



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGO

Selección de aislado fúngicos con actividad antagonista para
el control del fitopatógeno *Botrytis cinerea*

TESIS

Para obtener el grado de:
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:
Jared Maya Alavez

Asesor de tesis:
D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Coasesor de tesis
M.C Alberto Flores García

Contenido

Índice figuras.....	3
Índice de tablas	3
Resumen	4
Abstract.....	5
1.0 Introducción.....	6
2.0 Antecedentes	8
3.0 Marco teórico	10
3.1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.1.2 Taxonomía de <i>Botrytis cinerea</i>	11
3.1.3 Características morfológicas de <i>Botrytis cinerea</i>	11
3.1.4 Dispersión de <i>Botrytis cinerea</i>	12
3.1.5 Reproducción sexual	12
3.1.6 Ciclo de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	13
modificado	15
3.1.7 Estructuras de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	15
3.1.8 Modo de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	16
3.1.9 Metabolitos secundarios de <i>B. cinerea</i>	16
3.1.10 Descomposición de las paredes celulares vegetales por <i>B. cinerea</i>	17
3.2 Control Químico	18
3.2.1 Resistencia de los fitopatógenos al control Químico.....	19
3.3 Control Biológico.....	19
3.3.1 Modos de acción del Antagonista	21
3.3.2 Control biológico indirecto	22
3.3.3 Interacción directa con el patógeno	23
3.3.4 Características para el desarrollo de antagonistas.....	24
3.3.5 Ventajas del control biológico.....	25
3.3.6 Desventajas del control biológico	25
3.3.9 Control biológico con bacterias	26
3.3.10 Control biológico con Hongos	26
4.0 Hipótesis	29
5.0 Objetivo general.....	29
5.1 Objetivos particulares	29

6.0 Justificación	30
7.0 Materiales y métodos	31
7.1 Preparación del medio con avena para el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	31
7.2 Identificación del hongo <i>B. cinerea</i> por microscopia	32
7.3 Lavado de esporas de <i>B. cinerea</i>	32
7.4 Cuantificación de las esporas del fitopatógeno <i>B. cinerea</i>	32
7.5 Crecimiento de los aislados fúngicos	33
9.6 Escrutinio de aislado fúngicos con actividad antagonista para el control de <i>B. cinerea</i>	34
7.7 Enfrentamiento <i>in vitro</i> de los aislados fúngicos con actividad antagonista contra <i>B. cinerea</i>	36
7.8 Sinergia de los aislados fúngicos contra <i>B. cinerea</i>	36
7.9 Medio acondicionado con los aislados fúngicos con actividad antagonista sobre <i>B. cinerea</i>	36
7.10 Efecto aditivo de los aislados fúngicos con actividad antagonista sobre <i>Botrytis cinerea</i>	37
7.11 Efecto antagonista de los compuestos orgánicos volátiles (CO's) de los aislados fúngicos	37
8.0 Discusión	38
9.0 Conclusión	43
9 Bibliografías	44

Índice figuras

- Figura 1** Ciclo de vida de *B. cinerea* ¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Infección de *B. cinerea*..... ¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Metabolitos secundarios de del fitopatógeno *B. cinerea* que interviene en el proceso de infección ¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Interacción de los agentes que conforman el control biológico ¡Error! Marcador no definido.
Figura 5 Cámara de Newbaoer ¡Error! Marcador no definido.
Figura 6 ensayo del escrutinio para a selección de aislados fúngicos con actividad antagonista para *B. cinerea*..... ¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas

- Tabla 1** Los hongos que se reportaron como agentes de control biológico de patógenos ¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2 Los aislados que se utilizaron en el sayo antagonista ¡Error! Marcador no definido.

Resumen

Selección de aislado fúngicos con actividad antagonista para el control del fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Palabras clave: Control biológico, *Botrytis cinerea*, antibiosis, compuestos orgánicos volátiles y metabolitos secundarios.

El patógeno *B. cinerea* infecta a 200 especies vegetales y genera pérdidas importantes para la agricultura, ocupa el segundo lugar en generar pudrición en pre y pos cosecha. El uso fungicidas químicos son la principal medida para el control de *B. cinerea*, pero causan efectos negativos para el ambiente y el consumo humano, por lo cual es necesario buscar alternativas como el control biológico, por ejemplo, la secreción de compuestos orgánicos de los hongos con actividad antagonista. El objetivo de este trabajo fue seleccionar aislados fúngicos con actividad antagonista. El estudio se realizó con 35 hongos que se aislaron de cultivos vegetales enfermos y se enfrentaron a *B. cinerea in vitro*. En este escrutinio se seleccionaron cuatro aislados fúngicos; *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe Phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 porque inhibieron a *B. cinerea*. Dos experimentos se realizaron para determinar el tipo de antagonismo, uno de confrontación directa y en otro por compuestos volátiles. Los aislados fúngicos *Fusarium* sp., *Pestalotia* spp., *Diaporthe Phaseolorum* y *Phomopsis viticola* 5120 presentaron actividad antagonista por metabolitos secundarios en medio difusible al inhibir el crecimiento colonial del hongo. Los aislados *Fusarium* spp. y *Pestalotia* sp., tienen actividad al secretar compuestos volátiles que inhiben el crecimiento de *B. cinerea*.

Abstract

Selection of fungal isolates with antagonistic activity for the control of phytopathogen *Botrytis cinerea*

Key words: Biological control, *Botrytis cinerea*, antibiosis, volatile organic compounds and secondary metabolites.

The pathogen *B. cinerea* infects 200 plant species and generates important losses for agriculture, occupies the second place in generating rottenness in pre- and post-harvest. The use of chemical fungicides is the main measure for the control of *B. cinerea*, but they cause negative effects for the environment and human consumption, so it is necessary to look for alternatives such as biological control, for example, the secretion of organic compounds from fungi with antagonistic activity. The objective of this work was to select fungal isolates with antagonistic activity. The study was conducted with 35 fungi that were isolated from diseased vegetable crops and faced *B. cinerea in vitro*. In this scrutiny four fungal isolates were selected; *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe Phaseolorum* 5446 and *Phomopsis viticola* 5120 because they inhibited *B. cinerea*. Two experiments were carried out to determine the type of antagonism, one of direct confrontation and the other by volatile compounds. The fungal isolates *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe Phaseolorum* 5446 and *Phomopsis viticola* 5120 presented antagonistic activity via secondary metabolites diffusible in medium by inhibiting the colonial growth of the fungus. The isolates *Fusarium* spp. and *Pestalotia* sp., have activity by secreting volatile compounds that inhibit the growth of *B. cinerea*.

CAPITULO I

1.0 Introducción

La agricultura se define como la base para el establecimiento de las sociedades y cambió de ser un medio de supervivencia humana a una industria comercial (Gomiero, 2017), Desde la década de 1950, la producción de granos aumentó significativamente en países desarrollados, (Hen y Zhang, 2015). La relación entre la agricultura y la industria es vital para el desarrollo de un país y se convierte en una cuestión de interés en el contexto del crecimiento industrial es un factor importante en el crecimiento económico y la salud (Benito *et al.*, 1999). La agricultura es la clave para alcanzar los objetivos del desarrollo sostenible por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para erradicar el hambre y asegurar alimentos para una creciente población de 9 – 10 mil millones de personas que se calcula para el 2050. Lo que requeriría un aumento de la producción mundial de alimentos entre un 60 – 110 % (Rockström, *et al.*, 2017). Las pérdidas poscosecha de granos y hortalizas pueden alcanzar el 25 % de la producción total de los países desarrollados y un 50 % en los países en desarrollo, sin las condiciones de manejo y almacenamiento poscosecha que no sean las óptimas, genera mermas en las cosechas por las enfermedades que causan los hongos fitopatógenos esto se debe a la cantidad de nutrientes y contenido de agua (Nunes, 2011). Las enfermedades de las plantas por las infecciones del hongo *Botrytis cinerea* (moho o podredumbre gris) que infecta a más de 200 especies vegetales, causas pérdidas importantes al afectar los cultivos, antes y después de las cosechas para lo cual, el principal método para el control de la enfermedad es el uso de fungicidas químicos como los bencimidazoles (tiabendazol, benomi y carbendazim) e inhibidores de la síntesis del esterol (imazailil, prochloraz y propiconazol) dan excelente resultado para el control del moho gris. El uso

continuo genera como resultado una serie de cepas resistentes al aumentar el número de aplicación y el uso de fungicidas poscosecha. En algunos países se limitan o prohíben el uso de fungicidas por los riesgos ambientales y toxicológicos en los seres vivos (Eckert,1990; Steffen, 2018). Las prácticas de agricultura orgánica están reguladas internacionalmente por las Directrices del Codex Alimentario de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Federación Internacional de Movimiento de Agricultura Orgánica (IFOAM). La búsqueda para la reducción del uso de fungicidas genera la inquietud de nuevas alternativas ecológicas, por lo cual, el uso del control biológico que es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o un parásito, en estado activo o durmiente, por la acción antagonista de uno o más organismo es una opción ecológica que no ponen en riesgo a la salud de los seres humanos y al ecosistema (Baker y Cook *et al.*, 1983).

CAPITULO II

2.0 Antecedentes

Los hongos patógenos causan enfermedades severas en pre y postcosecha en frutas, vegetales, flores y plantas de ornamentación, que con lleva a enormes pérdidas económicas alrededor del mundo (Ji *et al.*, 2018). Las epidemias que se ocasionan por el género de *Botrytis* son comunes en campos abiertos, huertos e invernaderos. Estas infecciones se favorecen por la humedad y la presencia de una película de agua en los órganos de las plantas y periodos más largos de humedad. El infecta a través de heridas en la superficie de huésped (Aladdin *et al.*, 2018). Los informes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2011) indicaron que la pérdida media de cultivos en Europa, América del Norte y Oceanía es de aproximadamente de 29 % de la producción en comparación con un promedio de aproximadamente al 38 % de pérdida en Asia, sudeste de Asia, África y América Latina (Spadaro y Droby, 2016).

Las diferentes prácticas culturales para el control de *Botrytis cinerea* (moho gris) que permitan la aireación de los cultivos a través de la ventilación y evitar la cosecha en días lluviosos. El control químico es una forma fácil de manejar las enfermedades de los cultivos económicamente importantes que causa *Botrytis* (Fillinger *et al.*, 2017). El uso los bencimidazoles y las dicarboximidias son ampliamente aplicados para el control de moho gris. El uso persistente de fungicidas químicos ha resultado en la generación de cepas resistentes (Ji *et al.*, 2018). En las últimas décadas, la restricción en la aplicación de los fungicidas para reducir el impacto sobre el medio ambiente y la creciente conciencia social y ecológica sobre el impacto negativo del uso extensivo de productos químicos en el

medio ambiente, la salud humana y la salud animal y limitar los residuos de los funguicidas en las cosechas ha mantenido el interés en encontrar una solución alternativa al uso de productos químicos, invitan a la búsqueda de alternativas como el uso del control biológico para la supresión de las enfermedades, con el objetivo de retrasar la evolución de la resistencia en la población de patógenos (Fillinger *et al.*, 2017) se emplea un 90 % por bacterias y 10 % por hongos se sustentan en diversas interacciones, como la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis, el parasitismo y la resistencia sistémica inducida. (Aladdin *et al.*, 2018).

Factores importantes a tener en cuenta para el uso del control biológico son: La optimización del tiempo aplicación, la elección de moléculas o agentes biológicos y promover prácticas agroecológicas que combinen medidas de profilaxis y regulación natural. El término “bioplaguicida” es la aplicación de formulaciones que se basan en extractos de organismos, microorganismos, minerales y compuestos orgánicos que ayudan a la supresión de la infección fúngica, en los últimos años se impulsó el desarrollo de los funguicidas orgánicos. El género de *Trichoderma* agrupa hongos saprofitos que son excelentes modelos para el control de fitopatógenos, e.g. el agente de biocontrol *Trichoderma harzianum* T39, que controla el moho gris en vegetales de invernadero. En el biocontrol de *B. cinerea* en cultivos y plantas de vid se utilizó en su formulación comercial TRICHODEX 25 mediante aplicación foliar (Elad *et al.*, 1993; O'Neill *et al.*, 1996).

CAPITULO III

3.0 Marco teórico

3.1.1 *Botrytis cinerea*

El moho o podredumbre gris es una enfermedad que infecta a más de 200 especies vegetales, ocasiona serias pérdidas económicas antes y después de la cosecha, se describió por primera vez por Plino, en el siglo XVI se describió como el agente causal de la enfermedad del moho gris por el género *Botrytis*, su principal representante es *Botrytis cinerea* (Benito et al., 1999). En tejidos maduros o senescentes de huéspedes dicotiledóneos es destructivo. Generalmente, su ingreso al huésped es por invasión a los tejidos durante el desarrollo temprano y permanecen inactivo durante un período considerable. Cuando las condiciones abióticas son propicias y la fisiología de huésped cambian, el hongo se reactiva y produce la pudrición del huésped (Williamson et al., 2007). El control biológico de *Botrytis cinerea* se limita por la variedad de fuentes de inóculo, puede sobrevivir como micelio y/o conidios o periodos prolongado en forma de esclerocios en los restos de los cultivos. Su latencia produce limitantes para el desarrollo de estrategias de control basadas en los genotipos resistentes en la especie de infección. Por lo que es necesario profundizar en los mecanismos de patogenicidad del hongo y el mecanismo de defensa de la planta para la caracterización de los factores de interacción de planta-patógeno dando herramientas para una adecuada estrategia experimental (Benito et al., 1999). EL patógeno *Botrytis cinerea* es hongo necrótrofo que produce moléculas tóxicas y

enzimas líticas que usa para degradar la pared celular de la planta huésped de la que va alimentarse (Benito 2010).

3.1.2 Taxonomía de *Botrytis cinerea*

Según Williamson *et al.* 2007, *Botrytis cinerea* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera

- ❖ *Reino*: Hongos
- ❖ *Filo*: Ascomycota
- ❖ *Subphylum*: Pezizomycotina
- ❖ *Clase*: Leotiomycetes
- ❖ *Orden*: Helotiales
- ❖ *Familia*: Sclerotiniaceae
- ❖ *Género*: *Botrytis cinerea*

3.1.3 Características morfológicas de *Botrytis cinerea*

El patógeno *B. cinerea* es un hongo filamentoso, que produce colonias blancas que torna a un color gris olivo, formada por micelio hialino, ramificado y septado. Los conidióforos se presentan en forma libre de color gris por la presencia de melanina los cuales se ramifican en sus extremos. Los conidios hialinos, unicelulares ovoides a elipsoidales (10 – 12x 8 – 10 µm). Los esclerocios se constituyen por filamentos de micelio que se entrelazan y poseen una superficie

irregular. La consistencia dura y de color negro, son estructuras de resistencia para proteger el patógeno de condiciones climáticas extremas. (Agrios, 1996; Latorre, 2007).

3.1.4 Dispersión de *Botrytis cinerea*

La infección y la putrefacción del tejido vegetal permite la formación de conidióforos sobre la superficie del tejido vegetal y da lugar a la coloración gris, característica de la enfermedad y una vez que el fitopatógeno *B. cinerea* esporula la dispersión de los conidios inicia (Espinosa, 2006). El método común es mediante la transmisión de conidios en las corrientes de aire. Las distancias que recorren las esporas que se transportan en los invernaderos viajan aproximadamente 1.8 m. Las gotas de lluvia también pueden ser vehículo para la fuente de inóculo y por los insectos al quedar atrapados entre los segmentos, la cutícula y las alas (Blanco et al., 2006). La dispersión se divide en tres fases: 1) La liberación que tiene lugar por la una torsión del conidióforo inducida por el viento o por salpicaduras del agua de lluvia. 2) El viento es el vehículo de transporte y a mayor velocidad del viento la dispersión de conidios aumenta. 3) La deposición depende de la velocidad del viento y de la posición de la fuente del inóculo. 4) la lluvia interviene en la liberación y dispersión de los conidios cuando las gotas de lluvia golpean el tejido vegetal desprendiendo los conidios. por los insectos al quedar atrapados entre los segmentos, la cutícula y alas (Holz et al., 2004).

3.1.5 Reproducción sexual

La mayoría de los hongos del género de *Botrytis* produce numerosos conidios que son asexuales y que nacen en los extremos de conidióforos ramificados. El tamaño de los conidios está relacionado con las especies. En general, los conidios tienen una vida corta, depende de la temperatura, la humedad, la actividad microbiana y la exposición a la luz solar. Los esclerocios son estructuras de

resistencia. La cepa asexual se conoce como *Botrytis cinerea* y el teleomorfo es la cepa de reproducción sexual *Botryotinia funkliana* (Williamson et al. 2007).

3.1.6 Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*

Las esporas de *B. cinerea* infectan cualquier material vegetal al ser transportadas grandes distancias por la corriente de aire, gotas de lluvia que intervienen para la promoción de las estructuras de infección. Las diferentes fases de la interacción fitopatógeno- huésped para facilitar el estudio del ciclo de vida del hongo son las siguientes:

- 1. Adhesión y germinación** de los conidios sobre la superficie del tejido vegetal tiene lugar dos fases (Benito 1999). La primera fase es la hidratación del conidio y se establece interacciones hidrofóbicas entre el huésped y la superficie del conidio. La segunda fase el tubo germinal produce una matriz extra celular que sirve como adhesivo de los conidios y es difícil su eliminación, está compuesta por lípidos, polisacáridos y polipéptidos (Doss et al., 2003; Gil ad et al., 2001).
- 2. Germinación.** La germinación de los conidios está inducida por diferentes factores 1) la disponibilidad de agua en la superficie, así como una humedad relativa alta de > 93 % (Blakman, 1980); 2) la dureza de la superficie; 3) la fuente de carbono orgánico (Doehlmann et al., 2006) 4) la presencia de nutrientes, fosfato y glucosa (Benito et al., 1998) y 5) la producción de etileno por parte de los tejidos senescentes del hospedero o durante la maduración (Prins et al., 2006). La germinación comienza con la hinchazón de los conidios y posterior emisión del tubo germinativo, cuando han transcurrido de 1 a 3 h de la inoculación (Tenberge 2004).
- 3. Penetración.** El hongo penetra al tejido vegetal, a través de daño mecánico, aberturas naturales, la participación directa de las actividades

enzimáticas ocurre por el tubo germinal y se producen estructuras ramificadas que se compactan y forman un pseudotejido (Verhoeff, 1980). El hongo *Botrytis cinerea* segrega sustancias que le ayudan a invadir el tejido. Por ejemplo, la cutícula es la primera barrera en contacto con *B. cinerea*. Durante la penetración, la cutina es el componente estructural de la cutícula, por lo cual, se secretan enzimas que degradan la barrera física (Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997).

El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determina la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y da lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta (Govrin y Levine, 2000). La secreción de metabolitos secundarios como el botrydial que se acumula en la superficie del huésped e induce las machas necróticas, el dihidrobotrydial posee carácter fitotóxico. El fitopatógeno produce ácido oxálico (Gentile, 1954) y forma cristales de oxalato cálcico dentro del tejido del huésped, la concentración en las hojas está relacionada con las lesiones en el tejido vegetal (Kars y van Kan, 2004). La penetración de la cutícula y la formación de lesiones primarias *B. cinerea* es por estallido oxidativo que se induce por las especies reactivas de oxígeno (AOS) que crea un estrés oxidativo que engloba al anión superóxido, el radical y el peróxido de hidrógeno (Rolke *et al.*, 2004)

- 4. Fase de latencia** Los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en la zona de necrosis (Johnston *et al* 1994). Este es capaz de vencer esta barrera de defensa e inicia su diseminación en el tejido vegetal colonizándolo y macerándolo en un breve periodo de tiempo y produce una nueva generación de esporas que puede iniciar un nuevo ciclo de infección

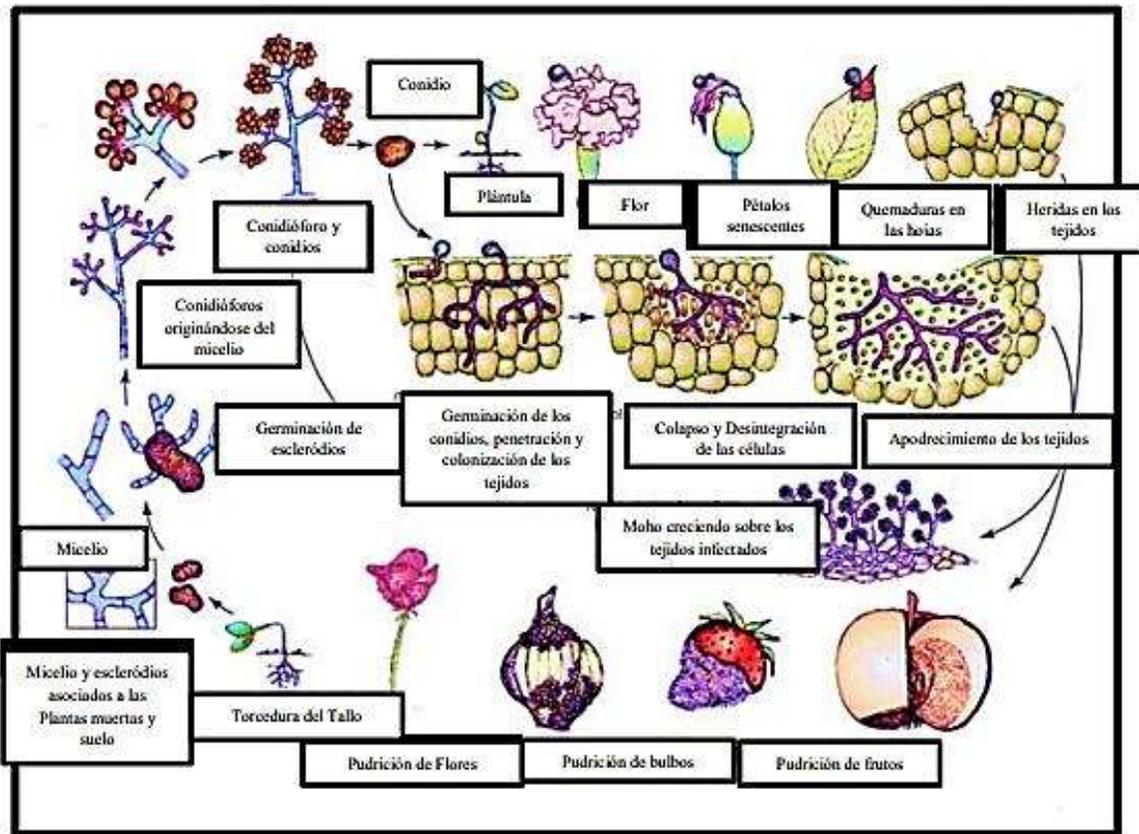


Figura 1 Ciclo de vida de *B. cinerea*

modificado (Agrios, 2005)

3.1.7 Estructuras de infección de *Botrytis cinerea*

El patógeno *B. cinerea* presenta diferentes estructuras de infección. Los conidios como principal forma de inóculo que se adhieren y germinan en la superficie del huésped. El micelio secreta enzimas extracelulares que le facilitan la penetración de las barreras físicas del huésped. Su presencia causa un estallido oxidativo, clorosis y la muerte celular vegetal debido a la producción de metabolitos fúngicos como fitotoxinas inespecíficas de amplio espectro para el huésped, el más conocido es el botrydial que es producido durante la infección de la planta e induce la clorosis y colapso celular lo que permite la penetración y colonización del huésped. Los esclerodios son estructuras de micelio ramificado

3.1.8 Modo de infección de *Botrytis cinerea*

El *B. cinerea* es un patógeno que causa necrosis y está especialmente equipado con enzimas de degradación de los polímeros de la pared celular que le permiten la colonización del tejido vegetal y la liberación de carbohidratos para su consumo. La pectina, es el principal componente de la pared celular de huésped que se degrada por un conjunto de pectinasas fúngicas.



3.1.9 Metabolitos secundarios de *B. cinerea*

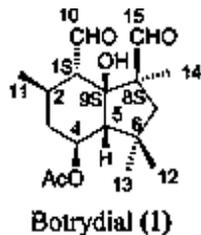
La secuenciación del genoma completo de *B. cinerea* contiene más de 40 grupos de compuestos químicos dedicados a la síntesis de policétidos, terpenos, péptidos y alcaloides, que le ayudan en la competencia con otros organismos o tiene efecto

Figura 2. Infección de *B. cinerea* a *Arabidopsis thaliana*

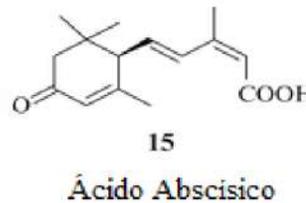
de virulencia en el hospedero. La melanina que da el color típico al moho gris es la

molécula que protege las estructuras de supervivencia (conidios y esclerocios) de los rayos UV. El fitopatógeno produce terpenos que incluyen el ácido abscísico (ABA), botrydial y los policétidos que incluyen el ácido botínico y botrylactone. Los compuestos botrydial y ácido botínico mostraron actividades fitotóxicas inespecíficas que se determinaron como armas químicas que permiten a *B. cinerea* el aniquilamiento de las células de una gran variedad de especies vegetales para alimentarse de sus tejidos muertos. La formación de los diversos metabolitos depende del crecimiento y las condiciones de cultivo. El botrydial se mostró como fitotóxico por Rebordinos 1966 al inocular el compuesto en hojas de tabaco y frijol se observó síntomas cloróticos típicos de moho gris. La toxicidad del botrydial y sus derivados no es específico para

plantas ya que la actividad citotóxica se observó en líneas celulares (Reino et



al., 2003)



para actividad también en humanas

Figura 3. Metabolitos secundarios del fitopatógeno *B. cinerea*

que interviene en el proceso de infección **a)** Botrydial **b)** Ácido abscísico

3.1.10 Descomposición de las paredes celulares vegetales por *B. cinerea*

La mayoría de estos compuestos secretados por *B. cinerea* son (49 %) hidrolasas de glucósidos y es la más abundante que incluye a las poligalacturonasas que se dirigen a las pectinas de la pared celular de las plantas, proteínas con unión a carbohidratos (23 %), esterasas (17 %), las glicosiltransferasas y (8 %) los polisacáridos liasas. Estas proteínas son la principal maquinaria enzimática que utiliza el hongo para penetrar e invadir los tejidos del huésped. La descomposición de la pectina durante la infección por *B. cinerea* aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la degradación de otra clase de polisacáridos de la pared celular y facilitar el acceso de otras enzimas. Las pectinas son el objetivo de la pared celular durante la infección, las enzimas se dirigen a las cadenas principales de la pectina ramnogalactanurasas (RGAES) pectato liasas (PL), metilesterasas (PME) y las ramnogalacturonano esterasas (CE12) degradan las cadenas de principales de la pectina.

3.2 Control Químico

El auge del control químico en las décadas del 60 a 70 del siglo XX, debido al bajo costo con la relación a los beneficios obtenidos, la disponibilidad de los productos, la facilidad de aplicación y la efectividad alcanzada, se basó por años, el uso de químicos como el control de las enfermedades sobre la producción agrícola para la prevención y/o erradicación de enfermedades comúnmente denominadas plaguicidas o agroquímicos aplicados en forma efectiva para el control de patógenos (Vero y Mondino, 2002). La aplicación de fúngicidas El uso indiscriminado del control químico trajo numerosos problemas, entre ellos los peligros a la salud de aplicadores y consumidores, contaminación ambiental y la resistencia de los patógenos a las sustancias químicas (Vero y Mondino, 1999). El uso de plaguicidas afecta al medio ambiente, con la contaminación del aire, suelo y agua potable e inclusive los mantos acuíferos que causa efectos nocivos en flora, fauna y alimentos para el consumo del hombre. Una vez en el suelo los plaguicidas se inmovilizan y migran desde la superficie del suelo hacia capas

inferiores como mantos acuíferos y contaminación del agua. La vida media de los fungicidas del grupo de los bencimidazoles varía de seis meses para el benomyl y hasta nueve meses para el tiabendazol, estos dos productos son tóxicos para las lombrices. El benomyl presenta toxicidad para peces (Nuñez et al., 1998).

3.2.1 Resistencia de los fitopatógenos al control Químico

Los fungicidas inhiben o reducen el desarrollo a través de la actividad directa biológica que bloquea el desarrollo de funciones esenciales sobre el patógeno *in vitro* con actividad fungicida o fungistática y se aplican para prevenir la infección, solo una cantidad reducida de los fungicidas tiene actividad curativa y se dirigen específicamente a uno o múltiples sitios de acción. Los fungicidas modernos son específicos en su modo de acción y blanco celular, por ejemplo; 1) El citoesqueleto que afecta sobre la división celular, la mitosis y la secreción de proteínas (Temperli *et al.*, 1991). 2) Respiración mitocondrial y síntesis de ATP, inhibe al complejo II succinato deshidrogenasa, complejo III Q-citocromo c reductasa y los desacoplantes de la fosforilación oxidativa 3) Biosíntesis de ergosterol inhiben la 3-cetorreductasa del complejo C4-desmetilación 4) Biosíntesis de proteínas o aminoácidos 5) transducción de señal. La generación de cepas resistentes desde la década de los 90 a varios fungicidas como anilopirimidinas, fludioxinil; inhibidores de la respiración, pero también de la biosíntesis de esterol (Mamiev *et al.*, 2013)

3.3 Control Biológico

En el control biológico siempre interviene un tercer elemento vivo (junto con el huésped y el patógeno), que es el antagonista.

El control biológico está compuesto por, el patógeno, el antagonista, el ambiente y huésped. El patógeno puede ser un virus, hongo, bacteria, en conjunto con factores bióticos o abióticos son capaces de alterar el normal funcionamiento y resultar en enfermedad (De Andrés et al., 1998). El control del patógeno se puede aplicar en cualquiera parte de su ciclo de vida; existen diversas estrategias de control, que van dirigidas a la eliminación o reducción de inóculo o la disminución de la enfermedad (Fry, 1982).

En el control de los patógenos vegetales se consideran aspectos de su naturaleza biótropa o necrótropa, su accesibilidad al antagonista, así como el conocimiento de la biología y epidemiología del patógeno al que va dirigido el control biológico.

El antagonista biológico es un agente biológico con potencial para interferir en cualquier proceso vital de los patógenos directa o indirectamente que resulta en la reducción de la expresión de enfermedad. Los organismos pueden ser de todo tipo: hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus, viroides y plantas. Un microorganismo antagonista puede presentar cuatro modos de acción ante un patógeno: competencia por espacio o nutrientes, antibiosis, resistencia inducida en el huésped y lisis enzimática, bien de forma individual o asociada.

El antagonismo es toda acción directa o indirecta ejercida por un microorganismo que resulta en la reducción de la expresión de la enfermedad. El antagonismo biológico es la explotación modificación cuidadosa del equilibrio del ecosistema para el beneficio de la planta.

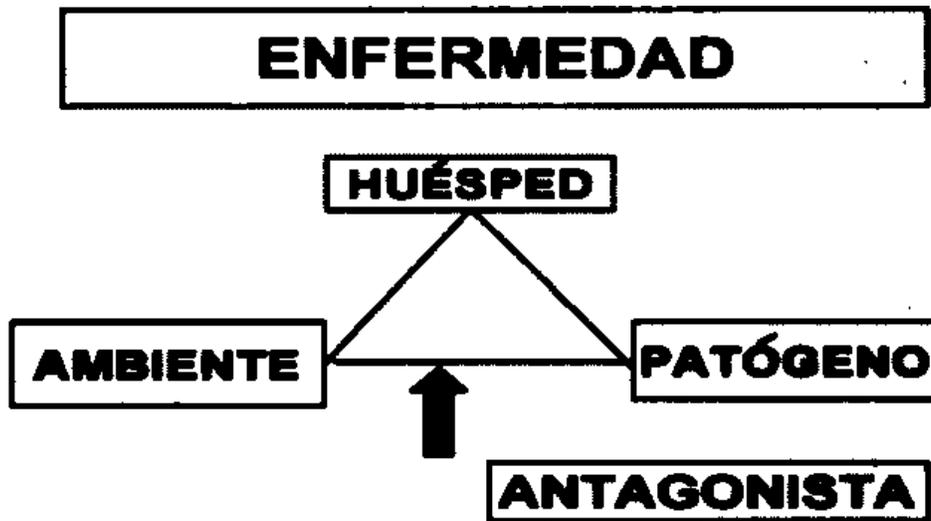


Figura 4. Interacción de los agentes que conforman el control biológico

(jacas *et al.*, 2005)

3.3.1 Modos de acción del Antagonista

Los antagonistas muestran una amplia gama de modos de acción, en diferentes etapas de actividad y en relación con los diferentes huéspedes y patógenos. Los diferentes modos que actúan simultáneamente son difíciles establecer el mecanismo de acción, por lo que es crucial conocer las interacciones entre el medio ambiente, agentes patógenos y agentes de control biológico (Gotor-Vila *et al.*, 2007). Por lo cual, es esencial para mejorar la viabilidad y aumentar su potencial para el control de las enfermedades poscosecha. El comprender el modo de acción puede facilitar el uso comercial y optimizar la formulación, mecanismo de acción, el periodo de aplicación para determinar si tiene un efecto preventivo o curativo (Parafati *et al.*, 2015).

El primer paso para el desarrollo de agentes biológicos es el proceso de asilamiento y selección para las mejores fuentes de microorganismos antagonistas que son de sus entornos naturales con los que compiten con los patógenos de las plantas. El segundo paso es aclarar el mecanismo de acción, así como la comprensión de los sistemas de control biológico representa un punto crucial para conocer las interacciones patógeno-huésped

Un agente de control biológico exitoso generalmente está equipado con varios atributos que trabajan en conjunto y son cruciales para controlar el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, la colonización y la competencia de nutrientes pueden estar relacionada con la capacidad de los agentes de control biológico para adherirse a sitios específicos, incluidos los tejidos del huésped y del patógeno.

Dos tipos de interacciones existen entre los antagonistas y los patógenos: El mecanismo indirecto (competencia por espacio o nutrientes y antibiosis) y el mecanismo directo (parasitosis e inducción a la resistencia) (Droby *et al.*, 2009).

3.3.2 Control biológico indirecto

- ❖ **Competencia por espacio o nutrientes:** Es la lucha de dos o más organismos por conseguir un sustrato que no es suficiente para todos ellos (Baker y Cook, 1983). La competencia es por espacio o/ y nutrientes, principalmente por carbohidratos de poder energético y en ocasiones por nitrógeno, agua y oxígeno. La competencia por espacio sucede cuando el organismo cubre la superficie vegetal y no deja que otro se desarrolle. En este caso es importante la relación de la velocidad de crecimiento del patógeno y del antagonista. Las características del control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo y otros factores externos como el pH, temperatura y humedad (Vero y Mondino, 1999).

- ❖ **Antibiosis:** La inhibición del crecimiento o de las actividades metabólicas de un organismo por la acción de una sustancia producida por otro organismo (Gottlieb y Shaw, 1970). La producción de antibióticos depende de la disponibilidad de nutrientes que posea el medio. Una de las ventajas de la antibiosis es que no es preciso que el patógeno y el antagonista entren en contacto, el antibiótico puede permanecer en el medio incluso tras la muerte del antagonista (Cook y Baker, 1983)

3.3.3 Interacción directa con el patógeno

- ❖ **Parasitismo y lisis enzimática** de un microorganismo a otro y se define como la simbiosis antagonista entre organismos implica un contacto íntimo entre el huésped y el parásito (Vero y Mondino, 2002; Cook y Baker, 1983). El parasitismo es una relación nutricional en la que un organismo (el parásito) obteniendo todo o parte de lo que necesita para vivir de las partes funcionales vivas de otro organismo, el huésped (Dubos, 1978; Jacas *et al.*, 2005) y se implican las enzimas extracelulares quitinasas, celulasas β -1-3- glucanasas y proteasas que lisan y digieren las paredes de los hongos (Melgarejo, 1989; Ulhoa, 1996). El antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno parte del cuerpo del hongo (hifas) y otras fuentes de alimento (Vero y Mondino, 1999).
- ❖ **Inducción a la resistencia** Las plantas desarrollan diferentes mecanismos de defensa ante el ataque de patógenos. Después del reconocimiento del patógeno se activan respuestas que incluyen la expresión de genes asociados a defensa, una de ellas es la Resistencia Sistémica Inducida. Diversos estudios demostraron que esta resistencia es independiente de ácido salicílico (AS), pero requiere la señalización de ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET). El

ácido jasmónico y el etileno transducen los estímulos extracelulares reconocidos por receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco que, en completa coordinación, integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo externo. Este mecanismo, dentro de la planta, puede ser inducido a través de *Bacillus* spp. Existe evidencia de la inducción de mecanismos de resistencia a través de *Bacillus* spp. contra hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos y *Pseudomonas aeruginosa* (Audenaert *et al.* 2001) y *Trichoderma* spp. (De Meyer *et al.*, 1998) (Samaniego *et al.*, 2017).

3.3.4 Características para el desarrollo de antagonistas

En 2009 Droby y colaboradores establecieron características para el desarrollo de agentes de control biológico

- ❖ Genética estable
- ❖ Eficaz a bajas concentraciones
- ❖ No exigente en sus requerimientos de nutrimentales
- ❖ Capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas
- ❖ Económico en la producción en medios de crecimiento económicos
- ❖ Formulación estable para una larga vida útil
- ❖ Fácil aplicación
- ❖ Resistente a los productos químicos que se utilizan en el ambiente de cosecha
- ❖ Compatible con procedimientos de procesos comerciales
- ❖ No es perjudicial para la salud humana

3.3.5 Ventajas del control biológico

- ❖ Poco o ningún efecto colateral
- ❖ Casos raros de resistencia
- ❖ Eliminar por completo o sustancialmente el uso de químicos
- ❖ Relación beneficio/costo muy favorable
- ❖ Evita plagas secundarias
- ❖ Se puede usar como el manejo integrado de plagas

3.3.6 Desventajas del control biológico

- ❖ Ignorancia sobre los principios del método
- ❖ Reducido apoyo económico
- ❖ Escaso personal especializado
- ❖ Poca disponibilidad
- ❖ Problemas de uso con umbrales económicos bajos
- ❖ Dificultada para aplicarlo en complejos de plagas
- ❖ Los agentes de control biológico son susceptibles a los plaguicidas
- ❖ Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual, no provee la supresión inmediata que se obtiene con los insecticidas

- ❖ Los resultados del control biológico no son tan eficaces en el corto plazo como los insecticidas y pueden causar mermas (Summy y French, 1988; Tejada, 1982).

3.3.9 Control biológico con bacterias

Las bacterias se usan con éxito como antagonistas biológicos y tiene efectos positivos en las plantas como promotoras de crecimiento. Desde 1990, los antagonistas bacterianos de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. se han aislado de numerosos lugares incluyendo plantas, suelo, y complemento de suelo, tales como abonos y composta (Kurniawan *et al* 2005). Los miembros de la familia *Bacillus* spp. producen una amplia variedad de compuestos antimicrobianos que se ubican los nichos biológicos. El género de *Bacillus* spp demostró ser prometedores del control biológico por los mecanismos inducción a la resistencia mediada por el ácido jasmónico, las vías de señalización del etileno, el ácido salicílico, la secreción de compuestos orgánicos como lipopéptidos cíclicos (surfaccinas, fergicinas e iturinas) que tiene actividad antifúngica a través de interacciones con las membranas celulares (Kurniawan *et al* 2005, Falardeau *et al* 2013)

3.3.10 Control biológico con Hongos

El desarrollo de hongos para el control biológico de patógenos en el suelo ha recibido interés en los últimos años, por ejemplo, *Trichoderma* spp. es un agente de control biológico efectivo para enfermedades de las plantas, especialmente por patógenos transmitidos por el suelo. Es un hongo que es común en la rizosfera que es interactivo con el suelo, la raíz y ambientes foliares. Reduce el crecimiento o las infecciones causadas por diferentes patógenos por los mecanismos de competencia, antibiosis, micoparasitismo, interacciones de hifas y secreción de enzimas líticas. El hongo *Trichoderma* spp produce antibióticos y toxinas como triteceno y sesquiterpeno, trichodermina, que tiene un efecto directo a lo largo de la hifa del huésped o se enrolla y secreta diferentes enzimas líticas

como quitinasa, glucanasa y pectinasa que actúan en el proceso de micoparasitismo (Pérez *et al* 2016).

Tabla 1 Los hongos que se reportaron como agentes de control biológico de patógenos

Hongo (BCA)	Enfermedad	Nombre comercial	Empresa
<i>Candidaoleophila</i> cepa O	Enfermedades de las frutas de pepita	Nexy	BioNext sprl, EE.UU.
<i>Gliocladium catenulatum</i>	Muchas enfermedades de plantas	Primastop	Kemira, AgroOy, Finlandia
<i>Phlebiopsis</i> (<i>Penophora</i>) <i>giganea</i>	<i>Heterobasidium annosus</i>	Mycoparásites Rotstop	Kemira AgroOy, Finlandia
<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. polysporum</i>	Hongos que causan la marchitez y la descomposición de la madera	BinaT	Bioinnovación, Suecia
<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i>	Trichoderma 2000	Mycontrol (EfA1) Ltd., Israel
<i>T. harzianum</i>	Gran variedad de enfermedades fúngicas	Trichopel	Agrimm Technoogies Ltd., Nueva Zelana
<i>T. harzianum</i>	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sclerotinia</i>	T-22 y T22HB BioTrek, RootShield	BioWorks (TGT Inc) Ginebra, EE. UU.

<i>T. viride</i>	<i>Chondrostereum purpureum</i> y suelo y patógenos foliares	Trichodowels, Trichobject, Trichoseal y otros	Agrimm Technologies Ltd., Nueva Zelanda
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i> y otras enfermedades fúngicas	Trichodex	Makhteshim-Agan, varias empresas europeas, por ejemplo, DeCeuster, Bélgica
<i>Coniothyrium minitans</i>	Especie de <i>Sclerotinia</i>	Contans WG	Prophyta, Alemania
<i>Ampelomyces quisualis</i>	Mildews Powdery	AQ10 biofungicida	Ecogen Inc., EE. UU.
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Penicillium spp.</i> y <i>Botrytis spp.</i>	Rendimiento plus	Anchor Yeast, S. Africa
<i>Candida oleohila</i>	<i>Penicillium spp.</i> y <i>Botrytis spp.</i>	Aspirar	Ecogen Inc. Estados Unidos

4.0 Hipótesis

Los aislados fúngicos tienen actividad antagonista sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea*

5.0 Objetivo general

Determinar la actividad antagonista de aislados fúngicos para *Botrytis cinerea* como posibles agentes del biocontrol

5.1 Objetivos particulares

- 1) Seleccionar los aislados fúngicos con mayor actividad antagonista para biocontrol de *Botrytis cinerea*

- 2) Determinar el mecanismo de antagonismo biológico de los aislados fúngicos

6.0 Justificación

El hongo *Botrytis cinerea* ocupa el segundo lugar en causar pérdidas en pre y postcosecha de frutas, hortalizas y plantas de ornamentación. El control químico es el principal método para la prevención de la enfermedad, pero tiene un efecto negativo en el ambiente y en el consumo humano. Además, el patógeno *B. cinerea* desarrolla resistencia a los fungicidas químicos, por lo cual, una alternativa para el control de plaga del moho gris es el uso de microorganismos antagónicos que reducen la incidencia de la enfermedad por secreción de compuestos antifúngicos

CAPITULO IV

7.0 Materiales y métodos

7.1 Preparación del medio con avena para el crecimiento de *B. cinerea*

El hongo *B. cinerea* se sembró en agar avena, se agregaron 6 gr de avena a 300 mL de agua destilada y se dejó hervir por 5 min, la avena se filtró con un embudo y con papel filtro. Se agregó el agar bacteriológico 4.05 gr y se esterilizó en la autoclave por 15 min a 121 °C. El medio de avena se vació en cajas de Petri 100 mm X 15 mm y se dejaron solidificar en campana de flujo laminar.

Las cajas de Petri se inocularon con un propágulo de 5 mm X 5 mm por caja y se incubaron a 20 ± 3 °C por 10 d con un periodo de 8 h luz y 16 h oscuridad. Las cajas Petri de 10 d de incubación y se envolvieron con papel aluminio hasta la maduración de esporas.

7.2 Identificación del hongo *B. cinerea* por microscopia

El patógeno se identificó por el método preparación en fresco simple. En un portaobjetos se colocó una gota del reactivo Shears y una gota de lactofenol. Una porción de micelio del patógeno *B. cinerea* 20 d de crecimiento y con la presencia de color gris verde olivo como se menciona en la literatura y se cubrió con un cubreobjetos. se utilizó un microscopio se ajustó al campo a 40 X para determinar la morfología.

El patógeno *B. cinerea* se tiñó con una gota de safranina y se observó en el microscopio

Se observó y comparó la morfología del patógeno con la base de datos MICOBANK Las fotos representativas se tomaron con un celular de la marca SAMSUNG Prime

7.3 Lavado de esporas de *B. cinerea*

La maduración de esporas se determina por el cambio de color en el micelio aéreo presentando un color gris o verde olivo y se observó en un estereoscopio.

Las esporas se lavaron con 10 μ L de una solución de Tween 1 % (v/v) en 1 mL agua destilada y se agregó 10 mL de agua destilada a la caja de Petri y con un asa bacteriológica se frotó la caja de Petri para separar las esporas y el sobrenadante se recolectó con micropipeta. El líquido que se recuperó del lavado se depositó en los viales eppendorf y se centrifugó a 7 000 rpm por 15 min.

7.4 Cuantificación de las esporas del fitopatógeno *B. cinerea*

La concentración de espora se determinó mediante el método de cuantificación de células con la cámara de Neubauer y se utilizaron 5 cuadrantes representativos para sacar un promedio de la parte inferior y superior de la cámara. Se colocaron 5 μL de una suspensión de esporas

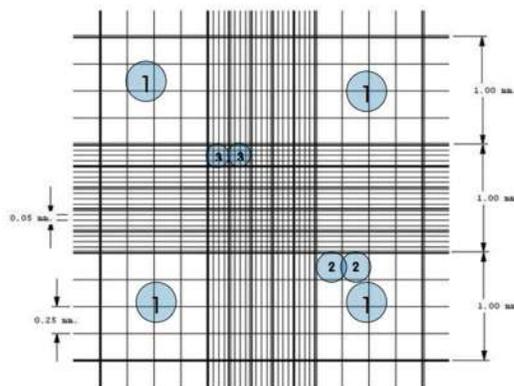


Figura 5 Cámara de Newbaouer

Las esporas se recolectaron en un vial Eppendorf y se re suspendieron en agua estéril desionizada y se ajustaron las concentraciones 1×10^8 esporas/mililitro,

7.5 Crecimiento de los aislados fúngicos

El ensayo de un grupo de 35 aislados fúngicos que proporcionó el Laboratorio de Fisiología celular de Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo. Los aislados fúngicos se sembraron en agar papa dextrosa (PDA), se pesó 39 g de PDA y se disolvieron en 1 L de agua desionizada, se esterilizó a 121°C por 15 min y se vació en cajas de Petri (medidas) se dejaron solidificar en campana. Los aislados fúngicos se inocularon a 25°C y cada 24 h se registró el crecimiento del halo de los aislados fúngicos con ayuda de un vernier hasta que cubrieron la superficie de la caja de Petri. Los aislados se agruparon de acuerdo al crecimiento de la colonia.

9.6 Escrutinio de aislados fúngicos con actividad antagonista para el control de *B. cinerea*

Los aislados fúngicos se sembraron en agar papa dextrosa, 36 g de agar papa dextrosa se disolvió en 1 L de agua tridestilada y se esterilizaron en la autoclave a 121 °C por 15 min a 1.5 atm y se vaciaron en cajas Petri, se dejaron solidificar en campana y posteriormente se inocularon 5 mm de propágulo de 5 diferentes aislados fúngicos en el extremo de la caja de Petri y en el centro al fitopatógeno *B. cinerea*. Las cajas se incubaron en una cámara de incubación con las siguientes condiciones de crecimiento, 20 ± 3 °C con una humedad relativa de 90 % y un fotoperiodo 8 h luz y 16 h oscuridad. El antagonismo se reportó cada 24 h por 7 d y se seleccionaron los aislados con actividad antagonista y asignaron tres grupos de acuerdo con el comportamiento de; a) los aislados sin actividad antagonista y se usaron como sustrato por el patógeno, b) los aislados fúngicos por competencia de nutrientes y espacio por el mecanismo directo y c) los aislados fúngicos con actividad antagonista por el mecanismo indirecto de antibiosis

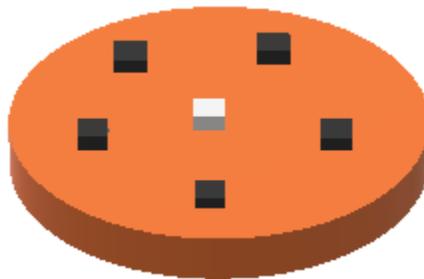


Figura 6 ensayo del escrutinio para a selección de aislados fúngicos con actividad antagonista para *B. cinerea*

Tabla 2 Aislados que se utilizaron en el sayo antagonista

Grupo1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo <i>acutatum</i>	Grupo México	Grupo 4
--------	---------	---------	--------------------------	--------------	---------

1.- <i>Curvilaria</i> <i>sp</i>	9.-H.H. P <i>superior</i>	17.- <i>Diaporthe</i> p. 5185	22.-C. <i>acutatum</i> 5446	26.- <i>Fusarium</i> (FUSAC0901)	34.- <i>Rhizopus</i>
2.- <i>Fusarium</i> <i>sp</i>	10.- <i>Marcelino</i> <i>Córtéz</i>	18.- <i>Diaporthe</i> p. 5446	23.-C. <i>acutatum</i> 10	27.- <i>Fusarium</i> (FUSAC0902)	35.- <i>Colletotrichum sp</i>
3.- <i>Trichoderma</i> <i>sp</i>	11.- <i>Roña</i> <i>de</i> <i>Aguacate</i>	19.- <i>Oligoporus</i> spp.	24.-C. <i>Acutatum</i> 21	28.- <i>Rhizoctonia</i> (RIZOC0901)	36.- <i>Fusarium sp</i>
4.- <i>Pestalotia</i> <i>sp</i>	12.- <i>Roña</i> <i>de</i> <i>aguacate</i>	20.- Phomopsis v. 5120	25.-C. <i>Acutatum</i> 25	29.- <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	37.- <i>Epicocumstomaticum</i> <i>nigrum</i>
5.- <i>Alternaria</i> <i>sp</i>	13.- <i>RB-</i> <i>739736-</i> <i>Azul</i>	21.- <i>Phomopsis</i> v. 5480		30.- <i>Fusarium</i> <i>solani</i>	
6.- <i>Colletotrichum</i> <i>sp</i>	14.- <i>Fusarium</i> <i>sp</i>			31.- <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	
7.- <i>Phoma sp</i>	15.- <i>Raíz de</i> <i>Macadamia</i>			32.- <i>Rhizoctonia</i> <i>binucleada</i>	
8.- <i>Fusarium</i> <i>sp</i>					

7.7 Enfrentamiento *in vitro* de los aislados fúngicos con actividad antagonista contra *B. cinerea*

Los aislados de *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 con actividad antagonista se enfrentaron al patógeno *B. cinerea* en el medio agar papa dextrosa en cajas de Petri. En el extremo de la cada caja se inoculó al patógeno *B. cinerea* y del otro extremo a cada tratamiento. Las cajas de Petri se incubaron a 20 ± 3 °C con una humedad relativa del 90 % con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad, se determinó el crecimiento cada 24 h por 10 d y se registró el crecimiento cada 24 h con ayuda de un vernier. Los experimentos se realizaron por triplicado y como control negativo el patógeno *B. cinerea* y el control positivo *B. cinerea* con el hongo *Trichoderma* sp reportado en la literatura como agente antagonista para la pudrición de moho gris. Los experimentos se ensayaron dos veces por triplicado.

7.8 Sinergia de los aislados fúngicos contra *B. cinerea*

El patógeno *B. cinerea* se sembró en centro de la caja de Petri que contenía PDA y los aislados fúngicos *Fusarium* spp., *Pestalotia* spp., *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 se sembraron alrededor del patógeno y se incubó a 20 ± 3 °C con una humedad relativa del 90 % con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad por 3 d. El crecimiento se determinó con el programa Image –J Acceso directo.

7.9 Medio acondicionado con los aislados fúngicos con actividad antagonista sobre *B. cinerea*

El acondicionamiento del medio PDA se utilizó *Fusarium* spp., *Pestalotia* spp., *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 en cajas Petri. El papel celofán se recortó en círculos del tamaño de las cajas de Petri y se esterilizaron en la autoclave a 121 °C por 15 min a 1.5 atm. El papel celofán se colocó sobre PDA

y se inocularon con 5 mm de cada aislados fúngicos por caja de Petri y se incubaron a 20 ± 3 °C con una humedad relativa del 90 % con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad, después de 10 d se retiró el papel celofán con los aislados fúngicos: Los medios que se acondicionaron se inocularon propágulos de 5 mm del patógeno *B. cinerea*. También, se realizó un experimento con una suspensión de esporas de 1×10^5 , se inocularon 10 μ L en los tratamientos y se determinó el crecimiento al medir el halo de del (mm) con ayuda de un vernier cada 24 h por 5 d. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.10 Efecto aditivo de los aislados fúngicos con actividad antagonista sobre *Botrytis cinerea*

Para la preparación del medio se preparó 11,70 g de APD y se disolvió en 300 mL de agua desionizada y se vació en cajas Petri. Los círculos se recortaron de papel celofán del tamaño de las cajas de Petri y se esterilizaron en la autoclave a 121 °C por 15 min a 1.5 atm. Los círculos de papel celofán se colocaron sobre el agar PDA, después se inocularon las cuatro cepas seleccionadas con actividad antagonista y se incubaron por 7 d a 20 ± 3 °C con una humedad relativa del 90 %. El papel celofán con los aislados fúngicos se retiró y se inoculó un propágulo de 5 mm del patógeno *B. cinerea* se incubó a 20 ± 3 °C con una humedad relativa del 90 % y se determinó el crecimiento cada 24 h por 5 d y se reportó el crecimiento. El control negativo es el patógeno *B. cinera* y el control positivo es el medio acondicionado con *Trichoderma* Spp.

7.11 Efecto antagonista de los compuestos orgánicos volátiles (CO´s) de los aislados fúngicos

Los compuestos orgánicos volátiles (COV´s) se evaluaron. Se preparó PDA y se vació en cajas divididas, se dejó solidificar. Los aislados se inocularon en un lado

de caja y de la otra parte el patógeno *B. cinerea*, se incubaron las cajas de Petri a 20 ± 3 °C con una humedad relativa del 90 % por 5 d con un periodo de 8 h de luz y 16 de oscuridad. El crecimiento se determinó del patógeno cada 24 h por 5 d. Los controles fueron *B. cinerea* y *B. cinerea* con *Trichoderma* se realizaron los experimentos dos veces por triplicado.

También, se realizó un experimento con una suspensión de esporas de 1×10^5 , se inocularon 10 µL en los tratamientos

8.0 Discusión

El fitopatógeno *Botrytis cinerea* se observó que las condiciones óptimas de incubación para el crecimiento del hongo y la producción de esporas se ensayaron diferentes temperaturas reportadas en la literatura de 4, 8, 17, 22 a 25 °C con una humedad de 90 % y en los medios agar papa dextrosa y agar avena. Las condiciones del crecimiento viables para el cultivo del fitopatógeno son a 22 °C con una humedad de 90 % y en medio agar avena es el medio nutritivo que aporta

el sustrato para un rendimiento de la producción de esporas y en el medio agar papa dextrosa en el hongo para la producción de estructuras de reproducción sexual no fue más viable.

La morfología del hongo *B. cinerea* se determinó cada 24 h al observar la forma del crecimiento colonial como, la presencia de color, micelio aéreo y si existía secreción de exudado. Colonias circulares con presencia de micelio aéreo blanco que se observaron en el agar avena a diferencia del agar APD donde observamos una disminución del micelio aéreo. El color gris característico de la maduración de espora después de 10 d incubación en oscuridad al compararlo con cultivos que se mantuvieron en condiciones ambientales. La morfología celular microscópica se observó al realizar una preparación en fresco y una tinción con safranina. La estructura morfológica del hongo se observó hifas septadas y ramificadas con presencia de melanina en las paredes y los conidios en sus ápices con las esporas en forma ovoide de color gris y se comparó con la descrita en la literatura (Williamson et al., 2007; MYCONBANK).

Los estudios para generar un ACB con estos aislados abren la posibilidad del estudio de otros hongos con actividad antagonista y que se reportan como agentes patógenos para algunos cultivos y pueden tener actividad antagonista para el control de otros fitopatógenos que causan pérdidas. Los aislados de los de diferentes especies como; (1) *Alternaria sp.*, (1) *Curvularia sp.*, (6) *Colletotrichum spp.*, (2) *Diaporthe Phaseolorum spp.*, (1) *Epicoccum nigrum*, (7) *Fusarium spp.*, (1) *Oligoporus sp.*, (1) *Pestalotia sp.*, (1) *Phoma sp.*, (2) *Phomopsis viticola spp.*, (1) *Trichoderma spp.*, (3) *Rhizoctonia spp.* y (1) *Rhizopus sp.* por la secreción de compuestos orgánicos aislados fúngicos por lo cual se realizó un ensayo de acuerdo a la función relación tiempo-crecimiento en la cual se crecieron agar papa dextrosa y que la condición de temperatura de crecimiento de 22 °C y se determinó el crecimiento como en el caso de *Trichoderma sp.* y *Rhizopus sp.* se clasificaron en crecimiento rápido que cubrieron la superficie de la caja en menos de 72 h. Los aislados con crecimiento intermedio *H.H.P Superior* y *Fusarium (fusac0991)* presentaron un crecimiento de micelio vegetativo en los primeros días

y posterior a micelio aéreo lo cual da lugar a formación de estructuras sexuales. Los aislados con un crecimiento lento son aquellos hongos con una morfología que presentaron micelio vegetativo y un cambio de color. La población de 35 aislados fúngicos conformó el 6 % de crecimiento rápido a diferencia de los aislados con un crecimiento lento que lo integra el 50 % y los aislados fúngicos con un 44 %. Factores como temperatura, humedad relativa y luz tienen un efecto sobre la degradación de sustrato, así como, la producción de compuestos secundarios que pueden tener utilidad para el control de enfermedades pre y poscosecha.

La selección de los aislados fúngicos antagonicos se determinó al enfrentarlos contra el fitopatógeno *B. cinerea* en agar PD, por lo cual se dividió en tres grupos que describen la interacción aislado fúngico-patógeno **a)** Los aislados que no presentaron actividad inhibitoria contra el patógeno *B. cinerea*, se observó que el fitopatógeno después de algunos días, uso de sustrato a estos aislados al cubrir y degradarlos esto se debe a la secreción de enzimas líticas que degradan la pared de los posibles aislados fúngicos que secreta *B. cinerea* como cutinas, β -glucosidasas, la β -1,3-glucanosiltransferasa que degradan las paredes celular. (23. El grupo **b)** Los aislados que compartieron el nicho biológico con el hongo se observó que tenían una interacción con *B. cinerea*, pero a diferencia del grupo "A" los aislados fúngicos no disminuyeron el diámetro colonial, por lo cual, determinamos que el mecanismo de acción de este grupo es por competencia de espacio y nutrientes. El grupo **C)** se observó que el patógeno *B. cinerea* detenía su crecimiento y evitaba el contacto con los aislados fúngicos; *Fusarium spp.*, *Pestalotia sp.*, *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 a diferencia del control negativo que consta solo del patógeno *B. cinerea* que cubrió la caja de Petri y se determinó la actividad para el control de *B. cinerea* con el control *B. cinerea* y *Trichoderma sp.* previamente reportado como un Agente de Control Biológico (ACB) (Vinale et al., 2009). Por lo cual, los aislados seleccionados con actividad antagonista se enfrentaron *in vitro* al patógeno en agar PD. En el 7° día se observó que el patógeno detuvo su crecimiento y al compararlo con el control negativo donde los ensayos de antagonismo se observó que el crecimiento del

hongo era más lento respecto al control negativo que cubrió la superficie del agar PD y el control positivo *Trichoderma* sp. y *B. cinerea*; se observó que *Trichoderma* y la interacción con *B. cinerea* en los primeras 72 h se formó un halo de *B. cinerea* a *Trichoderma* esto se puede deberse a la secreción de metabolitos secundarios como 6-pentil- α -pirona (6PAP) que tiene actividad antibiótica por lo cual creemos que los ; *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 secretan compuestos que inhiben a *B. cinerea*. Los aislados que seleccionamos y que se enfrentaron con *B. cinerea*. Los aislados *Diaporthe phaseolorum* y *Phomopsis viticola* presentan una inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* y se observó que el patógeno detenía el crecimiento y formó un halo respecto a los aislados *Diaporthe phaseolorum* 4461 y *Phomopsis viticola*. Los aislados *Fusarium* spp. y *Pestalotia* sp. cuando se enfrentaron a *B. cinerea*, el fitopatógeno disminuyó su crecimiento drásticamente y creó un halo de resistencia por lo cual determinemos que estos cuatro aislados tiene una actividad antagonista por metabolitos secundarios difusibles en medio sólido, la presencia de micelio aéreo se vio reducido con respecto al control negativo que es *Botrytis cinerea* por lo cual podemos comparar nuestros resultados con el experimento que se ensayó con el control negativo y el control positivo donde *Trichoderma* secreta una gran cantidad de metabolitos secundarios que ayuda al control de la infección (Reino et al., 2008).

El fitopatógeno *B. cinerea* se enfrentó a los cuatro aislados con actividad antagonista; *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe* y *Phomopsis viticola* 5120 por la producción de compuesto antibióticos limitó el nicho biológico de *B. cinerea* su crecimiento se redujo drásticamente para evitar el contacto con los aislados fúngicos. El control negativo *B. cinerea* que cubrió la superficie de la caja de Petri y con un crecimiento del 65.2 mm sobre la caja a diferencia del tratamiento con los aislados donde su crecimiento 5.7 mm se observa que el hongo *B. cinerea* inhibe su crecimiento en la presencia de los 4 aislados fúngicos.

En el medio que se acondicionó con los cuatro aislados fúngicos para determinar la actividad sinergia de *B. cinerea* se inocularon 5 propágulos de 5 mm se observa

que el patógeno *B. cinerea* no creció sobre el medio al comprar los resultados con el control que cubrió la superficie de la caja se observa que el patógeno creció sobre el tratamiento con los cuatro aislados fúngicos lo cual corrobora que los aislados fúngicos secretan compuestos orgánicos en medio difusible que antagonizan a *B. cinerea* se reportan diferentes microorganismos con actividad antagonista en medio sólido *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp (Kurniawan et al., 2018).

En el ensayo de la suspensión de *B. cinera* para determinar la inhibición del tubo germinal de las esporas del patógeno, los aislados no presentaron actividad antagonista para inhibir la germinación. Los aislados fúngicos *Fusarium* spp. y *Pestalotia* sp. redujeron la presencia del micelio aéreo en el patógeno

Los hongos producen una gran cantidad de compuesto orgánicos volátiles (Miyazawa et al., 2008), por lo cual se evaluaron las cepas *Fusarium* spp. *Pestalotia* sp., *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 se enfrentaron a *B. cinera*. Los aislados con una actividad inhibitoria por la producción de compuestos orgánicos volátiles con actividad antagonista son *Fusarium* spp. y *Pestalotia* sp. que se enfrentaron en cajas divididas y se observa que *B. cinerea* se disminuyó su crecimiento colonial y la presencia de micelio aéreo así como la formación de esporas y con una menor tamaño radial de la colonia comprado respecto al control negativo que presentó un mayor crecimiento sobre el nicho biológico, así como la formación de micelio aéreo y observamos que ejerce una actividad similar a *Trichoderma atroviride* (Howell, 2003) al compararlo resultados, estudios anteriores se reporta como ACB por medio de COV's *Candida intermedia* (Huang et al., 2011), *Sporidiobolus pararoseus* (Huang et al., 2012) y *Aureobasidium pullulans* (Di Francesco et al., 2015) que interviene en la formación de . Los aislados *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 al enfrentarse al hongo para determinar COV's no se observó ningún cambio en la morfología de *B. cinera* en presencia de los aislados con respecto al control negativo, es igual lo que esto sugiere que los aislados *Diaporthe*

phaseolorum 5446 y *Phomopsis viticola* 5120 solo tiene actividad antagónica por compuestos orgánicos en medio difusible.

La variación entre la especie que se usaron en el ensayo para el escrutinio demuestra que alguno de estos hongos patógenos con actividad antagonista puede controlar a *B. cinerea* por lo que creemos que el estudio de estos hongos abre una posibilidad para la búsqueda de compuestos orgánicos de los aislados fúngicos fitopatógeno con una actividad antagonista de los siete aislados fúngicos de gener *Fusarium spp.*, (2) *Diaporthe phaseolorum* y *Phomopsis viticola* solo una cepa con los nombres de control *Fusarium café* y *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5121 los aislados fúngicos con la secreción de compuesto orgánicos se pueden contralar a *B. cinerea* deber a condiciones bióticas (luz, temperatura, humedad, pH y fuentes de carbono) que pueden favorecer a la producción de compuestos químicos o pueden afectar y reducir la variabilidad enzimática de los aislados, la búsqueda de la condiciones óptimas para cada organismo son esenciales para nuevas alternativas

9.0 Conclusión

Los aislados fúngicos *Fusarium spp*, *Pestalotia spp*, dos hongos no tipificados *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5180 antagonizaron al

fitopatógeno *B. cinerea* al secretar compuestos orgánicos en medio sólido por el mecanismo de antibiosis, los aislados *Fusarium* spp. y *Pestalotia* spp. tuvieron actividad inhibitoria al reducir la formación de micelio aéreo por lo cual reduce la formación de conidióforos y la esporulación

El fitopatógeno *B. cinerea* se enfrentó a los cuatro aislados con actividad antagonista; *Fusarium* spp., *Pestalotia* sp., *Diaporthe phaseolorum* 5446 y *Phomopsis viticola* 5120

9 Bibliografías

Abas F.Z., Zulkifli S.E., Sulong R.S.R., Zakaria Z.A. (2018) Introduction.
In: Zakaria Z. (eds) Sustainable Technologies for the Management of Agricultural

Wastes. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Springer, Singapore

AGRIOS, G. (2005). *Fitopatología*. 6ª ed. México. Limusa S.A. de C.V. 838 p.

Aladdin A., Dib JR, Malek R.A, El Enshasy HA (2018). Killer Yeast, un nuevo control biológico de enfermedades transmitidas por el suelo para una buena práctica agrícola. En: Zakaria Z. (eds) *Tecnologías Sostenibles para el Manejo de Residuos Agropecuarios*. Ciencia e Ingeniería Ambiental Aplicada para un Futuro Sostenible. Springer, Singapur

Gotor-Vila A., Teixidó, A N., Di Francesco J., Usall L. y Ugolini R. Torres, Mari M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*. 64. pag 219-225

Benito Ernesto P., Arranz M. y Eslava A.P. (1999). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*

Benito Pescador D. (2010). Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce in planta en la interacción *B. cinerea* y tomate. Centro Hispano de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. España

Benito, E. P., A., t. H., van`t Klooster, J. M. y L, v. K. J. A. (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104, 207-220

Bencheqroun, S. K., Bajji, M., Massart, S., Labhilili, M., Jaafari, S., & Jijakli, H. (2007). *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology*, 46:128–135.

Blakeman, J. P. (1980). Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. *The Biology of Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R.

Blanco, C., de Santos, B., Romero, F. (2006). Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey Mould in strawberry flowers and fruits. *Eur J Plant Pathol* 114: 415.

Doss, R. P., Deisenhofer, J. & von Nidda, H.-A., K. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63: 687-691

Doehlemann, G., Berndt, P. & Hahn, M. (2006). Different signalling pathways involving a G α protein, cAMO and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology*, 59: 821-835.

Droby S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 56, Pag 137-145

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. (1998) Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* (1998) 104: 279 - 286

Espinosa, M. (2006). Estudios de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral Universidad de Cadis, España.

Espino J.J, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N. (2010). The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10: paginas 3020–3034

Fillinger S., Elad Y (2017). *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer

Gabriel Sanhueza Del Valle (2012). Determinación de resistencia de diez aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., obtenidos de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), a cinco fungicidas. Tesis

Gil-ad, N. L., Bar-Nun, N. & Mayer, A. M. (2001). *The possible function of the glucan sheath of Botrytis cinerea: effects on the distribution of enzymes activities.* FEMS Microbiology Letters 199, 109-113.

Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.

H. Greenfield, (2003). Southgate DA Food composition data: *production, management, and use.* Food & Agriculture Organization of the United Nations, Roma.

HG hen y YHP Zhang (2015). New biorefineries and sustainable agriculture: increased food, biofuels, and ecosystem security. *Renew Sust Energ Rev* 47:117–132 Volume 47, July 2015, Pages 117-13

Holz, G. (1999). Behaviour and infection pathways of diverse fungal pathogens on fruit. In: Conference Handbook, 12th Biennial Australasian Plant Pathology

Society Conference, Canberra, Australia, 257.

Eckert J.W. (1990). Desarrollo reciente en el control químico de enfermedades postcosecha. *Acta Horticulturae.*, 269: 477–494.

Jacas J, Caballero P y Avilla J (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades.* Publicación de la Universitat Juame recuperado de

Librito .- Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology.* 133: 181–196

Latorre, B. (2007). Pudrición gris (*Botrytis cinerea*), un factor limitante de la producción de uva de mesa en Chile. *Journal Fitopatologia* 42(1):09-20.

después de la cosecha

Parafati L., Vitale A., Restuccia C. y Cirvilleri G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 47: 85-92.

Melgarejo P, De cal, A y Sagasta, E.M. (1989). Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture *Canadian Journal of Botany*. 67: 83-87

Nunes, CA Eur J Plant Pathol (2012). 133: 181.
<https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7> 25 de octubre 2018

Nuñez, S.García R, PAullier P Pagani C y Maeso D (1998). Guía para el manejo integrado de plagas y enfermedades de frutos, INIA, Las brujas, 66

Saikia D (2011). Tendencias en las interrelaciones entre la agricultura y la industria en la India: escenario anterior y posterior a la reforma. En: Saikia D (ed) La economía india después de la liberalización: desempeño y desafíos. Publicación SSDN: 122–173

Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, C.A.M., Williamson, B. and Van Kan, J.A.L. (2002). Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*. 3: 227–238.

Samaniego-Gómez B.Y., Reyes-Ramírez A., Moreno-Valenzuela O.A., Tun-Suárez J.M (2017). Induced systemic resistance against plant viruses elicited by inoculation with rhizobacteria *Bacillus* spp. *Protección Vegetal*, vol.32

T. Gomiero (2017). Agriculture and degrowth: state of the art and assessment of organic and biotech-based agriculture from a degrowth perspective. *J Clean Prod* 197: 2018 ,1823-1839

Temperli E., Roos Urs-P y R. H., Hans (1991). Germ tube growth and the microtubule cytoskeleton in *Phytophthora infestans*: Effects of antagonists of hyphal growth, microtubule inhibitors, and ionophores. *Mycological Research*. 95: 611-617

Tejada L. O. (1981). Apuntes del control biológico. ITESM. L. A Rodríguez del Bosque y R. Alatorre (eds), paginas 43- 46

Tenberge, K.B. (2004). Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and And.Delen, N., eds), 67–84. Dordrecht, The

Rockström, J., Williams, J., Daily, G. et al. Ambio (2017) 46: 4.
<https://doi.org/10.1007/s13280-016-0793-6> 25 de octubre 2018

Williamson, B.; Tudzinski, B.; Tudzinski, P. y Van Kan J.A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8(5):561-580.

Droby S., Wisniewski M., Macarisin D., Wilson C, (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145

Steffen W. (2018). The trajectory of the Anthropocene: The Great Acceleratio <https://doi.org/10.1177/2053019614564785> 25 Octubre

Summy,K. R., French, J. V (1988). Biological control of agricultural pest. Concepts every producer should understand, J. Rio Grande valley Hort. Soc 41: 119 - 133.

Pérez MF, Contreras L, Garnica NM, Fernández-Zenoff MV, Farías ME, Sepulveda M. (2016). Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in Lemons.

Kurniawan O., Wilson K., Mohamed R. y Avis T.J. (2018). *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. *Biological Control*, vol 126: 136 a 14

Dedicatoria

A mis padres:

Miguel Ángel Maya Cruz

Ma. Martha Alavez Quintero

“La esperanza te da la fuerza para seguir adelante cuando sientes que ya na importa.

Nunca dejes de creer en ti... Mientras creas que puedes lograrlo, tendrás un motivo para intentarlo. No dejes que nadie retenga tu felicidad en sus manos; sujétala en la tuyas, para que siempre este cerca de ti.

No midas el éxito ni el fracaso por los bienes materiales sino cómo te sientes; nuestros sentimientos determinan la riqueza de nuestras vidas, no dejes que los malos momentos te agobien; ten paciencia y todos pasarán. Nunca dudes en buscar ayuda; todos la necesitamos de vez en cuando. No huyas del amor sino ve hacia el amor, porque es nuestra más profunda alegría.

No esperes que lo que deseas venga así a ti; búscalo con toda tú alama. Sabiendo que la vida te encontrara a la mitad del camino. No sientas que has perdido cuando tus planes y sueños no alcanzan a cumplir tus anhelos. Cada vez que aprendes algo nuevo sobre ti o sobre la vida, has avanzado. No hagas que disminuya tu propio respeto. El estar satisfecho con uno mismo esencial para estar satisfecho con la vida. Nunca olvides de reír ni dejes que el orgullo te impida llorar. Cuando reímos y lloramos es cuando vivimos en plenitud”.

Nancye sims

Dejar de luchar es comenzar a morir

Agradecimientos

A Dios por siempre estar presente en mi vida por cuidarme en todos momentos por estar cuando lo necesitaba

A mis papás por su apoyo incondicional desde pequeño guían mis pasos por siempre estar a mi lado y darme amor incondicional por ser mis pilares y mi más grande amor.

A mis hermanos (Deyrli, Miguel y Abisai), sobrinos y cuñados por su apoyo en cada momento por hacer una persona fuerte cuando estoy débil por siempre mi familia es parte de mi porque llevo algo de cada uno de ustedes.

Al D.C Mauro por sus enseñanzas ya que el conocimiento viene envuelto de humildad y paciencia.

Al M.C Alberto por siempre animarme y ayudarme.

A mis amigos por siempre alentarme en cada momento de desánimo y por todos los buenos momentos

