

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS  
DE HIDALGO**

**ESC. DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGIA**

TESIS

“DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y GENERACIÓN DE CEPAS  
RESISTENTES DE *Trichoderma* A FUNGICIDAS COMERCIALES”.

NOMBRE DEL ALUMNO:

**DALIA RUBÍ HERNÁNDEZ PALACIOS.**

NOMBRE DEL ASESOR:

**D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS.**

MORELIA MICH., OCTUBRE DEL 2006.

## INDICE GENERAL

	Páginas.
<b>Resumen.</b> .....	<b>1</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1 Control biológico.....	3
1.2 Control químico.....	5
1.3 <i>Trichoderma</i> . ....	8
<b>2. Objetivos.</b> .....	<b>13</b>
2.1 Objetivo general.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>3. Materiales y métodos.</b> .....	<b>14</b>
3.1 Microorganismos.....	14
3.2 Medios de cultivo.....	14
3.3 Fungicidas.....	14
3.4 Preparación de medios de cultivo.....	14
3.5 Preparación de concentrados de esporas.....	15
3.6 Ensayo de sensibilidad a fungicidas.....	16
3.7 Ensayo de entrenamiento a Previcur.....	16
3.8 Conteo de UFC.....	16
3.9 Sensibilidad en suelo.....	17
<b>4. Resultados.</b> .....	<b>18</b>
4.1 Sensibilidad a fungicidas.....	18
4.2 Ensayo de sensibilidad en suelo de la cepa de <i>T. virens</i> 29.8.....	26

4.2.1 Ensayo de sensibilidad en suelo de la cepa de <i>T. virens</i> TVK1.....	27
4.3 Ensayo de entrenamiento a Previcur.....	29
5. Discusión.....	34
6. Conclusiones.....	38
7. Referencias bibliograficas.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas.
4.1 Imágenes del ensayo de sensibilidad a fungicidas.....	19
4.2 Velocidad de crecimiento de <i>T. virens</i> 29.8 en función a fungicidas utilizando micelio .....	20
4.3 Velocidad de crecimiento de <i>T. virens</i> TVK1 en función a fungicidas utilizando micelio .....	21
4.4 Velocidad de crecimiento de <i>T. atroviride</i> IMI en función a fungicidas utilizando micelio.....	22
4.5 Velocidad de crecimiento de <i>T. virens</i> 29.8 en función a fungicidas utilizando una suspensión de esporas .....	23
4.6 Velocidad de crecimiento de <i>T. virens</i> TVK1 en función a fungicidas utilizando una suspensión de esporas .....	24
4.7 Velocidad de crecimiento de <i>T. atroviride</i> IMI en función a fungicidas utilizando una suspensión de esporas .....	25
4.8 Resultado de las UFC en suelo después de 45 días de inoculación .....	26
4.9 Resultados de las UFC en suelo después de 17 días de inoculación.....	27
4.10 Imágenes de sensibilidad en suelo agregando un sustrato .....	28
4.11 Imágenes de la prueba de sensibilidad de <i>T. virens</i> TVK1 entrenada.....	30
4.12 Comparación de la prueba de sensibilidad a Previcur de TVK1 parental y TVK1 entrenada.....	31
4.13 Comparación de la prueba de sensibilidad a Captan de TVK1 parental y TVK1 entrenada.....	31
4.14 Comparación de la velocidad de crecimiento de TVK1 parental y TVK1 entrenada utilizando micelio.....	32
4.15 Comparación de la velocidad de crecimiento de TVK1 parental y TVK1 entrenada utilizando una suspensión de esporas.....	33

## RESUMEN

El biocontrol actualmente ocupa un lugar muy importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo. Las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades en este sentido como hiperparásitos competitivos, su actividad resulta de una combinación de micoparasitismo y producción de metabolitos antagonistas de otros organismos. Sin embargo el tratamiento con *Trichoderma* no ha sido tan eficiente como lo es el uso de algunos fungicidas comerciales, por ello se ha propuesto el uso de un agente de control biológico en combinación con un fungicida, estrategia conocida como control integrado. El control integrado tiene varias ventajas debido a los dos tipos de control que lo conforman, uno de ellos es que reduce la cantidad de plaguicida utilizado y por otro lado la actividad del biocontrolador permanece. En este trabajo se reporta la sensibilidad de dos especies de *Trichoderma* (*T.virens* y *T. atroviride*) y de una mutante (*T. virens TVK1*) a los efectos de tres fungicidas comerciales para el desarrollo de un control integrado. Los resultados mostraron que las especies de *Trichoderma* fueron mas sensibles a Previcur cuando se inocula micelio y mas sensibles a Captan cuando se inoculo una suspensión de esporas. A partir de estos resultados se determino el fungicida y la concentración para generar cepas entrenadas de *T. virens* TVK1. El ensayo de entrenamiento a Previcur mostró que *Trichoderma* TVK1, aumento el doble de su velocidad de crecimiento en Previcur y Captan, demostrando la existencia de una resistencia compartida.

## JUSTIFICACION

Hoy en día existe una gran preocupación por el uso excesivo de fungicidas para el control de hongos fitopatógenos debido a los efectos adversos que se generan sobre el medio ambiente incluyendo al ser humano. El uso de especies de *Trichoderma* como agentes de control biológico representa una alternativa para erradicar a los agentes causales de enfermedades en plantas. Los mecanismos asociados al biocontrol de las especies de *Trichoderma* son: competencia por nutrientes, antibiosis y micoparasitismo. Sin embargo el uso de agentes de biocontrol no ha sido tan efectivo como lo es el uso de algunos fungicidas, esto se debe a que *Trichoderma* solo actúa sobre hongos que infectan la raíz de las plantas y tiene un efecto nulo sobre aquellos que infectan la parte aérea de la planta. El presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar la sensibilidad de dos de las especies de *Trichoderma* estudiadas a tres fungicidas de uso común. Así mismo, establecer la metodología para la generación de cepas resistentes a alguno de los fungicidas seleccionados con miras a su aplicación en una estrategia combinada de control y con dar una mejor protección a la planta.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### **1.1 Control biológico.**

La agricultura es una de las actividades económicas más importantes en los países en vías de desarrollo. Uno de los problemas más grandes que enfrenta la agricultura en México desde hace mucho tiempo está relacionado con el ataque de los cultivos por plagas, enfermedades provocadas por diversos organismos (1). Las enfermedades de plantas tienen un papel directo en la limitación de recursos naturales que repercute con pérdidas anuales del 15 al 20% de la producción agrícola. Durante mucho tiempo se han utilizado agentes químicos para el control de patógenos de plantas, los cuales han logrado el control y estabilización de la producción agrícola. Sin embargo, la utilización de estos agentes químicos ha provocado serios problemas ecológicos. El uso de plaguicidas y fungicidas ocasiona serios daños a humanos, animales y plantas, saturan las tierras cultivables, se infiltran y contaminan los mantos acuíferos naturales modificando así los ecosistemas (1). Una alternativa es la aplicación del control biológico. El control biológico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro (2). La aplicación de agentes de control biológico para controlar fitopatógenos presentes en el suelo es una alternativa promisoriosa al uso de sustancias químicas, es decir el control biológico clásico, cuando es efectivo, es un método con grandes ventajas, ya que elimina el uso de pesticidas y si el agente biológico introducido se establece adecuadamente, el control es durable y se abaten inversiones posteriores, en este aspecto difiere del uso de pesticidas, el cual requiere aplicaciones repetidas (2).

En un sistema de control biológico existen dos tipos de estrategias que pueden aplicarse para contrarrestar a un fitopatógeno: directas e indirectas. Dentro de las estrategias indirectas se encuentra el uso del suelo orgánico que favorece la actividad antagónica contra un patógeno específico. El control directo o clásico se refiere en términos muy simples a la introducción de un organismo antagonista al suelo o a la planta con el fin de reducir la incidencia de la enfermedad (3). La especie seleccionada es generalmente un predador o parásito del agente causal de la enfermedad, que tienen que proliferar y establecer un nicho ecológico apropiado para poder ser activos contra el patógeno,

interfiriendo en su desarrollo o sobrevivencia. Otra alternativa es la protección cruzada, la cual involucra la estimulación de mecanismos de defensa de la planta contra un patógeno en particular, pre-inoculando la planta con una cepa no virulenta (2). El control biológico es un fenómeno común en la naturaleza, de hecho se cree que muchos de los patógenos de plantas son mantenidos bajo control por diferentes antagonistas de manera permanente en el ambiente, y es precisamente cuando se rompe este equilibrio que se origina la enfermedad (4). El control biológico actualmente ocupa un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas por los patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* entre otros (5). En la tabla 3 se muestran algunos agentes de control biológico fúngicos utilizados comercialmente.

El control biológico puede ser utilizado en combinación con algunos agentes químicos en una estrategia conocida como control integrado. Este tipo de control ha tenido éxito en algunos casos particulares, ya que tiene ventajas muy importantes sobre la aplicación individual sobre los dos tipos de control que lo conforman. Por un lado permite reducir la cantidad de plaguicida utilizado y por otro, a diferencia del biocontrol su actividad permanece independientemente de que las condiciones ambientales favorezcan la propagación del agente biológico utilizado, lo que en suma asegura un periodo más prolongado de control. Los mecanismos de acción por lo que los hongos utilizados en el control biológico afectan a las poblaciones de los patógenos son: competencia, la antibiosis y micoparasitismo (6).

La **competencia** ocurre cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. Esto va a depender de la capacidad saprofítica del hongo. Muchos hongos fitopatógenos requieren de nutrientes suficientes para poder llevar a cabo el proceso infectivo en la planta; así la competencia por aquellos factores nutricionales primarios como carbono, nitrógeno y hierro, puede ser una manera efectiva de ejercer un control sobre el patógeno (7). El **micoparasitismo** es el fenómeno por el cual un hongo coloniza a otro, incluyendo varios eventos durante el desarrollo de la interacción. Dentro de las relaciones establecidas entre hongos, el micoparasitismo pertenece a las relaciones de tipo competitivo, donde solo una de las especies que participa es beneficiada. Barnett y Binder clasificaron el micoparasitismo en dos tipos: (a) parasitismo necrotrófico o destructivo, en el cual la

relación micoparasitica resulta en la muerte del hongo huésped, y (b) parasitismo biotrófico, en el que el desarrollo del parásito es favorecido por el contacto persistente con células vivas del huésped. Los micoparásitos necrotróficos tienden a ser más agresivos, ya que tienen un amplio espectro de huéspedes y son relativamente poco especializados en su mecanismo de acción. La actividad antagonica de un micoparásito necrotrófico está dada por la producción de antibióticos, toxinas o enzimas hidrolíticas que causan la muerte y destrucción del huésped. Por otro lado el micoparasitismo biotrófico tiene un espectro de huésped más restringido y produce estructuras especializadas (Ej., haustorios) para absorber los nutrientes del interior de su huésped (7).

La obtención de los nutrientes de los micoparásitos necrotróficos puede darse a través de dos tipos de interacción. En algunas relaciones necrotróficas el solo contacto de las hifas permite la transferencia de nutrientes del huésped hacia el micoparásito. Este tipo de micoparásitos conocidos como necrotróficos de contacto no penetran el micelio del huésped o por lo menos no existe evidencia de ello. Los necrotróficos invasivos, por otra parte penetran las hifas de sus huéspedes, lo que ocasiona la degradación y muerte del citoplasma invadido (4).

## **1.2 Control químico.**

El método de control de patógenos más generalizado en la agricultura, especialmente en la lucha contra las enfermedades de hongos, es el químico. El primer fungicida, descubierto en 1882, se conoció como la "Pasta Bordelesa" y marcó el comienzo del control químico de las enfermedades en plantas. Desde entonces, se han desarrollado numerosos productos con diferentes modos de acción, primero los de contacto y posteriormente, a inicios de los años 70, los sistémicos. Los fungicidas son sustancias químicas que se aplican para el tratamiento de las enfermedades de las plantas producidas por hongos y aún por extensión a las causadas por bacterias. Los fungicidas se han convertido en una de las principales herramientas de producción de los agricultores, lo que se refleja en los grandes volúmenes de agroquímicos comercializados a nivel mundial. Las condiciones bajo las cuales se manipulan estos productos en los países en desarrollo son muy precarias e inaceptables en los países industrializados. Los agricultores frecuentemente se exponen a los pesticidas, ya

sea durante la preparación de las mezclas, su aplicación sobre los cultivos, la limpieza de los equipos o el almacenamiento de los productos (8). En la tabla 1 se muestran algunos datos generales de algunos fungicidas.

En 2005 Bayer CropScience, S.L. lanzó al mercado **Previcur**® Energy, fungicida sistémico que aporta soluciones específicas en los cultivos de hortalizas, tanto en cultivos intensivos como hidropónicos. Previcur es absorbido por la planta, no se lava con la lluvia, formulación de fácil manejo, producto de baja toxicidad. Posee un triple modo de acción: Reduce el crecimiento del micelio, actúa como antiesporulante e influye en el metabolismo del hongo, reduciendo la propagación de la enfermedad y localizando la infección (9).

El **Captan** es un fungicida Tioftalimida que no está catalogado como un organoclorado tiene tres átomos de cloro por molécula de pesticida. Su mecanismo de acción es: como fungicida preventivo de amplio espectro con actividad preventiva y curativa y absorción por vía radicular y foliar. Interfiere en el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelial (10). El grupo de las Tioftalamida se utilizan extensamente para proteger semillas, cultivos de campo y productos almacenados (11).

En el siglo pasado se iniciaron las observaciones sobre la acción inhibidora de las **Sales de Cobre** sobre la germinación de las esporas de ciertos hongos. Años después observaba Millardet que cuando se pulverizaban las cepas de los viñedos con lechada de cal preparada en vasijas de cobre, no eran atacadas por el mildiu que ya había llegado a Europa. Esta observación sirvió de base a la utilización de las propiedades fungicidas de las sales de cobre, que han llenado un siglo de aplicaciones con un producto tan conocido en todo el mundo como el Caldo bordelés obtenido a partir del Sulfato de cobre. Este es un anticriptogámico por excelencia para el tratamiento preventivo de las enfermedades de varios cultivos (12).

El **Sulfato de cobre** (II), también llamado sulfato cúprico, vitriolo azul, piedra azul o caparrosa azul, es un compuesto químico derivado del cobre que forma cristales azules, solubles en agua y metanol y ligeramente solubles en alcohol y glicerina. El cobre impide la

germinación de esporas y perturba el funcionamiento celular de los patógenos (13).

El **Oxícloruro de cobre** es otro de los antiguos fungicidas que se usaron por décadas y que aún hoy mantiene vigencia en el mercado. En 1967 se aplicaron 600 toneladas al 87 % y 150 al 30 % producidos por Basso y Tonnelier y otros, mientras que en la actualidad la cifra es de alrededor de 2.000 toneladas. Es un fungicida cúprico que tiene 50% de cobre metálico. Se aplica en suspensiones pulverizables, sobre los cultivos contra acción de hongos fitopatógenos. La formulación de este producto presenta un amplio espectro de control de hongos y bacterias. Debido a la finura de sus partículas, ofrece una buena suspensión con gran adherencia sobre vegetales (14).

Tabla 1. Datos generales de algunos fungicidas empleados en el control de hongos fitopatógenos.

Nombre comercial del Fungicida	Nombre químico	Principio activo	Fabricante	Espectro de control
<b>Captan 50</b>	N-((triclorometil)tio)-4-ciclohexano	Captan	Bravo	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>cercospora purpurea</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Monilinia fusicola</i> , <i>Venturia inaequalis</i> .
<b>Oxícloruro de cobre.</b>	Oxícloruro de cobre (Cu <sub>2</sub> Cl(OH <sub>3</sub> ))	Oxícloruro de cobre	Agroquímica	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> , <i>Erysiphe cichoracearum</i> , <i>Colletotrichum lagenarium</i> , <i>Alternaria cucumerina</i> , <i>Cercospora purpurea</i> , <i>Sphaceloma perseae</i> .
<b>Previcur.</b>	Propamocarb clorhidratado	Propamocarb	Bayer	Hongos del grupo Oomicetes; <i>Pythium</i> - <i>Phytophthora</i> - <i>Bremia</i> - <i>Pseudoperonospora</i> - <i>Plasmopara</i> - <i>Peronospora</i> - otros.

### **1.3 *Trichoderma*.**

Hongo: *Ascomyceto*

Sub-división: *Deuteromycotina*.

Clase: *Hyphomycetes*.

Orden: *Hyphales* (Moniliales).

Género: *Trichoderma*.

El primer intento de controlar una enfermedad radicular por medio de microorganismos introducidos en el suelo fue llevado a cabo por C. Hartley en 1921 y el uso de *Trichoderma* como agente de control fue inicialmente propuesto por Weindling (1932) ().

El género *Trichoderma* comprende un conjunto de especies Ascomiceto, presenta micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidioforo hialino no verticilado, fialides singulares o en grupos, conidia unicelular coloreada, de rápido desarrollo en medios sintéticos, la colonia se muestra de color verde, es saprófita, muy común en suelos y madera (15).

Algunas especies pertenecientes al género de *Trichoderma* han sido utilizadas como agentes de control biológico (biocontrol) contra un amplio rango de hongos patógenos de plantas (Tabla 2). La fuerte capacidad antagonista que presenta, así como su fácil manipulación en el laboratorio han hecho de este organismo un modelo atractivo para estudiar con detalles los fenómenos asociados al biocontrol. *Trichoderma spp* tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de fitopatógenos, puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a habitats en donde los hongos causan enfermedad le permiten ser eficiente agente de control, de igual forma puede sobrevivir en medios significativos de pesticidas y otros químicos (16).

Muchos son los mecanismos asociados a *Trichoderma* como agente de control biológico sin embargo el micoparasitismo parece ser el más relevante. El micelio de *Trichoderma* secreta una gran cantidad de enzimas hidrolíticas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que le permiten colonizar cualquier sustrato presente en el suelo y que ayudan a

disolver la pared celular de las hifas del huésped, facilitando la inserción de estructuras especializadas, absorbiendo los nutrientes del interior del hongo huésped (17).

El proceso micoparasítico puede comprender toda una gama de respuestas por parte del parásito. En el caso de *Trichoderma* se han descrito 4 eventos asociados a éste, los cuales pueden suceder secuencial o simultáneamente según la especie de que se trate. El crecimiento dirigido de *Trichoderma* hacia su huésped es el primer evento asociado a la interacción y se clasifica por la producción de ramificaciones atípicas que se posicionan con dirección al hongo huésped. Aunque este fenómeno parece no ser crucial en el establecimiento de la relación micoparasítica, representa una ventaja para el antagonista. El siguiente paso una vez que las hifas de los contendientes entran en contacto, es el reconocimiento. *Trichoderma* es un antagonista general, sin embargo tiene un número limitado de huéspedes, lo que permite suponer que hay un mecanismo de reconocimiento, el cual puede darse a distancia o mediado por el contacto. En este último caso, lectinas presentes han sido descritas en plantas, son glicoproteínas que tienen la capacidad de unir residuos de azúcar y que cumplen funciones celulares y en el medio ambiente. Una vez que se han reconocido las hifas del huésped, algunas de las hifas de *Trichoderma* suelen enrollarse sobre él. En algunas especies de *Trichoderma* se ha evidenciado la formación de estructuras parecidas a apresorios en respuesta al contacto con el huésped. La formación de estas estructuras, ha si como de los enrollamientos, es un fenómeno común en otros casos de micoparasitismo. El enrollamiento de una hifa sobre otra es una de las evidencias que se toman como prueba de la actividad micoparasítica de un hongo, sin embargo Deacon (1976) ha propuesto que los enrollamientos de las hifas se dan como una respuesta de resistencia temporal del huésped hacia el ataque del parásito. El evento final de la interacción es la degradación y penetración de la pared celular del huésped, mediado por la acción combinada de varias actividades enzimáticas (18).

Beker y Griffin (1995) definen a la antibiosis como la inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro, de este modo incluyen pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y enzimas hidrolíticas. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir antibióticos en cultivos puros, lo cual es la mas fuerte evidencia de la posible acción de este tipo de compuestos como mecanismo de ataque de *Trichoderma spp.*

No obstante para este hongo en particular la producción de metabolitos ésta fuertemente

ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo. También existen los efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista (19).

Dentro de los metabolitos producidos por *Trichoderma* se encuentra **Pachibasin**, el cual pertenece al grupo de los Octacetidos; **Trichodermin**, el cual pertenece al grupo de Monoterpenos o Trichothecanos; **Trichorzianinas** localizadas sobre las esporas y que pueden mantener su propiedad fúngica por períodos prolongados (3 a 4 meses); **Gliotoxin**, la cual presenta una potente actividad antibiótica contra bacteria y hongos; **Gliovirin** es un antibiótico del grupo de los dicetopiperacinas el cual actúa destruyendo el hongo causando coagulación del protoplasma. El 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (**6PAP**) es un policétido conocido por ser tóxico a un gran número de patógenos de plantas; presenta un aroma característico a coco, tiene la ventaja de ser de baja toxicidad en mamíferos. Las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades en este sentido como hiperparásitos competitivos por que también llegan a producir enzimas hidrolíticas a los que se le atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (20). Las quitinasas son proteínas abundantes encontradas en una gran variedad de semillas y hay una fuerte evidencia de que son proteínas de defensa con actividad antifúngica. Las glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de las cadenas de los glucanos, las cuales han sido caracterizadas de hongos, plantas y bacteria. Match (1988) demuestra que las quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos a concentraciones que oscilan entre 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo las quitinasas pueden no ser la únicas enzimas responsables de la degradación de la pared celular, por lo que es probable que la acción coordinada de algunas hidrolasas, por ejemplo; glucanasas, lipasas y proteasas se requieren para una disolución completa de la pared celular (21).

Tabla 2. Algunos patógenos controlados por *Trichoderma* spp.

Hongos controlados por <i>Trichoderma</i> spp.	Enfermedad	Cultivo
<i>Armillaria</i> spp	Pudrición de raíces	Frutales
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Amplio rango de cultivos como: papa, tomate, frijol, fresa, mora, flores, tomate de árbol y causa pudriciones en postcosecha.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Amplio rango de cultivos como: arveja, papa, tomate, frijol, fresa, flores, tomate de árbol y causa pudriciones en postcosecha.
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	Volcamiento	Pino.
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición	Maíz.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitamientos vasculares	Papa, tomate, frijol, tomate de árbol, banana, arveja, maíz, clavel, entre otros.
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Carbón de las raíces	Maíz, frijol, melón, ajonjolí.
<i>Phytophthora</i> spp.	Pudrición	Tabaco, flores, frutales, etc.
<i>Phytophthora infestans</i>	Gota.	Papa, pepino de agua.
<i>Pythium</i> spp.	Pudrición algodonosa, volcamiento	Amplio rango de cultivos.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Zanahoria, tomate, lechuga, repollo, café, papa, arveja, cebolla, ajo, pimentón, etc.
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Habichuela, tomate, lechuga, repollo, café, papa, arveja, cebolla, ajo, etc.
<i>Rosellinia necatrix</i>	Pudrición blanca de raíces	Aguacate, manzano.

Tabla 3. Productos comerciales de biocontrol fúngicos para su uso contra hongos fitopatógenos de suelo.

<b>Producto/Organismo/País</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Formulación/Método de aplicación.</b>
<b>Bio-fungus</b> <i>Trichoderma spp.</i> Bélgica	<i>Sclerotinia, Phytophthora, Rhizoctonia solani, Phythium spp, Fusarium, Verticillum.</i>	Granular, polvo soluble; palillos y migajas. Aplicado
<b>T-22 G, T-22HB</b> <i>T. harzianum</i> USA	<i>Pythium spp, R. solani, Fusarium spp, Sclerotinia homeocarpa</i>	Granulos o polvo seco/ adicionado en granulos en surcos con aplicador granular, por diseminación en turba, mezcla con suelo de invernadero o con semillas.
<b>Trichodex</b> <i>T. harzianum</i> Israel	<i>Botrytis cinerea, Colletotrichum spp, Fulvia fulva, Monilia laxa, Plasmopara vitícola, Pseudoperonospora cubenesis, Rhizopustolonifer, Sclerotinia, Sclerotium.</i>	Polvo humectable, aerosol.
<b>Trichopel, Trichojet, Trichodowels</b> <b>Trichoseal</b> <i>T. harzianum, T. viride</i> Nueva Zelandia	<i>Armillaria, Botryosphaeria, Chondrosternum, Fusarium, Nectria, Phytophthora phytium, Rhizoctonia.</i>	No se indica.
<b>Aspire/Candida oleophyla</b> I-182 Israel	<i>Botrytis spp, Penicillum spp</i>	Aplicación post cosecha a frutos empapándolos por goteo o en aerosol
<b>Biofox C/Fusarium oxysporum</b> (no patógeno) Francia	<i>Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme</i>	En polvo o gránulo de alginat. Tratamiento e semilla o incorporado en suelo.
<b>Mycostop</b> <i>Streptomyces griseovirides, cepa K-16</i> Finlandia	<i>Fusarium spp, Alternaria brassicola, Phomopsis, Botrytis spp, Phytium spp, y Phytophthora spp.</i>	En polvo/aerosol a través de un sistema de irrigación
<b>Polygandron</b> <i>Pythium oligandrum</i> República de Slovakia	<i>Pythium ultimum</i>	En granulo o polvo/ tratamiento en la semilla o incorporación en suelo.
<b>Rotstop</b> <i>Phlebia gigantea</i> Finlandia	<i>Heterobasidium onnosum</i>	Esporas en polvo inerte/ en aerosol.

## CAPITULO 2

### OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo general:

- ❖ Estudiar la sensibilidad de algunas especies de *Trichoderma* a fungicidas comerciales a fin de proponer una estrategia de manejo de control integrado.

#### 2.2 Objetivos específicos:

- ❖ Determinar la sensibilidad que presentan las cepas *T. atroviride* IMI, *T. virens* 29.8 y *T. virens* TVK1 a tres fungicidas comerciales (Previcur, Captan y CuSO<sub>4</sub>).
- ❖ Generar una cepa resistente derivada de *T. virens* TVK1 al fungicida Previcur.
- ❖ Evaluar la sensibilidad a fungicidas en un ensayo sobre tierra de las cepas *T. virens* 29.8 y *T. virens* TVK1.

## CAPITULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos:

Se utilizaron las siguientes cepas de hongos: *Trichoderma virens* 29.8, *Trichoderma virens* TVK1, *Trichoderma atroviride* IMI.

#### 3.2 Medios de cultivo:

Los medios de cultivo utilizados fueron: a) PDA (Agar Papa Dextrosa) DIFCO; b) MRB: (Medio Rosa de Bengala) PDA +Rosa de bengala 0.6%, Ampicilina 2%, Ácido tartarico 10%; c) MM (Medio Mínimo): (g/L): Glucosa,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Citrato de sodio  $5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , (mg/L):  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Cloroformo y Biotina (Merck). El pH se ajusto a 5.8.

#### 3.3 Fungicidas:

Los fungicidas utilizados fueron: a) Previcur N (Propamocarb-clorhidrato)-Bayer; b) Captan (Cis N-(triclorometil)-4-ciclo hexón- 1,2-dicarboximida)-Bravo; c) Sulfato Cuprico-Agroquímica.

#### 3.4 Preparación de medios de cultivo:

- a) PDA: Se suspende 39 g del medio en 1 L de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (1).
- b) MRB: Se sigue la misma metodología que en la ref. (1). Una vez esterilizado el medio se atempera (sin dejar que solidifique) y en un área estéril (campana) se va a agregar por cada 100 ml de medio: Rosa de Bengala 1 ml, Ampicilina 0.5 ml y ác.

tartarico 1.5 ml. Ya que este homogenizado cada uno de los componentes en el medio se vacía 25 ml en cajas petri.

- c) PDA + Fungicida: Se sigue el mismo método de la ref. (1). Una vez que este esterilizado y atemperado el medio se le agrega en un área estéril (campana) la concentración del fungicida a utilizar homogenizando el medio con el fungicida y se vacía en cajas petri un volumen de 25 ml de medio por cada caja.
- d) VM+G: Se pesa glucosa (15g/ 1000ml de agua destilada), se adiciona MM (20ml/1000ml de agua destilada), se afora con agua destilada y se esteriliza.

### 3.5 Preparación de concentrado de esporas:

Para la obtención de concentrados primero es la obtención de esporas a través de resiembra. La resiembra se lleva acabo de la siguiente manera: se corta un bloque de micelio de las cepas *T. atroviride* IMI, *T.virens* TVK1 o *T. virens* 29.8 y se coloca en cajas preparadas con PDA y se incuban a 28°C durante 5 días. Una vez que las cepas están esporuladas se coloca 5 ml de agua estéril en cada caja y se raspan las esporas con una espátula previamente esterilizada, se filtran las esporas obtenidas en un embudo (preparado con tela magitel y esterilizado) y se cosechan las esporas en un tubo falcón, se vuelve a colocar otros 5 ml de agua estéril en la caja para cosechar el resto de las esporas, una vez que se hayan cosechado todas las esporas en el tubo falcón se guardan en el refrigerador a 4°C.

Conteo de esporas en cámara de Neubauer: Para realizar el conteo primero se tienen que hacer diluciones del concentrado 1:10, 1:100 o 1:1000, esto es para poder facilitar el conteo de las esporas en la cámara de Neubauer. Una vez realizada la dilución se toma con una micropipeta 10 µl de la dilución de esporas y se coloca en la cámara de Neubauer buscando el campo a 10 X y observando a 40 X. Se cuenta la cantidad de esporas que se encuentren en los cuadrantes de las esquinas y el de en medio.

La formula que se aplica es la siguiente:

(No. Esporas) (No. Cuadrantes) (Factor de dilución) (10000) = esporas/ml.

### **3.6 Ensayo de sensibilidad a fungicidas:**

La sensibilidad a fungicidas se llevo acabo utilizando como inoculo:

- a) Un bloque de micelio: Se resembró IMI, TVK1 o 29.8 en PDA tapando las cajas petri con papel aluminio y dejándolas en oscuridad de 48- 60 hrs. Después se corta un bloque de micelio (aprox. de 1mm) y se pasa en el centro de cada caja petri preparada con PDA adicionadas de cada uno de los fungicidas, Previcur (0.5, 1 y 2%), Captan (50, 100 y 500µg/ml) y Sulfato Cuprico (50, 100 y 500 µg/ml). Se incubaron a 28°C y se monitorea el diámetro de cada colonia cada 12 horas hasta que el control sin fungicida logre crecer en todo el diámetro de la caja (8.3cm).
- b) Utilizando 20 µl de una suspensión de esporas: En este ensayo se inocula directamente una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas en el centro de cada una de las cajas preparadas con PDA adicionadas de cada uno de los fungicidas. Se incuban a una temperatura de 28°C y se monitorea el diámetro de crecimiento cada 12 horas hasta que el control sin fungicida alcance a crecer en toda la caja (8.3cm).

### **3.7 Ensayo de entrenamiento a Previcur:**

Se prepararon cajas con PDA más Previcur 0.5%. Se inoculo una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas, se incubo a 28°C, una vez que la cepa alcanzó a crecer en toda la caja y a esporular se cosecharon las esporas agregando 1ml de agua estéril en cada una de las cajas (el ensayo se lleva acabo por duplicado).

Se realizaron resiembras sucesivas hasta obtener 5 pases de la cepa a la misma concentración de Previcur.

### **3.8 Conteo de unidades formadoras de colonia:**

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3.5 e incubado a una temperatura de 25°C, dando como resultado el crecimiento de colonias (23). Una vez realizados los 5 pases se procede a la obtención de unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa entrenada utilizando MRB adicionado del fungicida (Previcur 0.5%). Se preparan diluciones del último pase de

la cepa entrenada de 1:10, 1:100 y 1:1000 colocando 1 ml de cada una de las diluciones de esporas en cada caja petri, posteriormente se vierte 25 ml de MRB preparado con fungicida, se homogeniza el medio con las esporas y por último se incuban a 28°C. Una vez que se observa crecimiento en las cajas se aíslan dos colonias y se inoculan en PDA preparado con Previcur 0.5%, se incuba a 28°C. Se cosechan las esporas y se guardan en un tubo falcón a 4°C.

### **3.9 Sensibilidad en suelo:**

Se peso 100 gramos de tierra, colocándola en bolsas y sellándolas. Se esterilizan las bolsas con tierra 2 veces (120 lb por 15 min.) dejando un día intermedio de reposo (2). En un tubo falcón estéril se agrega la concentración de fungicida y se afora a 7.5 ml con agua estéril, se agrega a la bolsa con tierra y se homogeniza hasta que el fungicida cubra totalmente toda la tierra, después en otro tubo falcón estéril se agrega la cantidad de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/g de tierra) y se afora a 7.5 ml con agua estéril y se adiciona a la bolsa con tierra previamente tratada con el fungicida. Se sellan y se dejan a temperatura ambiente durante 45 días. Después de realizados los 45 días se pasa la tierra a un vaso (para puré) y se licua, una vez licuada la tierra se toma una muestra de 10g y se pasa a una frasco dilutor con 90 ml de agua esterilizada para tener una dilución de 1:10, se preparan diluciones de 1:100 o 1:1000. Por último se hace un conteo de UFC utilizando MRB.

Sensibilidad en suelo agregando una fuente de carbono: Para este ensayo se utilizo 50 gramos de tierra previamente esterilizada ref. (2). Se pasa la tierra a vasos desechables. En un tubo falcón se agrega 5 ml de VM+G y posteriormente se adiciona la concentración del fungicida, se agrega a la tierra tratando de que el fungicida con el medio la cubra totalmente, después en otro tubo falcón se agrega la solución de  $1 \times 10^6$  esp/g de tierra, llevando al aforo a 5ml con agua destilada y se agrega a la tierra previamente tratada con fungicida. Se sellan los vasos con clinpack y se dejan en una cámara de humedad a temperatura ambiente durante 17 días. Después de los 17 días, la tierra se pasa a vasos (para puré) para licuar la tierra, se toma una muestra de 10g y se agrega a un frasco dilutor con 90 ml de agua destilada estéril (1:10), se realizan mas diluciones. Por ultimo se hace conteo de UFC utilizando MRB.

## CAPITULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Sensibilidad a fungicidas:

El ensayo de sensibilidad en placa se llevo acabo con las tres cepas *T. virens* 29.8, *T. virens* TVK1 y *T. atroviride* IMI, utilizando como inculo micelio o una suspensión de esporas en el centro de cada una de las cajas preparadas con PDA mas la concentración de cada uno de los fungicidas (ver materiales y métodos).

Los resultados para *T. virens* 29.8 mostraron que cuando se inocula micelio la inhibición de Previcur es de un 60% y para Captan 45% (Figura 4.2), en cambio cuando se inocula una suspensión de esporas la inhibición de Previcur es de un 70% y de Captan 62% (Figura 4.5).

Por otra parte, los datos obtenidos para *T.virens* **TVK1** mostraron que el fungicida con mayor efecto inhibitorio cuando se utiliza como inculo micelio fue Previcur teniendo el 53% de inhibición y para Captan el 48% (Figura 4.3). Sin embargo cuando es utilizado como inculo una suspensión el fungicida con mayor efecto inhibitorio es Captan teniendo una inhibición del 63% y para Previcur 55% (Figura 4.6).

Por ultimo se tiene que para *T. atroviride* **IMI** el fungicida Previcur inhibe el 55% de su crecimiento cuando es utilizado micelio y Captan 42% (Figura 4.4). En cambio cuando es utilizado una suspensión de esporas el fungicida con mayor efecto inhibitorio fue Captan con una inhibición del 46% y Previcur el 45% (Figura 4.7).

Los porcentajes de inhibición cuando las cepas fueron inoculadas en Sulfato Cuprico fueron: para *T.virens* **29.8** 2%, *T. atroviride* **IMI** 18% cuando se inocula micelio. En cambio cuando se utiliza como inculo una suspensión de esporas es: para *T. virens* **29.8** 13%, *T. virens* **TVK1** 9% y para *T. atroviride* **IMI** 10% (Figura 4.1).

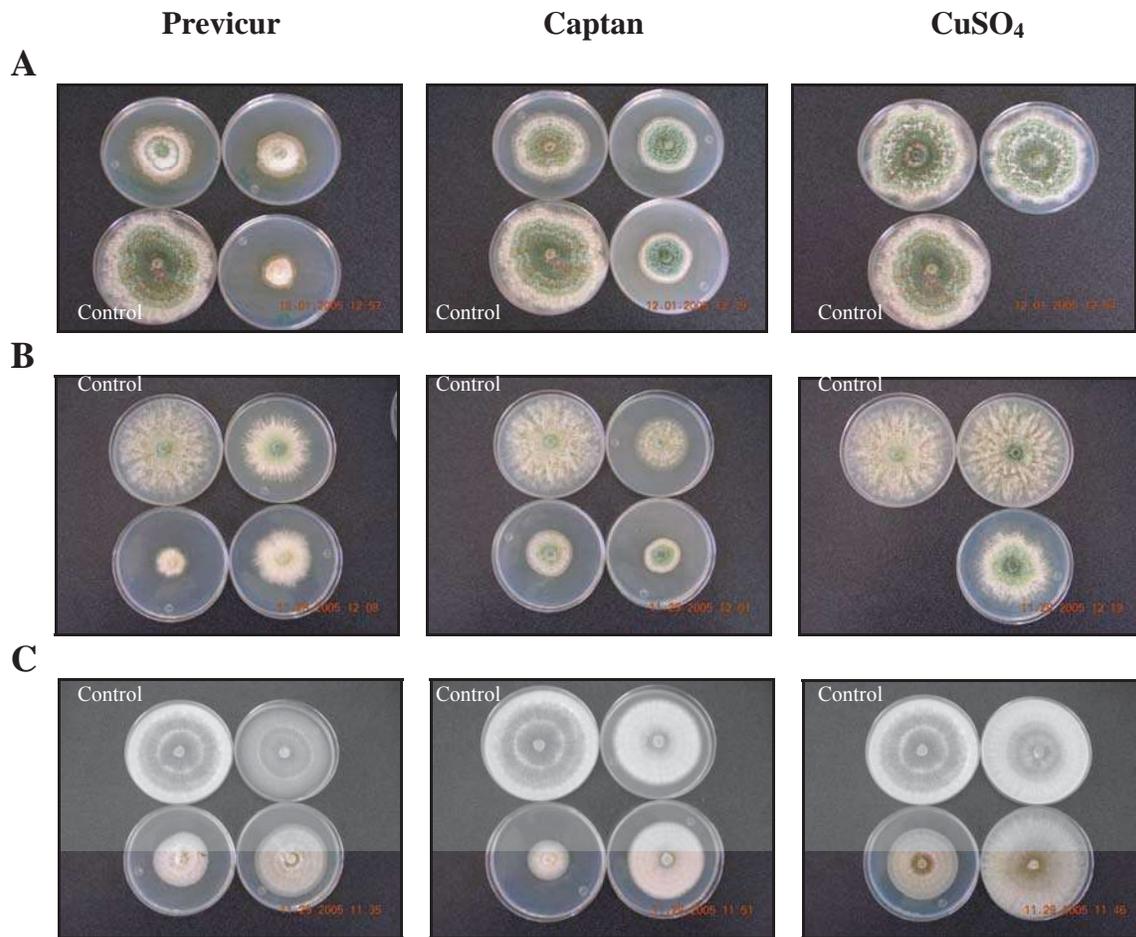


Figura 4.1. Imágenes del ensayo de sensibilidad a fungicidas: A) *T. virens* 29.8, B) *T. virens* TVK1; C) *T. atroviride* IMI, utilizando como inóculo un bloque de micelio en cajas preparadas con PDA adicionadas de cada uno de los fungicidas, Pervicur (0.5, 1 y 2%), Captan (50, 100 y 500 µg) y CuSO<sub>4</sub> (50, 100 y 500 µg). Cada imagen esta representada por un control y las concentraciones del fungicida ubicadas de menor a mayor concentración en el sentido de las manecillas del reloj.

## Sensibilidad a fungicidas utilizando como inoculo micelio

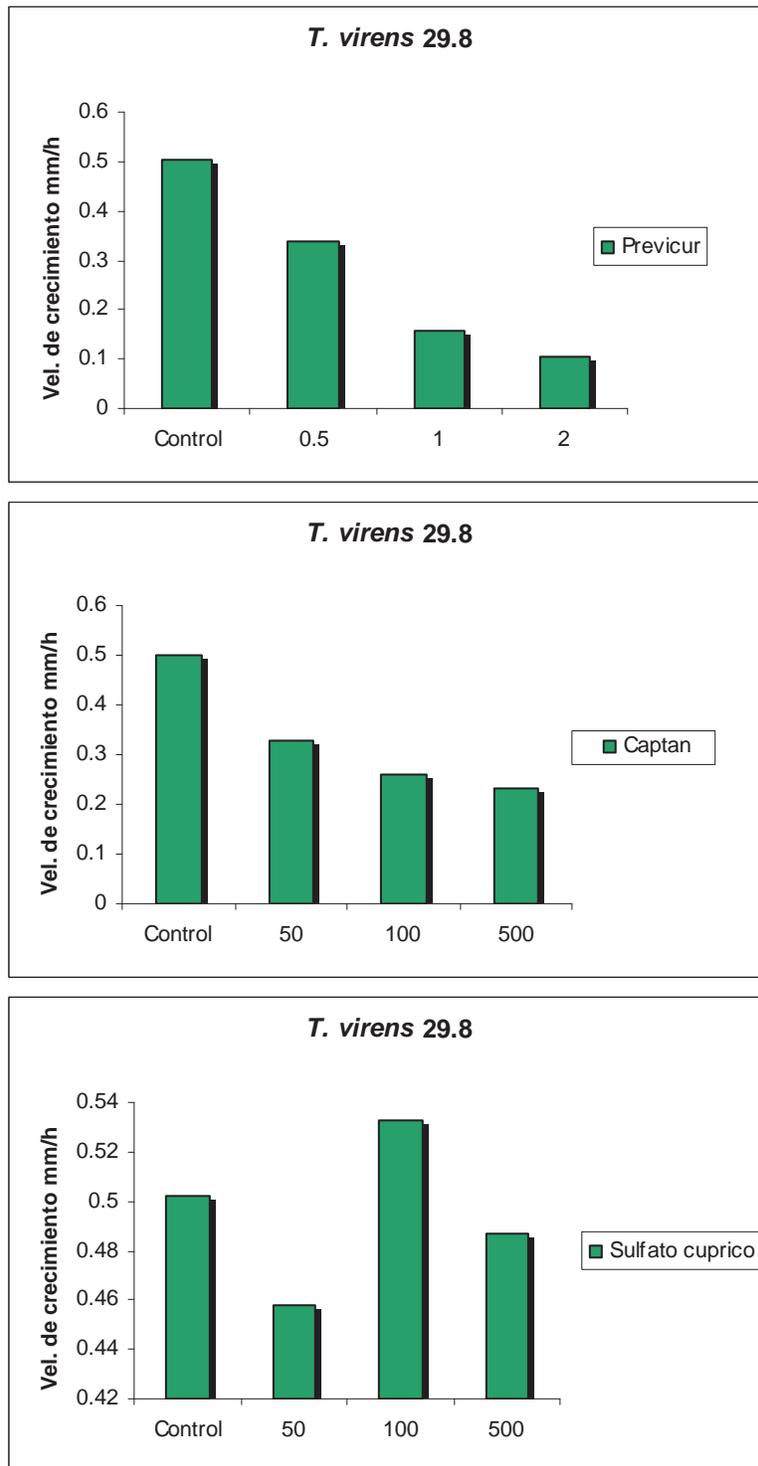


Figura. 4.2. Velocidad de crecimiento de *T. virens* 29.8 en función a fungicidas (Previcur %, Captan µg y CuSO<sub>4</sub> µg) en mm/h utilizando como inoculo micelio.

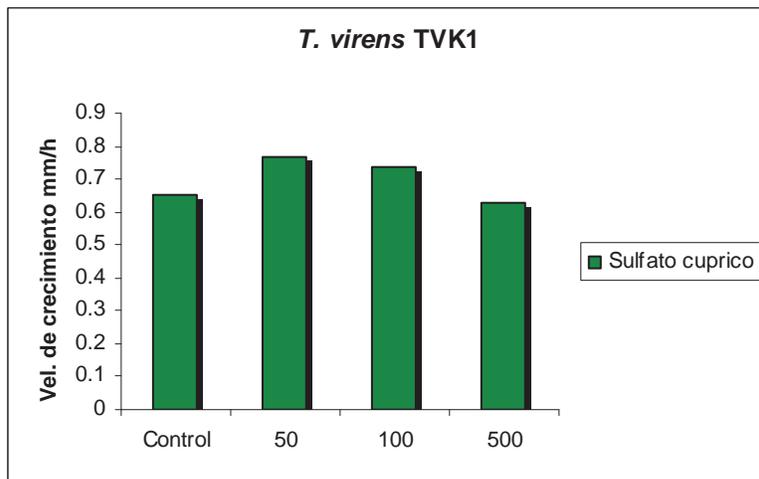
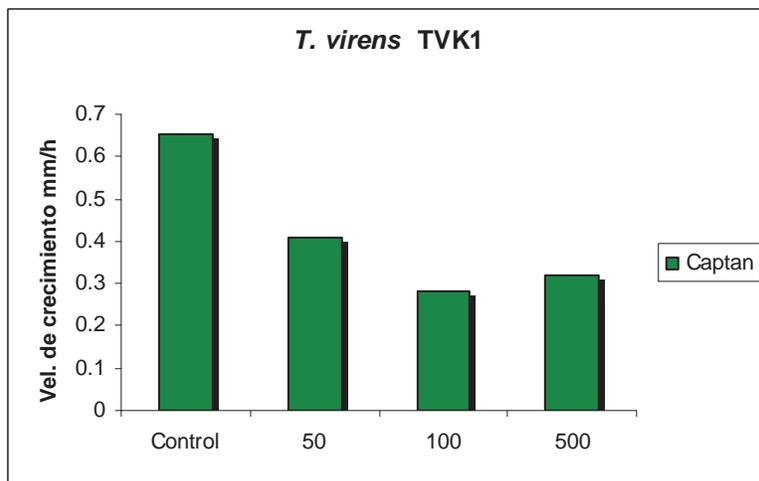
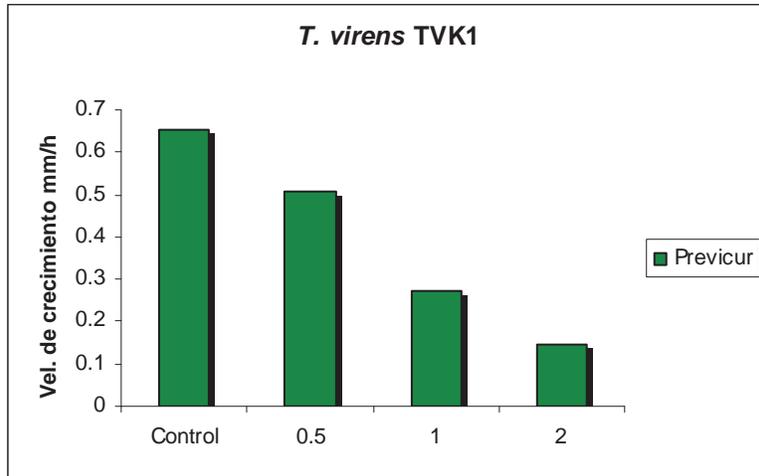


Figura. 4.3. Velocidad de crecimiento de *T. virens* TVK1 en función a fungicidas (Previcur %, Captan µg y CuSO<sub>4</sub> µg) en mm/h utilizando como inóculo micelio.

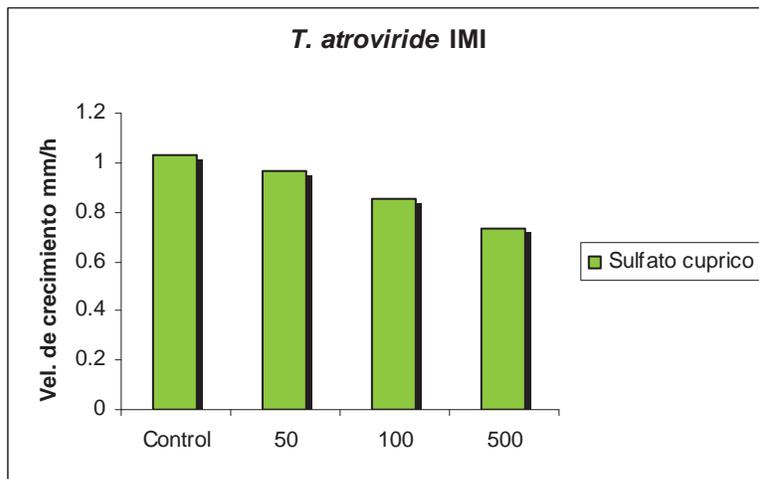
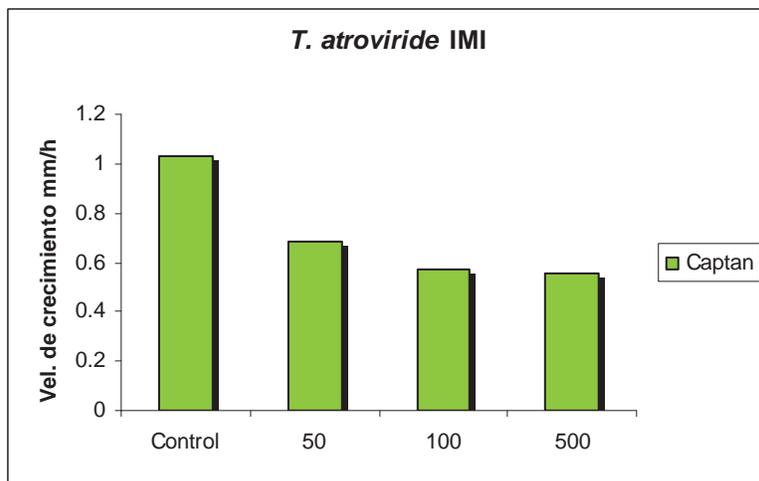
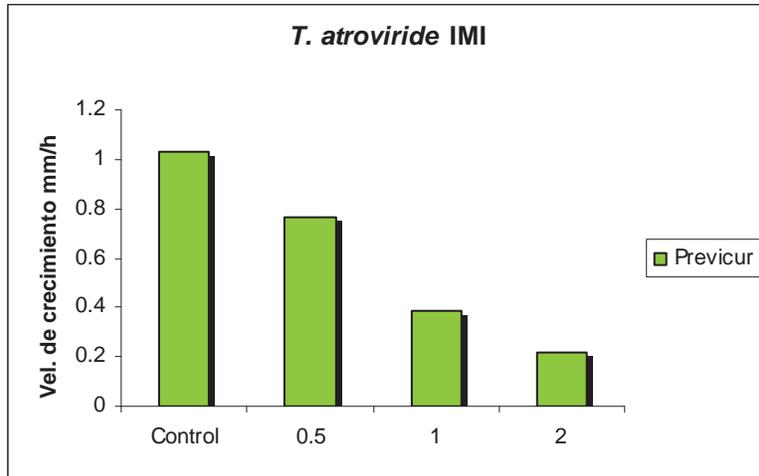


Figura 4.4. Velocidad de crecimiento de *T. atroviride* IMI en función a fungicidas (Previcur %, Captan µg y CuSO<sub>4</sub> µg) en mm/h utilizando como inoculo micelio.

### Sensibilidad a fungicidas utilizando como inoculo esporas

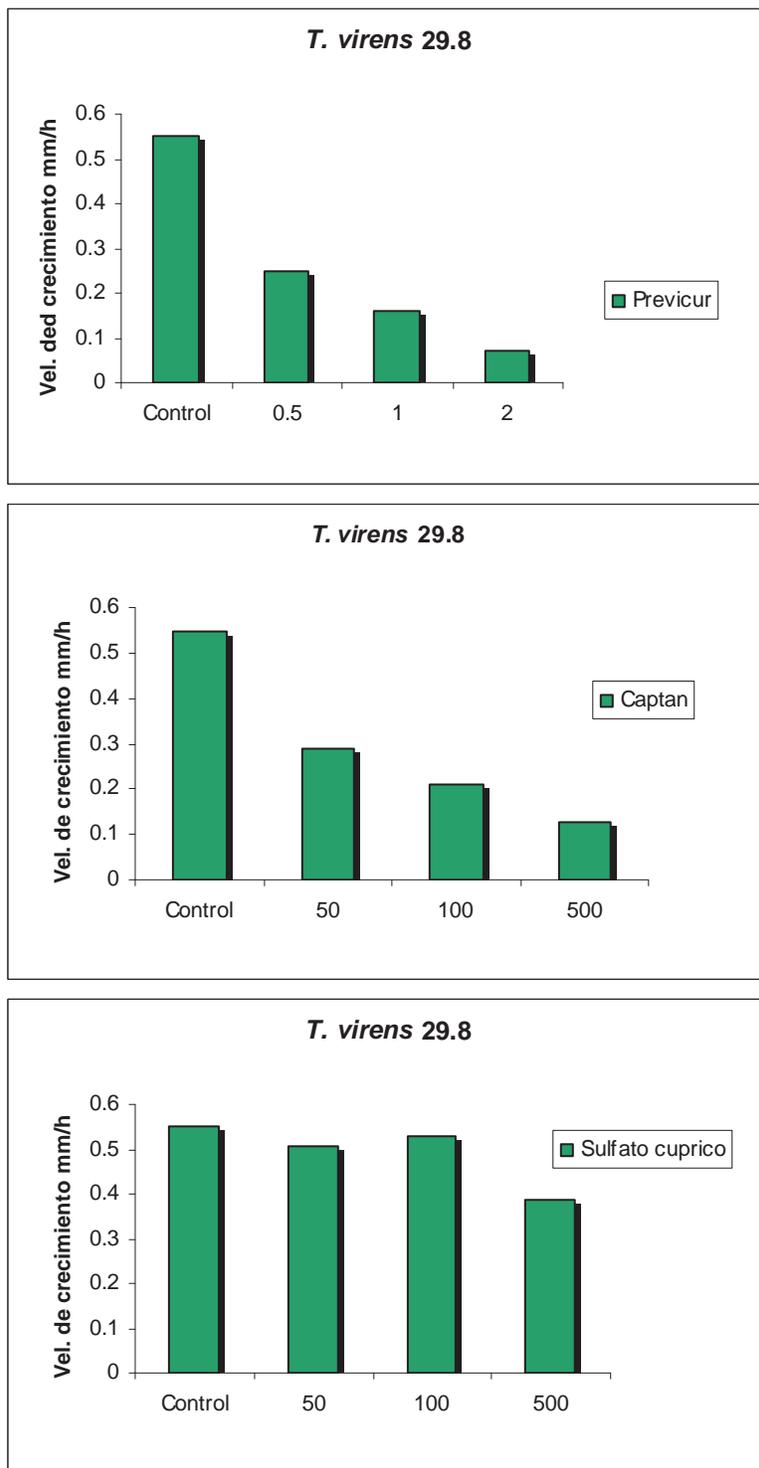


Figura 4.5. Velocidad de crecimiento de *T. virens 29.8* en función a fungicidas (Previcur %, Captan  $\mu\text{g}$  y  $\text{CuSO}_4$   $\mu\text{g}$ ) en mm/h utilizando como inoculo una concentración de esporas.

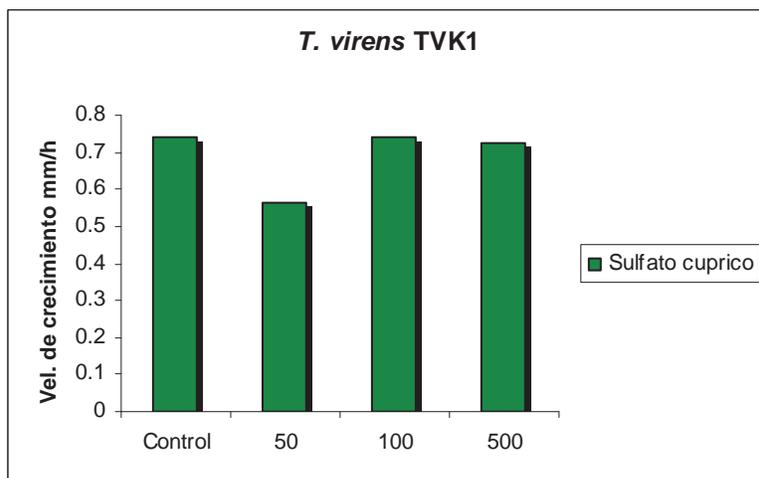
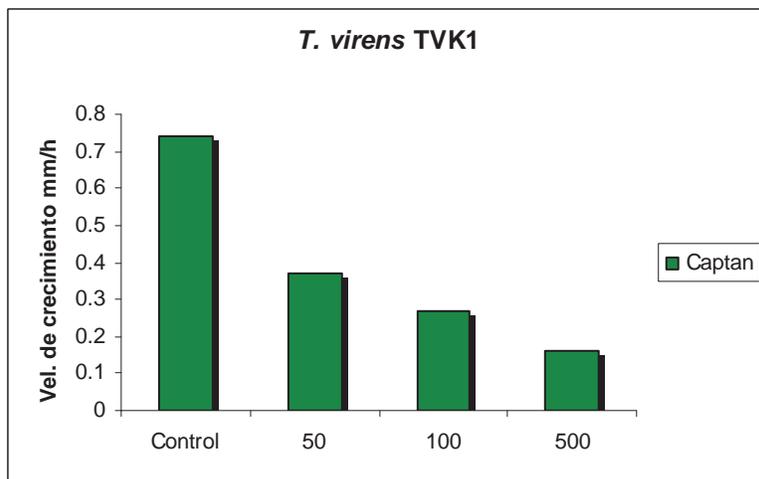
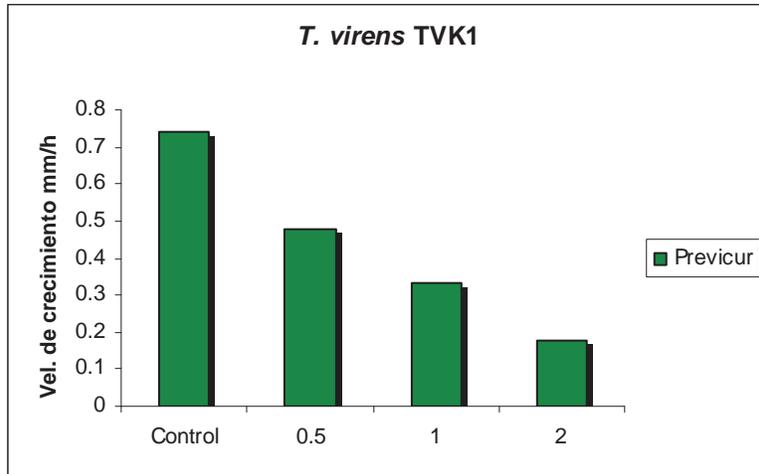


Figura 4.6. Velocidad de crecimiento de *T. virens* TVK1 en función a fungicidas (Previcur %, Captan µg y  $\text{CuSO}_4$  µg) en mm/h utilizando como inóculo una concentración de esporas.

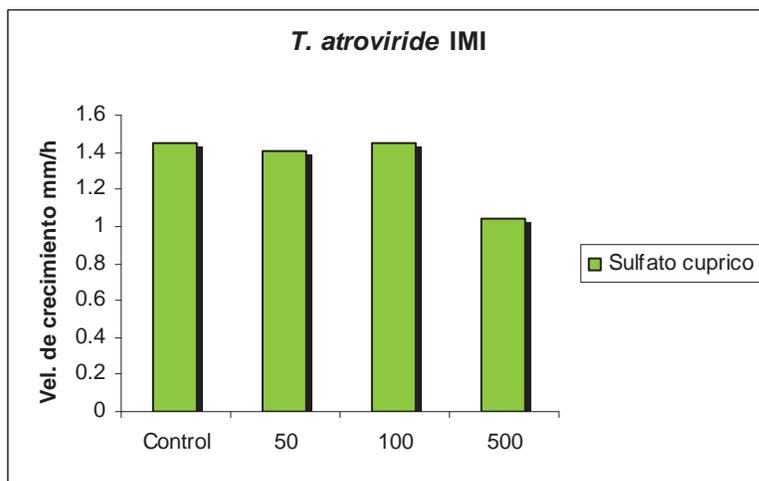
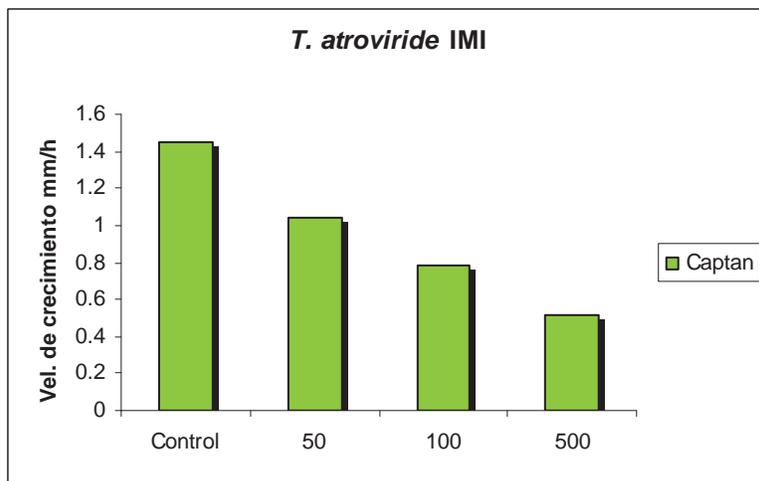
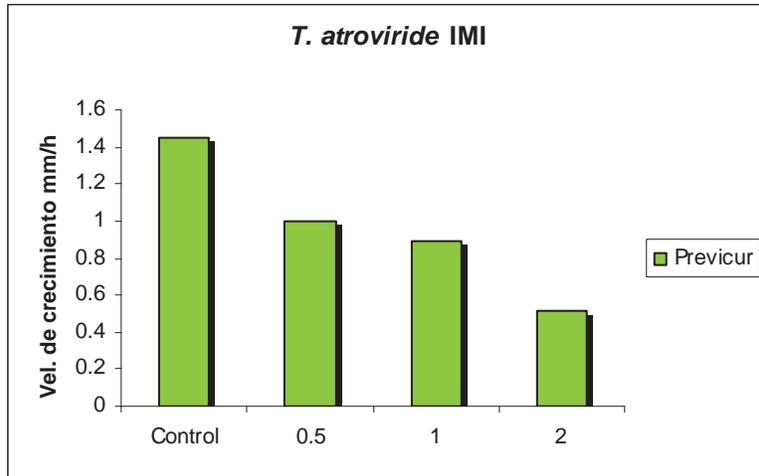


Figura 4.7. Velocidad de crecimiento de *T. atroviride* IMI en función a fungicidas (Previcur %, Captan µg y CuSO<sub>4</sub> µg) en mm/h utilizando como inóculo una concentración de esporas.

#### 4.2 Ensayo de sensibilidad en suelo de la cepa de *T. virens* 29.8:

En este ensayo se utilizó la cepa de *T. virens* 29.8 y solo se probaron dos fungicidas con las concentraciones mínimas inhibitorias de 0.5% para Previcur y 50 µg para Captan (ver materiales y métodos). Se observó que Captan es el fungicida que inhibe el 50% del crecimiento de *T. virens* 29.8 debido a que el inoculo fue una suspensión de esporas (Figura 4.8). Los resultados obtenidos coincidieron con aquellos generados en placa, esto es las UFC son claramente menores para el fungicida Captan.

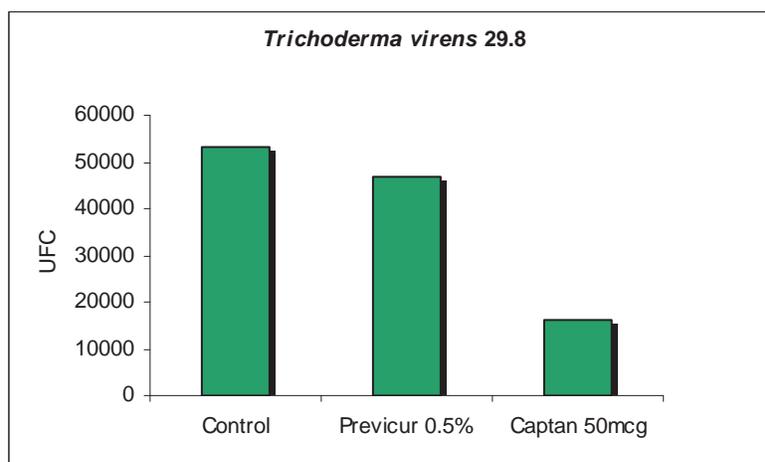


Figura 4.8. Resultados del ensayo de UFC de *T. virens* 29.8 en suelo después de 45 días de estar en contacto con fungicida (Previcur 0.5% y Captan 50 µg).

#### 4.2.1 Ensayo de sensibilidad en suelo de *T. virens* TVK1:

En este ensayo solo se utilizó como modelo la cepa de *T. virens* TVK1 y un solo fungicida a dos concentraciones Previcur 0.5% y 2% (ver materiales y métodos). Se realizó agregando una fuente de carbono a la tierra utilizada, esto es con la finalidad de tener las condiciones semejantes a la del suelo orgánico. *Trichoderma* es un hongo que actúa en simbiosis junto con la planta adquiriendo nutrientes de la materia orgánica en descomposición y así pasarlos a la planta nuevamente. Lo que resulta que la falta de nutrientes pudiera variar la capacidad de responder al efecto de los fungicidas.

Los resultados obtenidos en suelo coincidieron con los generados en placa esto es que las UFC fueron claramente menores para el fungicida Captan (figura 4.9).

En la figura 4.10 se observa como el hongo se ve afectado por el fungicida teniendo una diferencia de crecimiento entre el control y la concentración mínima de Previcur del 2%.

Los resultados mostraron una diferencia del 50% en la formación de UFC entre el control y el control más sustrato.

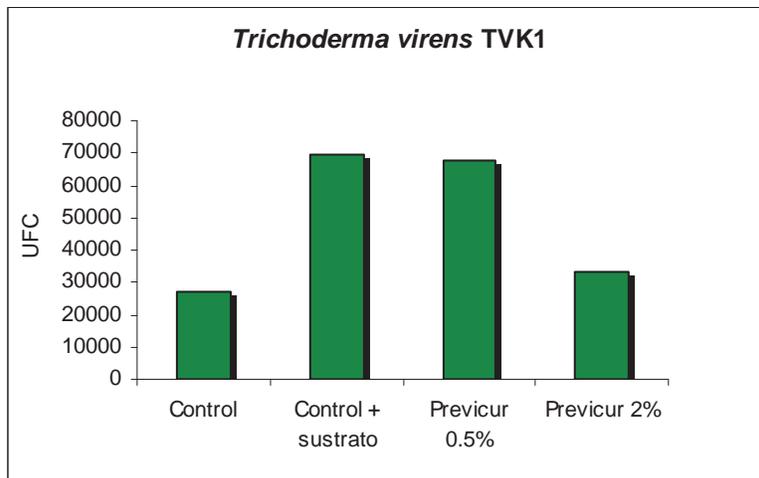


Figura 4.9. Resultados del ensayo de UFC de *T. virens* TVK1 en suelo después de 17 días de estar en contacto con el fungicida (Previcur 0.5% y 2%).

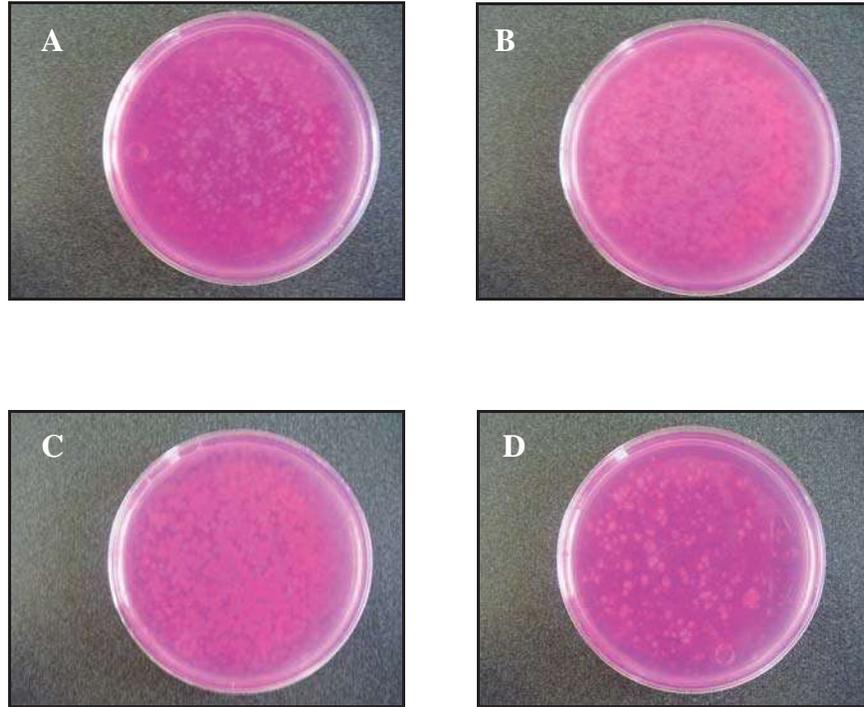


Figura 4.10. Imágenes del ensayo de UFC en suelo de la cepa de *T. virens* TVK1: A) Control sin fungicida; B) Control + sustrato, sin fungicida; C) Previcur 0.5% + sustrato; D) Previcur 2% + sustrato.

### 4.3 Ensayo de entrenamiento a Previcur:

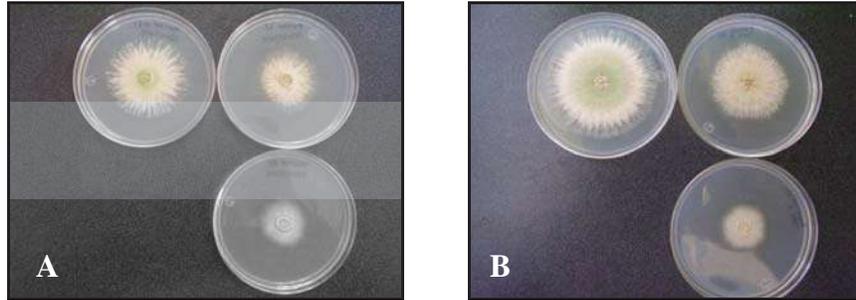
Para el ensayo de entrenamiento solo se utilizo la cepa de *T. virens* TVK1. La resistencia de la cepa se llevo acabo a través de resiembras sucesivas utilizando solo la concentración inhibitoria de Previcur 0.5% (Ver materiales y métodos).

Cuando se inoculo *T. virens* TVK1 entrenada en cajas preparadas de PDA + Previcur se observa que la cepa si logro crear resistencia aumentando su velocidad de crecimiento en comparación con la cepa original (figura 4.12), después se resiembró *T. virens* TVK1 entrenada a Previcur en cajas de PDA adicionadas de Captan con la finalidad de probar si la cepa es capaz de crear resistencia compartida múltiple a este fungicida (Figura 4.13). Posteriormente se tiene como resultado que la cepa de *T. virens* TVK1 entrenada a Previcur aumento 8 veces mas la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa parental de *T. virens* TVK1, esto es, cuando se inocula un bloque de micelio en Previcur y Captan (Figura 4.14), en cambio cuando se inocula una suspensión de esporas en Previcur y Captan la velocidad de crecimiento de la cepa entrenada es aumentada 10 veces (Figura 4.15).

Contrario a esto se tienen que el control aumenta su velocidad de crecimiento a un 20% que el control parental esto es cuando se utiliza micelio (Figura 4.14), en cambio cuando se utiliza una suspensión de esporas se observa que también aumento su velocidad de crecimiento esto es un 10% en comparación con la cepa parental (Figura 4.15).

En la figura 4.11 se muestra la diferencia de crecimiento en Previcur y Captan cuando se inocula micelio y suspensión de esporas, observando que hay mayor crecimiento cuando se utiliza una suspensión de esporas que micelio.

## Previcur



## Captan

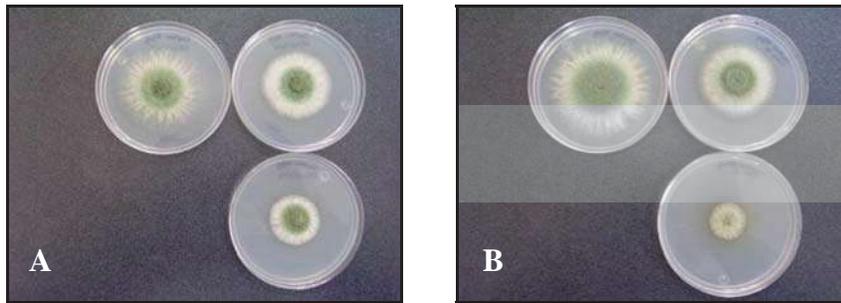


Figura 4.11. Imágenes de la prueba de sensibilidad de la cepa *T. virens* TVK1 entrenada a Previcur utilizando como inóculo A) Un bloque de micelio en cajas preparadas con PDA + Fungicida; B) Una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas en cajas preparadas con PDA + Fungicida. Cada imagen está ubicada de mayor a menor concentración del fungicida (Previcur 0.5, 1 y 2%; Captan 50, 100 y 500  $\mu\text{g}$ ) siguiendo el orden de las manecillas del reloj.

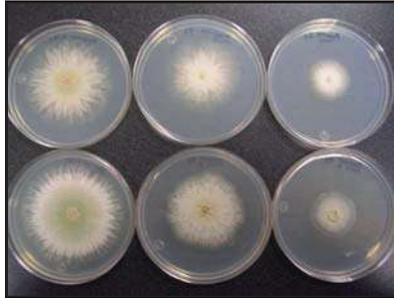


Figura 4.12. Comparativo de la prueba de sensibilidad de la cepa *T. vires* TVK1 parental (arriba) y la cepa de *T. vires* TVK1 entrenada a Previcur (abajo), utilizando como inóculo una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas en cajas preparadas de PDA + Previcur (0.5, 1 y 2%).

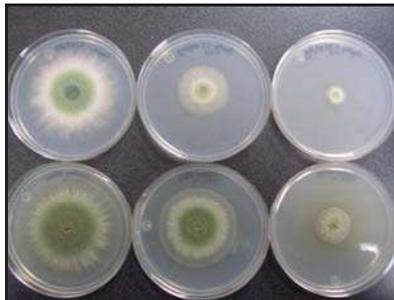


Figura 4.13. Comparativo de la prueba de sensibilidad de la cepa *T. vires* TVK1 parental (arriba) y la cepa de *T. vires* TVK1 entrenada a Previcur (abajo), utilizando como inóculo una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas en cajas preparadas de PDA + Captan (50, 100 y 500 µg).

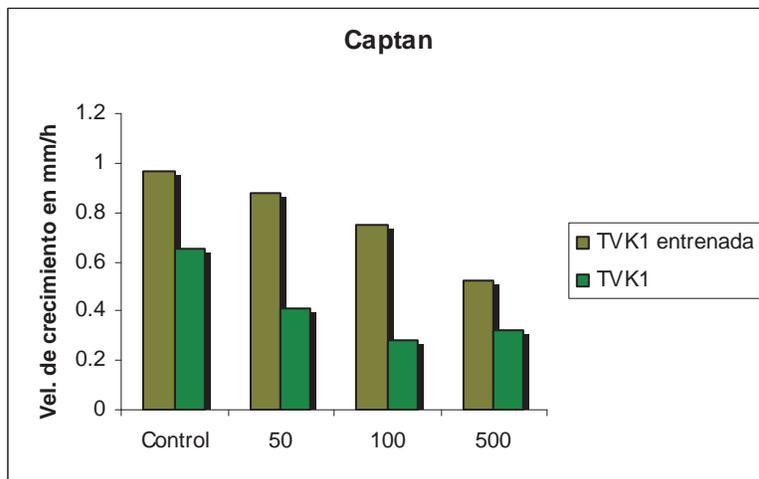
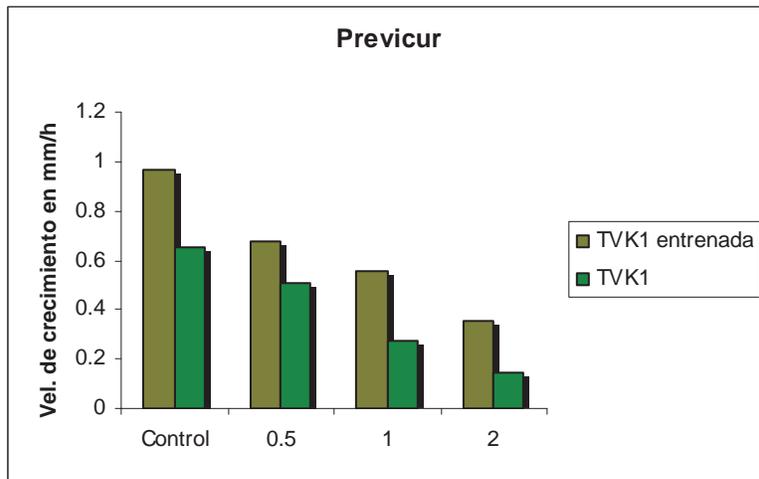


Figura 4.14. Comparación de la Velocidad de crecimiento en función a fungicidas (mm/h) de la cepas *T. virens* TVK1 y *T. virens* TVK1 entrenada a Previcur utilizando como inoculo un bloque de micelio.

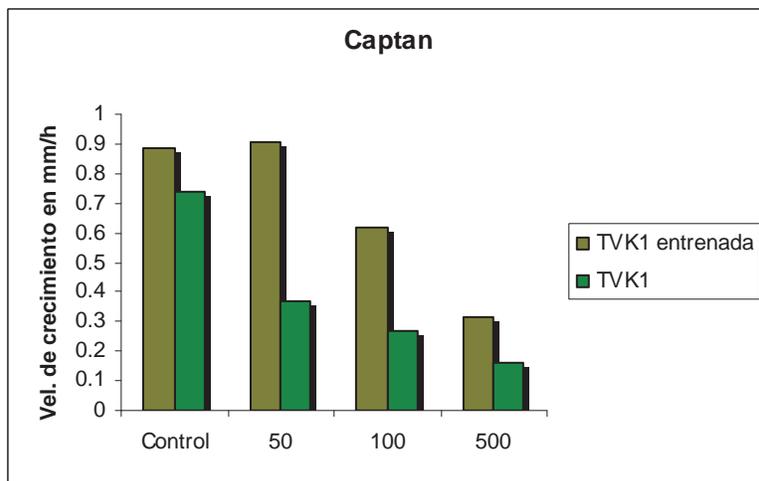
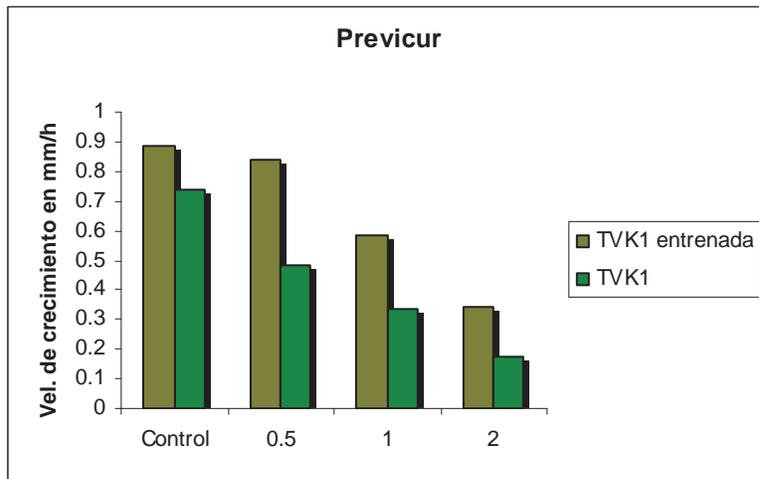


Figura 4.15. Comparación de la velocidad de crecimiento en función a fungicidas (mm/h) de las cepas *T. virens* TVK1 y *T. virens* TVK1 entrenada a Previcur utilizando como inoculo una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas.

## CAPITULO 5

### DISCUSIÓN

Actualmente el control de enfermedades en plantas de importancia económica sigue siendo un problema. La mayoría de estas enfermedades son ocasionadas por hongos fitopatógenos y su control se ha llevado a cabo con el uso de fungicidas. Los fungicidas han sido utilizados en los cultivos para controlar enfermedades causadas por hongos desde hace cerca de 200 años. Sin embargo el uso repetido de estos fungicidas y a la gran variabilidad genética que presentan estas especies ha ocasionado la aparición de nuevas cepas resistentes a estos fungicidas. Hasta la década de los 70 solo habían ocurrido casos esporádicos de resistencia práctica a los fungicidas y en todos los casos esta sobrevenía luego de varios años de utilización del fungicida. Con la introducción de los fungicidas sistémicos se incrementaron los problemas de resistencia y esta empezó a tener lugar a poco tiempo de comenzar a usarse el producto comercialmente.

El origen de resistencia a fungicidas en las poblaciones puede deberse a que todos los seres vivos tienen la capacidad de adaptarse a los cambios del medio en que viven, esta capacidad de adaptación se sustenta en la variabilidad genética. La diversidad genética existente en las poblaciones permite disponer de individuos adaptados a sobrevivir a diferentes condiciones del medio, estos individuos son los encargados de la sobrevivencia de la especie frente a nuevos factores.

La resistencia se basa en dos fuerzas evolutivas que son la mutación y la selección. Las mutaciones se encargan de crear la información genética necesaria para resistir al fungicida y la selección se encarga de hacer que la frecuencia en la población de estos individuos resistentes se incremente hasta alcanzar los niveles tales que harán fracasar el control. La mutación entonces provee la información para la resistencia mientras que la selección determina la frecuencia en que se encontraran los genotipos resistentes en la población

Por lo tanto la resistencia sigue siendo un problema en el que se requiere el desarrollo de nuevos fungicidas, generando un círculo difícil de romper y económicamente importante debido a que el desarrollo de nuevos fungicidas es demasiado costoso.

Una de las alternativas a este problema sería la utilización de agentes de control biológico. *Trichoderma* es un hongo micoparásito ampliamente utilizado para el control de enfermedades de plantas ocasionados por hongos patógenos.

Actualmente existen una gran variedad de productos comerciales hechos a base de diferentes cepas de *Trichoderma*, sin embargo la aplicación de estos productos indica que hay que utilizarlos después de haber agregado el fungicida en los cultivos dejando un lapso de tiempo de aproximadamente 30 días, ya que el efecto de los fungicidas pudieran inhibir el crecimiento del hongo, lo que implica una ventaja para aquellos microorganismos patógenos resistentes a fungicidas para poder avanzar más la enfermedad de la planta y propagarla.

Uno de los objetivos de este trabajo es llevar a cabo la propagación de un agente de control biológico resistente a fungicidas (control integrado) para poder dar mejor protección a la planta a través de la generación de una cepa de *Trichoderma* (*T. virens* TVK1) resistente a fungicidas comerciales como es Previcur. Este tipo de control integrado tiene varias ventajas debido a los dos tipos de control que lo conforman, uno es que reduce la cantidad de plaguicida utilizado y por otro lado la actividad del biocontrol permanece durante mucho tiempo.

Para esto se realizaron ensayos de cinética de crecimiento en placa. Cuando las tres cepas de *Trichoderma* estuvieron en contacto con las sales de cobre mostraron tener resistencia natural y en ambas cepas se logró observar que se tenía un crecimiento mayor a la concentración de 100 µg que en 50 µg, esto puede ser debido a dos cosas, uno a que el cobre es un elemento importante para el crecimiento de varios microorganismos y segundo a que el hongo pueda ser dependiente de cobre a la concentración de 100 µg ya que crece mejor que en el control lo que se observó para las tres cepas de *Trichoderma* estudiadas. Sin embargo para Previcur ambas cepas fueron muy sensibles al estar en contacto con este fungicida cuando se inoculó un bloque de micelio, esto es por que Previcur inhibe el crecimiento del micelio, en cambio en Captan fueron más sensibles cuando se inocula una suspensión de esporas debido a que interfiere en el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la reproducción de esporas.

De todo esto se tiene que la cepa que mostró tener mayor sensibilidad a los fungicidas fue *T. virens* 29.8 debido a que fue la cepa que presentó menor velocidad de crecimiento en un medio fresco sin fungicida en comparación con *T. virens* TVK1 y *T. atroviride* IMI, lo que indica que la velocidad de crecimiento está fuertemente influenciada con la sensibilidad de cada cepa de responder al mecanismo de acción de los fungicidas.

Posteriormente se realiza el ensayo de sensibilidad a los fungicidas en suelo a través del conteo de UFC por gramo de tierra, esto es con la finalidad de ver si los resultados generados en placa pudieran coincidir con los generados en suelo. El ensayo se llevó a cabo en dos partes: la primera fue colocar el hongo en suelo sin sustrato probando dos fungicidas con las concentraciones mínimas inhibitorias, esto fue con la finalidad de poder observar si los resultados generados en placa coincidían con los generados en suelo y la segunda parte fue agregar un sustrato a la tierra. El agregar un sustrato a la tierra fue con la finalidad de poder obtener los resultados lo más cercano a lo que pueda verse “*in vivo*” es decir a la simbiosis que presenta el hongo con la planta. Los resultados obtenidos mostraron que efectivamente el fungicida Captan es el que mayor efecto inhibitorio presentó cuando se inocula una suspensión de esporas. Después de los 45 días de inoculación se observa que el hongo sigue sin recuperarse del efecto de los fungicidas, esto es cuando se inocula el hongo sin sustrato.

Cuando se inocula *Trichoderma virens* TVK1 en suelo con una fuente de sustrato se tiene que durante los 15 días de inoculación con el fungicida existe una diferencia en el crecimiento, es decir todavía hay inhibición del crecimiento, pero durante los 17 días el hongo ya está recuperándose y la diferencia de crecimiento es mínima. De todo esto se puede decir que si el hongo se encuentra en limitación de nutrientes se tiene que su efecto biocontrolador se reduce debido al estrés en que se encuentra, lo que resultó que durante los 45 días todavía se encuentra inhibido por el efecto de los fungicidas.

Posteriormente se realizó el ensayo de generar una cepa de *Trichoderma virens* (TVK1) resistente a un solo fungicida (Previcur), observando que logro tener el doble de crecimiento cuando se inoculaba una suspensión de esporas, en cambio cuando se inocula un bloque de micelio se tiene que también genero resistencia aumentando la velocidad de crecimiento pero en menor grado que cuando se inocula una suspensión de esporas.

Esto es debido a que Previcur es un fungicida que tiene un efecto de inhibición sobre el crecimiento de micelio no en la reproducción de esporas.

Sin embargo cuando la cepa de *T. virens* entrenada se inoculo en Captan los resultados fueron los mismos, es decir se creo resistencia a este fungicida al cual no fue entrenada, teniendo como resultado que aumento el doble de crecimiento cuando se inocula una suspensión de esporas que en bloque de micelio.

La resistencia generada en *T. virens* TVK1 fue compartida múltiple. Muchos son los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* pudo haber resistido a la acción de los fungicidas, sin embargo estos mecanismos son desconocidos. Por lo que se puede decir que la acción de los fungicidas fue inespecífica.

Otras de las observaciones fue que *Trichoderma* entrenada aumento su velocidad de crecimiento (PDA sin fungicida) en medio fresco que la cepa original esto es debido a la capacidad de sobrevivencia y adaptación en la que se encontró al estar en contacto con los fungicidas.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede establecer que:

- ❖ El sulfato de cobre resulto ser el fungicida por el cual presentan mayor resistencia natural las especies de *Trichoderma*.
- ❖ El estado de desarrollo del hongo que presento más sensibilidad al estar en contacto con los fungicidas fueron las conidias.
- ❖ Las tres cepas utilizadas de *Trichoderma* lograron presentar mayor resistencia cuando fueron inoculadas en tierra (tratada con fungicida).
- ❖ La resistencia que presentó *T. virens* TVK1 entrenada fue compartida es decir, creo resistencia a Previcur y Captan.

## BLIBLIOGRAFÍA

1. Teorema ambiental [serie en Internet] (Citado: Junio del 2006)  
<http://www.teorema.com.mx/articulos.php>
2. Alfredo Herrera-estrella y Carolina Carsolio. Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos [serie en Internet] (Citado: Noviembre del 2005)  
<http://www.hemerodigital.unam.mx>
3. Cook R.J., Baker, K.F (1983) La Naturaleza y Practica del Control Biológico de Patogenos de Plantas. Sociedad Americana de Fitopatología. St. Paul, Minnesota.
4. Jeffries P, Young TWK (1994). Relaciones Parasíticas entre Hongos. Instituto de Micología Internacional y CAB Internacional, Oxon.
5. Actividad metabólica de las cepas de Trichoderma spp. [serie en Internet] (Citado: Junio del 2006) <http://www.revfacagronluz.org.ve/v16>
6. Control biológico e integrado [serie en Internet] (Citado: Mayo del 2006)  
[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/montealegre\\_j/4.htm](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/4.htm)
7. Control biológico [serie en Internet] (Citado: Mayo del 2006)  
<http://www.agendaorganica.d/atecnicos7.htm>
8. Especies de Trichoderma [serie en Internet] (Citado: Junio del 2006)  
<http://www.doctorfungus.org/thefungi/Trichoderma.htm&sa>
9. Previcur [serie en Internet] (Citado: Abril del 2006)  
<http://www.press.bayer.es/comunicación/press>
10. Captan [serie en Internet] (Citado: Abril del 2006)  
<http://www.olca.cl/oca/plaguicidas/plag03.htm>
11. Fungicidas [serie en Internet] (citado: Septiembre del 2006)  
<http://www.fungicidas.org.com.mx>
12. Fungicidas [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
[http://www.agrosoluciones.dupont.com/esp/uso\\_seguro/alvarez2.shtml](http://www.agrosoluciones.dupont.com/esp/uso_seguro/alvarez2.shtml)
13. Sulfato de cobre [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
[http://es.wikipedia.org/wiki/sulfato\\_c%C3%BAprico](http://es.wikipedia.org/wiki/sulfato_c%C3%BAprico)
14. Oxiclورو de cobre [serie en Internet] (Citado: Abril del 2006)  
<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/insumosagropecuarios/agricolas/agroquimicos/bayer/previcur/caracteristicas.htm>

15. Trichoderma un hongo combatiente de patógenos [serie en Internet] (Citado: Junio del 2006) <http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id>
16. Control biológico [serie en Internet] (Citado: Noviembre del 2005) [http://www.controlbiologico.com/monog.trichobioll\\_introducción.htm](http://www.controlbiologico.com/monog.trichobioll_introducción.htm)
17. Importancia de los microorganismos del suelo [serie en Internet] (Citado: Diciembre del 2005) [http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos\\_beneficiosos\\_cultivos.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm)
18. Rodríguez Milach, Verónica Julia. Efecto Antagónico y Biocontrolador de Algunos Microorganismos Saprofíticos contra *Rhizoctonia solani* un Fitopatógeno causante del Damping Off en Plantas de Tomate. [Trabajo de Tesis para optar el título de Maestría]. UNMSM.
19. Carlos Cortés Penagos. Estudio de la Regulación del Gen *prb1* Involucrado en la Respuesta Micoparasitica de *Trichoderma harzianum*. [Trabajo de Doctorado en Ciencias- Biología Celular]. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. México,D.F. 2000
20. María Elena Ochoa Moreno. Antibiosis y Micoparasitismo de Cepas Nativas de *Trichoderma spp* sobre *Mycosphaerella fijiensis*. [Trabajo de Maestría en Ciencias- Biotecnología]. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México, 2002.
21. Benhamau N, Chet I (1997). Mecanismo Celular y Molecular Envueltos en la interacción entre *Trichoderma harzianum* y *Pythium ultimum*. Microbiología Aplicada y Medio Ambiente.
22. Baker R., y Griffin, G.J. (1995). Estrategias Moleculares para el Control Biológico de Hongos Patogenos de Plantas. Boca Ratón, Florida.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA-1994, Método para la cuenta de mohos y levaduras [serie de Internet] (Citado: Septiembre del 2006) <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>
24. Modo de acción del Captan [serie en Internet] (Citada: Abril del 2006) [http://www.basf.cl/asp-local/agro\\_prod\\_fichaweb.asp?prod\\_id=112](http://www.basf.cl/asp-local/agro_prod_fichaweb.asp?prod_id=112)
25. Captan [serie en Internet] (Citada: Abril del 2006) <http://www.tragusa.com/esint/catalogo/ficha.php?producto=122>
26. Fungicidas de contacto Agroeconómico [serie en Internet] (Citado: Abril del 2006) [http://www.agroeconomico.cl/articulos\\_detalle.php](http://www.agroeconomico.cl/articulos_detalle.php)

27. Metales pesados y genética de hongos [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
<http://www.qfb.umich.mx/trico.htm>
28. Manejo de la resistencia a fungicidas [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
<http://www.fruit.tfrec.wsu.edu/resistance/fungicide.htm>
29. Agroquímica [serie en Internet] (Citado: Mayo del 2006)  
[http://agroeco.org/doc/Bases\\_agroecologicas.htm](http://agroeco.org/doc/Bases_agroecologicas.htm)
30. Mecanismo de resistencia [serie en Internet] (Citado: Mayo del 2006)  
<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/12>
31. Comparación “*in vitro*” del control biológico y químico [serie en Internet] (Citado: Mayo del 2006) <http://www.revfacagronluz.org.ve/v167z031.html>
32. La besana [serie en Internet] (Citado: Mayo del 2005)  
<http://www.portalbesana.com/jsp/1stRevista.jsp>
33. Pesticidas y plaguicidas [serie de Internet] (Consulta: Junio del 2006)  
<http://canal-h.net/weds/sgonzalez002/Toxico/PESTICIDAS.htm>
34. Previcur [serie en Internet] (Citado: Abril del 2006)  
<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/insumosagropecuarios/agricolas/agroquimicos/bayer/previcur/default.htm>
35. Trichoderma [serie en Internet] (Citado: Abril del 2006)  
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>
36. Resistencia de patógenos a fungicidas [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
<http://www.encuentros.uma.es/encuentros96/poblaciones.htm>
37. Combinaciones sinérgicas a fungicidas [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
<http://www.aag.org.ar/noticia.asp?se=97&su=11&titu=comisioncanchas.jpg&noti=61>
38. Potencial evolutivo y estructura genética de poblaciones [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006) <http://www.encuentros.uma.es/encuentros96/poblaciones.htm>
39. Fungicidas [serie en Internet] (Citado: Agosto del 2006)  
<http://www.scielo.org.ve/scielo.php>