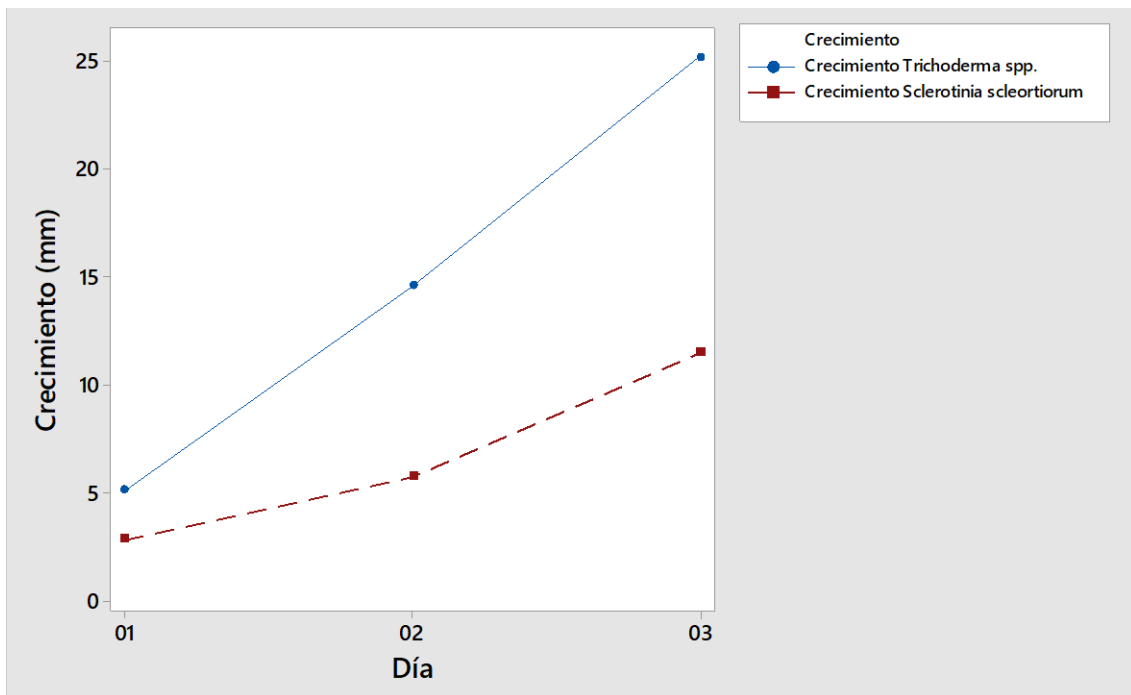


Ilustración 8. Crecimiento de las repeticiones de *Trichoderma spp.*(A) y *S.sclerotiorum* (B) a las 72 horas.

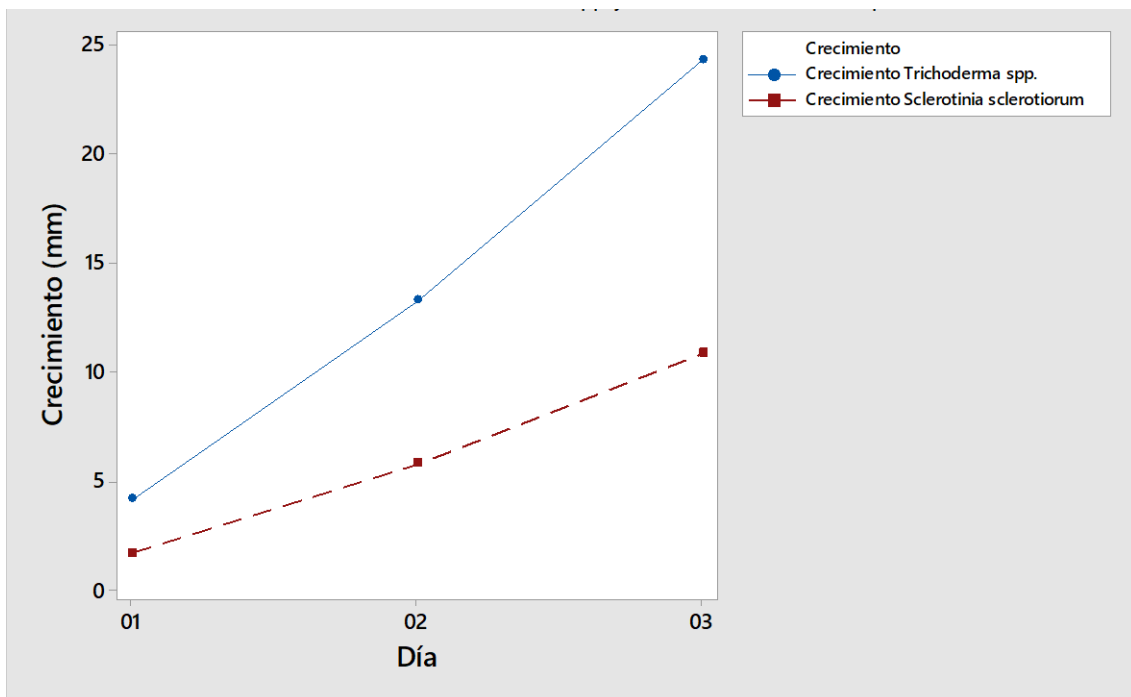


S. sclerotiorum muestra crecimiento notorio, pero lento en comparación con *Trichoderma spp.* En cuanto a las repeticiones en las pruebas duales, se puede ver el crecimiento rápido de *Trichoderma spp.* sobre *S. sclerotiorum* además se observa que el crecimiento de *S. sclerotiorum* es más rápido en el testigo en comparación con las pruebas duales dada la presencia del otro hongo, como se muestra en la Gráfica 1 y 2.

Gráfica 1. Crecimiento de *Trichoderma spp.* y *Sclerotinia sclerotiorum* al tiempo evaluado.



Gráfica 2. Pruebas duales de *Trichoderma spp.* y *Sclerotinia sclerotiorum* al tiempo evaluado.



El antagonismo que ejerció *Trichoderma spp.* hacia *Sclerotinia sclerotiorum* se manifestó en la aparición de un halo de inhibición a partir de las 48 horas en pruebas de antagonismo, el cual se acentuó aún más a las 72 horas. Se comprobó la disminución de crecimiento de la colonia del

patógeno, estas observaciones pueden relacionarse con la capacidad que mostró este aislamiento (*Trichoderma spp.*) para producir enzimas que degradan los principales componentes químicos de las paredes celulares de los esclerocios y las hifas del patógeno (*Sclerotinia sclerotiorum*).

De igual forma las pruebas realizadas en el trabajo de (Méndez, 1996), mostraron que el aislamiento de *Trichoderma harzianum* BAFC cult. N° 742 corresponde al de un micoparásito agresivo que ocasiona la destrucción de los esclerocios e hifas de *Sclerotinia sclerotiorum*.

6.2. *Trichoderma spp.* y *Monilinia frutícola*

Los resultados obtenidos mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey muestran diferencias significativas de las medias de crecimiento de *Trichoderma spp.* y *Monilinia frutícola* en las pruebas duales respecto al tiempo (Tabla 2) en los cuales medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En la interacción de las pruebas de efectividad biológica se observa que el testigo de *Trichoderma spp.* tiene un crecimiento menor a partir de las 24 horas (4.19 mm) respecto al testigo de *M. frutícola* (4.85 mm).

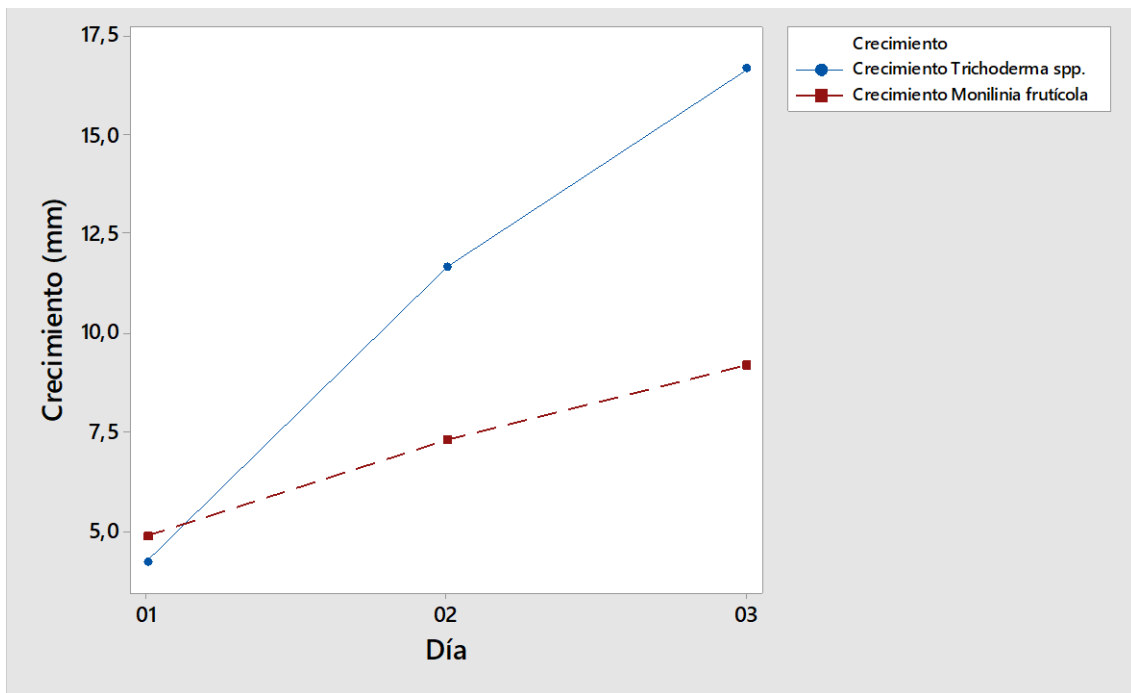
A las 72 horas mostraron la mayor diferencia los testigos de *Trichoderma spp.* (16.64 mm) y *Monilinia frutícola* (9.17 mm) así como en los resultados de la interacción en las pruebas de efectividad biológica de *Trichoderma spp.* (16.8060 mm) respecto a *Monilinia frutícola* (7.5760 mm).

Tabla 2. Crecimiento de *Trichoderma spp.* y *Monilinia frutícola*, en las pruebas duales.

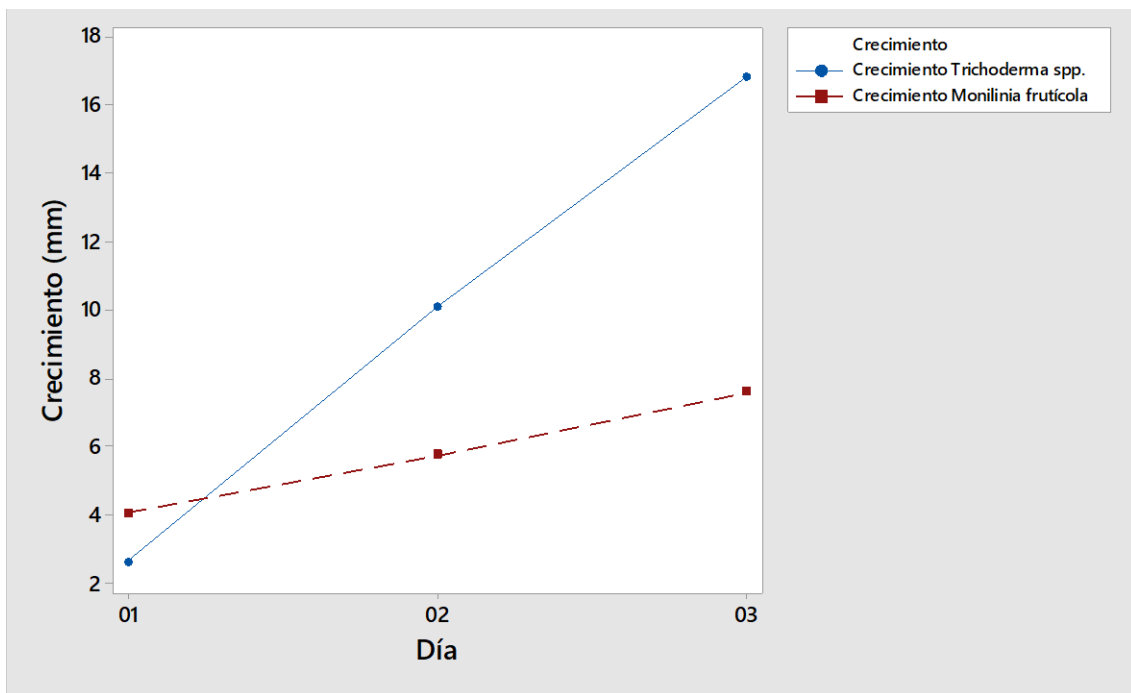
Control	Crecimiento (mm)		
	Tiempo evaluado		
	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Trichoderma spp.</i>	4.19	11.64	16.64
<i>Monilinia frutícola</i>	4.85	7.27	9.17
<i>Trichoderma spp.</i> + <i>M. frutícola</i>	T=2.6060 (C) M=4.0340 (C)	T=10.0720 (B) M=5.7400 (B)	T=16.8060 (A) M=7.5760 (A)

Sin embargo, después de las 48 horas hasta las 72, el crecimiento del testigo de *Trichoderma spp.* fue mayor sobre el crecimiento de *Monilinia frutícola*. En cuanto a las repeticiones de las pruebas duales se puede ver un crecimiento mayor de *Trichoderma spp.* sobre *M. frutícola* a partir de las 48 horas como se muestra en la Gráfica 3 y 4.

Gráfica 3. Crecimiento del control de *Trichoderma spp.* y *Monilinia frutícola* al tiempo evaluado.

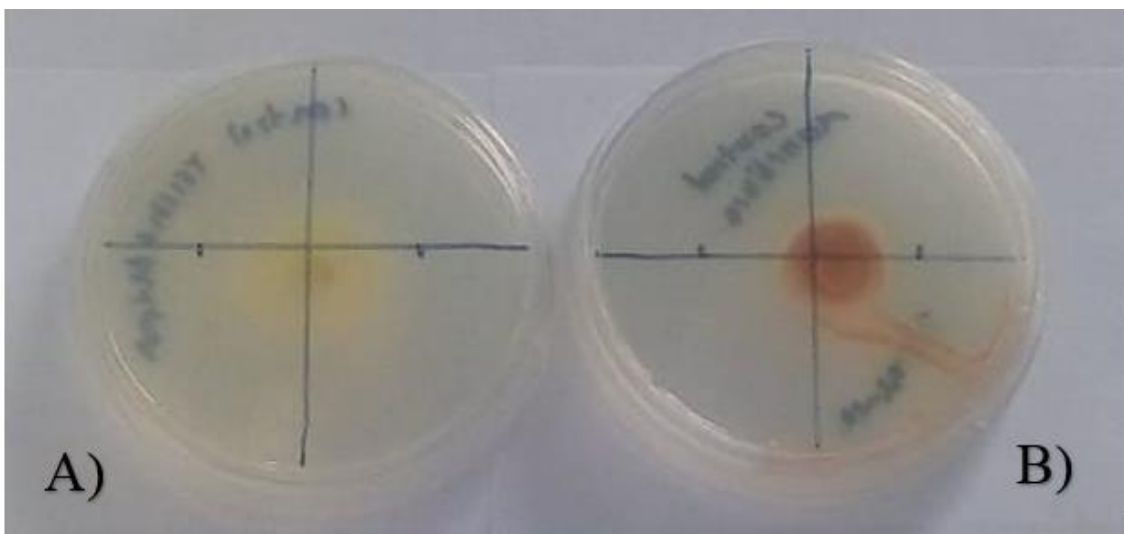


Gráfica 4. Pruebas duales de *Trichoderma spp.* y *Monilinia frutícola* al tiempo evaluado.



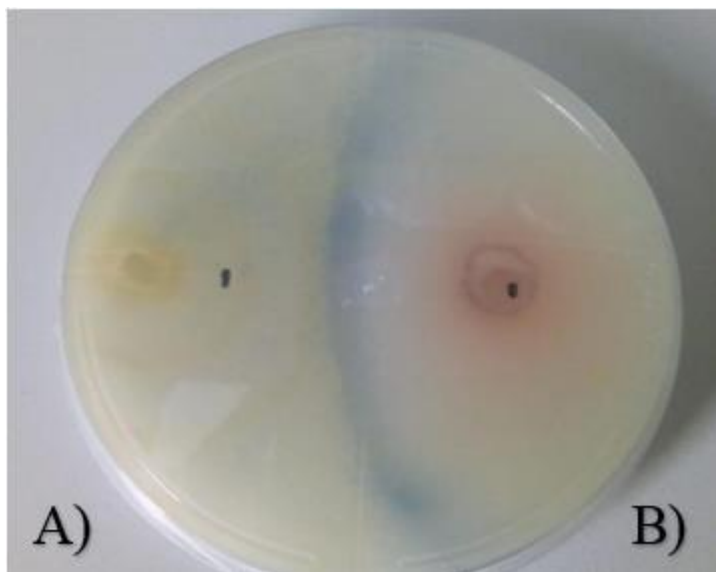
En la Ilustración 9 se observa que el crecimiento del testigo de *Trichoderma spp.* a las 72 horas se muestra constante mientras el testigo *Monilinia frutícola* continúa su crecimiento generando una especie de barrera de 2.6 mm de espesor la cual supone ser resultado de la producción de algunos metabolitos secundarios generados por este hongo.

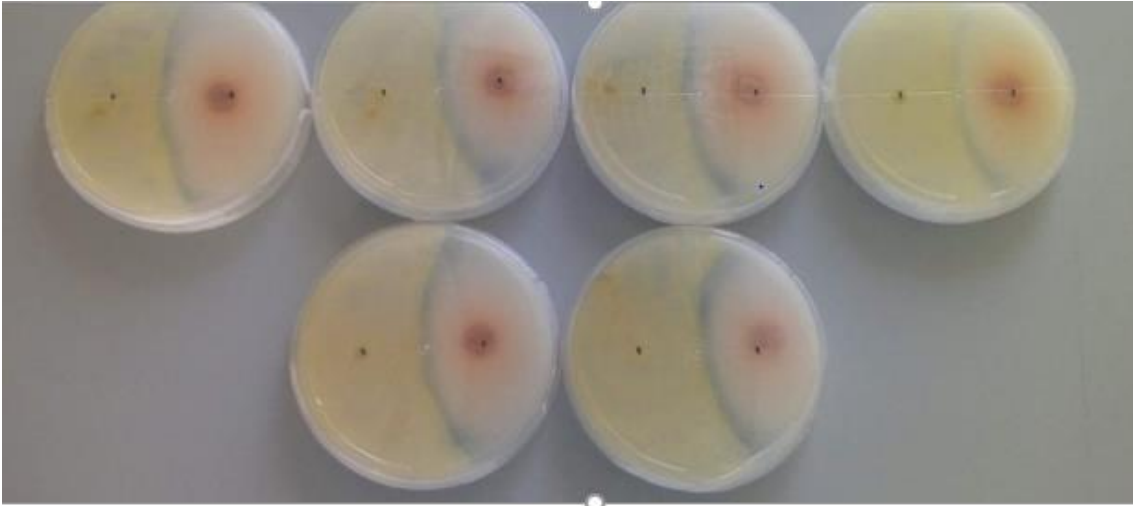
Ilustración 9. Crecimiento de testigos de *Trichoderma spp* (A) y *Monilinia frutícola* (B) a las 72 horas.



Sin embargo, el antagonismo de *Trichoderma spp* hacia *Monilinia frutícola* mostró ausencia de contacto físico, lo cual se debe posiblemente a la producción de fitotoxinas o enzimas líticas, como lo muestra el estudio realizado por (Benítez, 2017) donde tres especies de *Monilinia* presentaron actividad enzimática de α -glucosidasas, pectin-liasas, polygalacturonasas, proteasas y xilanasas en medio de cultivo. Adicionalmente, *M. fruticola* y *M. laxa* presentaron actividad enzimática de cutinasas en medio de cultivo y ninguna de las especies tenía actividad enzimática de β -glucosidasas, necesaria para degradar hemicelulosa y callosa en medio de cultivo. Se concluye que *Monilinia spp.* utiliza tanto fitotoxinas como enzimas líticas para penetrar y colonizar los frutos.

Ilustración 10. Crecimiento de las repeticiones de *Trichoderma spp.* (A) y *Monilinia frutícola* (B) a las 72 horas.





Al carecer de trabajos relacionados con el estudio de las sustancias producidas por *Monilinia frutícola* ante *Trichoderma spp.* este estudio puede ayudar a futuros trabajos de investigación.

6.3. *Trichoderma spp.* y *Botrytis cinerea*.

Los resultados obtenidos mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey muestran diferencias significativas de las medias de crecimiento de *Trichoderma spp.* y *B.cinerea* en las pruebas duales respecto al tiempo (Tabla 3) en los cuales medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En la interacción de las pruebas de efectividad biológica se observa que el testigo de *Trichoderma spp.* tiene un diámetro de crecimiento un poco más amplio (6.96 mm) que el testigo *B.cinerea* (6.74mm) a las 24 horas.

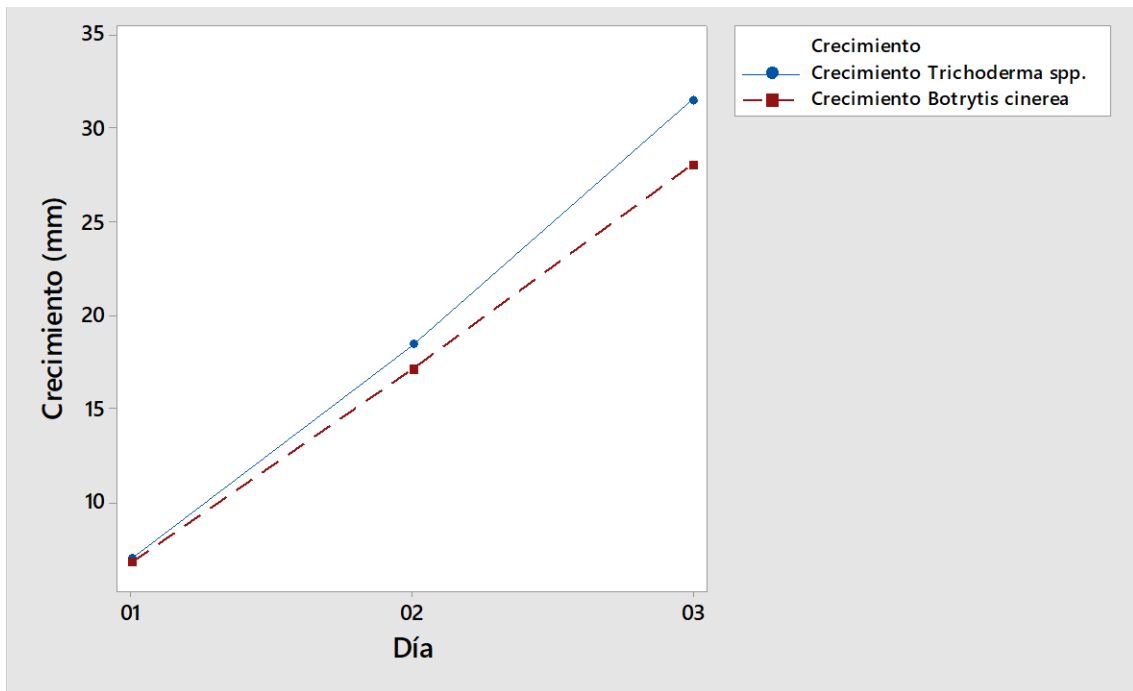
A las 72 horas mostraron la mayor diferencia *Trichoderma spp* (31.54 mm) y *B.cinerea* (28.04 mm) así como diferencias en los resultados de la interacción en las pruebas duales de *Trichoderma spp* (25.5540 mm) respecto a *B.cinerea* (27.5640mm).

Tabla 3. Crecimiento de *Trichoderma spp.* y *Botrytis cinerea*, en las pruebas duales.

Control	Crecimiento (mm)		
	Tiempo evaluado		
	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Trichoderma spp.</i>	6.96	18.38	31.54
<i>Botrytis cinérea</i>	6.74	17.10	28.04
<i>Trichoderma spp.</i> + <i>B. cinérea</i>	T=5.4800 (C) B=3.1220 (C)	T=14.6960 (B) B=11.9020 (B)	T=25.5540 (A) B=27.5640 (A)

En cuanto a las pruebas duales se puede ver el crecimiento notorio de *Trichoderma spp.* sobre *B. cinérea* hasta las 48 horas, además se puede observar que el crecimiento de *B. cinérea* es más rápido en el testigo en comparación con sus repeticiones dada la presencia del *Trichoderma spp.* sin embargo, a las 72 horas el crecimiento de *B. cinérea* es mayor que el de *Trichoderma spp.* como se muestra en la Gráfica 5 y 6.

Gráfica 5. Crecimiento de *Trichoderma spp.* y *Botrytis cinérea*, al tiempo evaluado.



Gráfica 6. Crecimiento de *Trichoderma spp.* y *Botrytis cinérea* al tiempo evaluado.

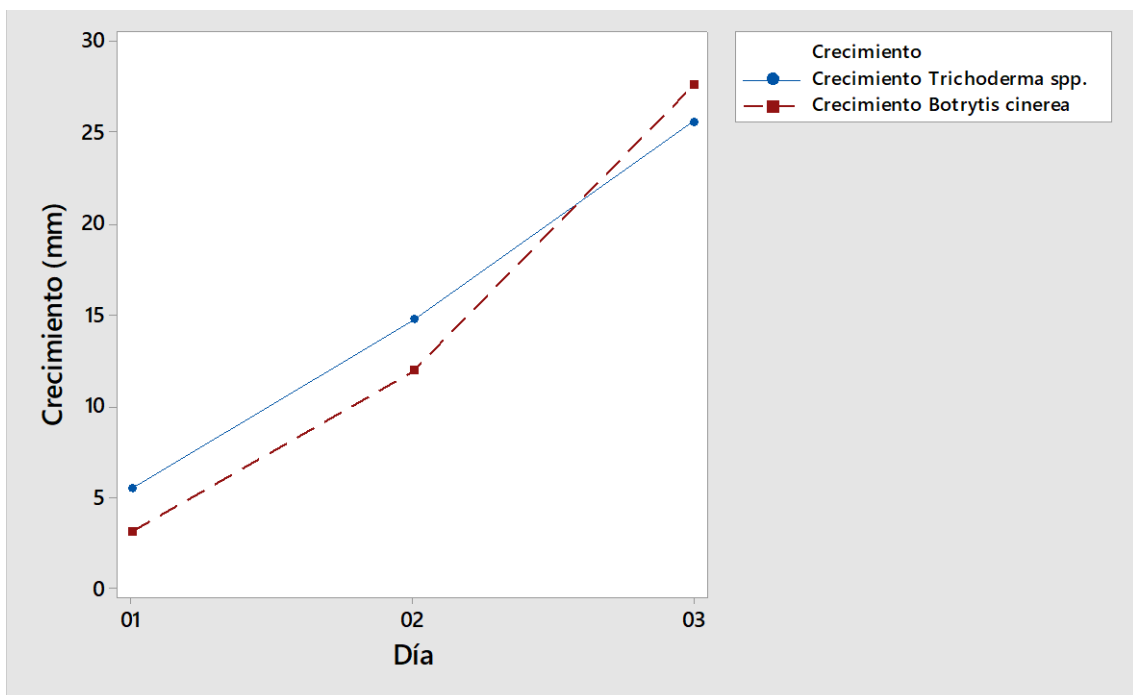
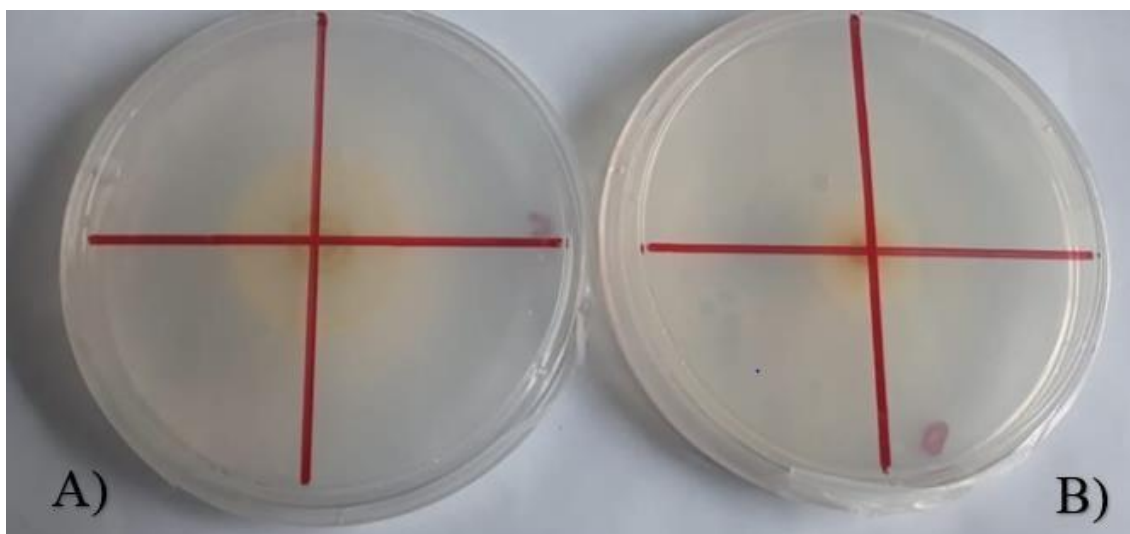


Ilustración 9. Crecimiento de *Trichoderma spp* (A) y *Botrytis cinerea* (B) a las 72 horas.



Prueba de la eficacia de *Trichoderma spp.* sobre *Botrytis cinérea* es el trabajo elaborado por (Gaytán, 2006) *Trichoderma harzianum* y *T. lignorum*, iprodione en dosis comercial y un tratamiento testigo, La incidencia de la enfermedad en el tratamiento testigo fue del 60%, mientras que para los tratamientos con *T. harzianum* y *T. lignorum* solo alcanzó un 33%, lo que indica un control mayor de los antagonistas en comparación con el químico sobre la enfermedad.

Así mismo en las pruebas duales realizadas de *Trichoderma spp.* contra *Botrytis cinérea* resulta efectiva la utilización de *Trichoderma spp.* como mecanismo de biocontrol ante *B.cinerea* dado al crecimiento superior del controlador sobre el fitopatógeno.

De igual forma se realizó un trabajo por (Flad & A.Kapat, 1999) donde se compararon dos aislamientos de *T. harzianum* por su capacidad para producir proteasa en medio de cultivo líquido y en la superficie de las hojas de frijol. El resultado fue que las enzimas hidrolíticas producidas por *B.cinerea*, endopoligalacturonas a (PG) y exo PG fueron parcialmente desactivadas por la proteasa de los aislados de *T. harzianum*,

CAPÍTULO 7.- CONCLUSIÓN

Las pruebas en donde *Trichoderma spp.* tuvo el antagonismo más agresivo, inhibiendo el desarrollo y creciendo más que el fitopatógeno fueron en: a) *Trichoderma spp* contra *Sclerotinia sclerotiorum* y b) *Trichoderma spp* contra *Botrytis cinérea*.

El uso de *Trichoderma spp.* in vitro se perfila como un mecanismo viable de control biológico para los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinérea* ya que al evaluar la actividad biológica mediante la realización de las pruebas duales supone a *Trichoderma spp* como una alternativa para el control biológico, esto aunado a las observaciones de la actividad biológica durante 72 horas, tiempo mediante el cual se estudió el comportamiento del crecimiento del control y los patógenos en cada una de las pruebas duales.

Las expectativas basadas en las observaciones in vitro sugieren el potencial de *Trichoderma spp* como agente de biocontrol para estos fitopatógenos.

CAPÍTULO 8.- LITERATURA CITADA

Referencias

- Agrios, G. N. (1995). *Fitopatología*. Limusa.
- Arranz, M. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, S43-S46.
- Baena, M. (2008). Extinción de especies. Ciudad de México, México.
- Benítez, C. G. (2017). Epidemiología y control de la podredumbre parda del melocotón en postcosecha.
- CENSA. (Abril de 2009). Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatógenos. La Habana, Cuba.
- CENSA, C. N. (Abril de 2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. Mayabeque, Cuba.
- Flad, Y., & A.Kapat. (1999). El papel de la proteasa de *Trichoderma harzianum* en el Biocontrol de *Botrytis cinérea*.
- Flores, F. (Junio de 2011). Estudio ecológico y biotecnológico del Laurel en Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Gaytán, J. B. (2006). Efecto de dos cepas de *Trichoderma spp.* en el control de *Botrytis cinérea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria sp.*) en donde se evaluaron dos cultivares comerciales de fresa (Camino Real y Ventana).
- Guzmán, J. L. (MAYO de 2017). EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CONTROL DE LA PODREDUMBRE BLANDA DE RAÍZ. QUETZALTENANGO, GUATEMALA.
- Hartmann, H. (2001). *Propagación de plantas*. México, D.F.
- INHEM. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. La Habana, Cuba.
- MARM, M. d. (s.f.). Ficha descriptiva de organismos nocivos. Madrid, España.
- Méndez, A. B. (1996). Micoparasitismo de *Trichoderma spp.* sobre el patógeno vegetal del suelo *Sclerotinia sclerotiorum*.
- OMS. (19 de Febrero de 2018). Residuos de plaguicidas en alimentos.
- Prada, H. (2009). Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endofito *Diaporthe sp.* aislado de frailejón (*Espeletia sp.*) y el fitopatógeno. Bogotá, Colombia.
- Rómulo García Velasco, C. U. (s.f.). *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosa híbrida en la zona florícola sur del estado de México y la evaluación de su sensibilidad in vitro a fungicidas. Tenancingo, Méxco, México.

Santamarina, M. (Octubre de 2005). *Trichoderma*: Mecanismos de control. España.

UFLA, U. F. (Junio de 2015). Control biológico de la enfermedad de *Sigatoka negra* del bananocon *Trichoderma*. Lavras, Brasil.

Universidad de la Republica, U. (16 de Febrero de 2016). *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico. Uruguay.

USC, U. d. (2017). La Enfermedad del Moho Blanco de las Brásicas. Galicia, España.

Vinale, F. (25 de Abril de 2006). Metabolitos secundarios principales producidos por dos cepas comerciales de *Trichoderma* activas contra diferentes fitopatógenos. Nápoles, Italia.

CAPÍTULO 9.- ANEXOS

9.1 Análisis estadístico: *Trichoderma* spp. y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Procedimiento ANAVA:

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Crecimiento de *Trichoderma* spp.

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.26231
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	1.8957

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	24.2760	5	T-S72
B	13.2540	5	T-S48
C	4.1320	5	T-S24

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum*.

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.73618
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	1.4477

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	10.8240	5	T-S72
B	5.7460	5	T-S48
C	1.6440	5	T-S24

9.2 Análisis estadístico: *Trichoderma spp.* y *Monilinia frutícola*.

Procedimiento ANAVA:

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para crecimiento de *Trichoderma spp.*

NOTA: Este test controla el índice de error experiment wise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.115543
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	0.5735

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	16.8060	5	T-M72
B	10.0720	5	T-M48
C	2.6060	5	T-M24

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para crecimiento de *Monilinia frutícola*.

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.313587
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	0.9448

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	7.5760	5	T-M72
B	5.7400	5	T-M48
C	4.0340	5	T-M24

9.3 Análisis estadístico: *Trichoderma spp.* y *Botrytis cinérea*.

Procedimiento ANAVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para crecimiento de *Trichoderma spp.*

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.33887
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	1.9523

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	25.5540	5	T-B72
B	14.6960	5	T-B48
C	5.4800	5	T-B24

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para crecimiento de *Botrytis cinérea*.

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.762923
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	1.4737

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	27.5640	5	T-B72
B	11.9020	5	T-B48
C	3.1220	5	T-B24