



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**INTERACCIÓN DE *Trichoderma viride* Y AGENTES QUÍMICOS
ANTIFÚNGICOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE
*Sclerotinia sclerotiorum***

CLAUDIA ORDÓÑEZ VALENCIA

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Interacción de *Trichoderma viride* y agentes químicos antifúngicos en el crecimiento y desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum***, realizada por la alumna **Claudia Ordóñez Valencia**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR:



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESORA:



DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

ASESOR:



DR. OSCAR GARCÍA BARRADAS

ASESOR:



DR. JOHN LARSEN

Montecillo, Texcoco, México, 10 de marzo de 2014



La presente tesis formó parte del proyecto **SEP-CONACYT 58594:**

“Hongos micorrízicos arbusculares en el metabolismo secundario de plantas hortícolas inoculadas con microorganismos antagónicos a hongos fitopatógenos”.

INTERACCIÓN DE *Trichoderma viride* Y AGENTES QUÍMICOS ANTIFÚNGICOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE *Sclerotinia sclerotiorum*

Claudia Ordóñez Valencia, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

Resumen

La presente investigación evaluó los efectos de la interacción entre el bicarbonato de potasio (KHCO_3), el fungicida iprodione y el hongo *Trichoderma viride*, para controlar el crecimiento y desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum*. Para ello, este trabajo fue dividido en tres capítulos experimentales. El primer capítulo evaluó el potencial antagónico de cuatro hongos filamentosos (*Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. y *Trametes versicolor*) contra *Sclerotinia sclerotiorum*, mediante confrontamientos *in vitro* y producción de enzimas como amilasas, lipasas, pectinasas, proteasas y celulasas. De los cuatro hongos *T. viride* tuvo mejor potencial antagónico. El segundo capítulo evaluó el crecimiento y desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, observando la estructura interna del esclerocio, y la interacción con *Trichoderma viride* sobre hifas y esclerocios crecidos en sistemas *in vitro*. Los esclerocios se originan a partir de ramificaciones dicotómicas de las hifas de *S. sclerotiorum* hasta conformar su estructura rígida. Cuando el esclerocio se incubó con esporas de *Trichoderma* durante 45 días, la médula fue destruida completamente. Finalmente, el capítulo tres describe el efecto de 10 mM de KHCO_3 y 0.25 mM del fungicida iprodione en el crecimiento *in vitro* (individual y en interacción), de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, así como en la germinación y formación de esclerocios de *S. sclerotiorum*. De los dos hongos *Trichoderma* fue más tolerante al KHCO_3 , y en el caso del fungicida el patógeno se inhibió completamente. A la par se evaluó el efecto de ambos compuestos químicos en el contenido de ácidos grasos en los dos hongos. El KHCO_3 y *Trichoderma viride* presentaron mayor control de *Sclerotinia sclerotiorum*, en comparación con el fungicida.

Palabras clave: micoparasitismo, fungicida, bicarbonato de potasio, ácidos grasos.

Trichoderma viride* AND ANTIFUNGAL COMPOUNDS ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF *Sclerotinia sclerotiorum

Claudia Ordóñez Valencia, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

Abstract

This research evaluated the interaction of potassium bicarbonate (KHCO₃), iprodione fungicide and the fungus *Trichoderma viride*, to controlling growth and development of *Sclerotinia sclerotiorum*. Therefore, this work was split in three experimental chapters. First chapter evaluated the antagonistic potential of four filamentous fungi (*Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. and *Trametes versicolor*) against *Sclerotinia sclerotiorum*, throughout *in vitro* confrontation and enzyme releasing such as amylases, lipases, pectinases, proteases and cellulases. From the four fungi, *T. viride* had better antagonistic potential. Second chapter evaluated growth and development of *Sclerotinia sclerotiorum* by means of light and scanning electronic microscopy, for observing the inner sclerotium structure, and the intimate interaction of *Trichoderma viride* on hyphae and sclerotia under *in vitro* system. Sclerotia originated from dichotomous branching of apical hyphal tips until the rigid structure was formed. After 45 days of incubating sclerotia with spores of *Trichoderma*, the medulla was completely destroyed. Finally, chapter three describes the effect of 10 mM of KHCO₃ and 0.25 mM of iprodione on the growth (alone or combined) of *T. viride* and *S. sclerotiorum*, as well as on the germination and formation of sclerotia. *Trichoderma* was the most tolerant fungal strain to KHCO₃, and the fungicide completely inhibited the growth of *Sclerotinia*. In addition, the effect of both antifungal compounds on the composition of fatty acids in both fungi was assessed. The KHCO₃ and *Trichoderma viride* showed better control towards *Sclerotinia sclerotiorum* than the fungicide.

Key words: mycoparasitism, fungicide, potassium bicarbonate, fatty acids.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por todas sus bendiciones y concederme la dicha de haber cumplido esta meta.

Al Colegio de Postgraduados, en particular al Área de Microbiología de suelos por permitirme realizar la investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante el doctorado. Número de becario 204637.

A cada uno de los integrantes de mi Consejo Particular por todos sus comentarios y aportaciones en la realización de este trabajo: Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dr. Alejandro Alarcón, Dra. Guadalupe J. Márquez Guzmán, Dr. Oscar García Barradas y Dr. John Larsen.

A la Biól. Greta Hanako Rosas Saito por el asesoramiento técnico en microscopía electrónica de barrido.

A la Biól. Yolanda Hornelas Orozco (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM) y al M. en C. Rafael E. Quintanar (FES Iztacala, UNAM) por su tiempo y disposición en la toma de las fotografías con el microscopio electrónico de barrido.

Al Dr. Mario Cobos Peralta por el apoyo para liofilizar las muestras.

A la Q. C. Susana Sánchez Alvarado y la Dra. Remedios Mendoza López (Unidad SARA, Universidad Veracruzana) por el apoyo y facilidades otorgadas para la realización de la investigación.

A los investigadores del Área de Microbiología: Dr. Juan José Almaraz, Dr. Jesús Pérez, M. en C. María Encarnación Lara y Dr. Julián Delgadillo por cada uno de sus consejos dados.

Al personal del Área de Microbiología: Manuel Solano, Lorenzo Viana, Edmundo Martínez y Rosario Galicia por su apoyo en cuestiones de laboratorio y administrativas.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de microbiología por su amistad, apoyo, consejos y momentos compartidos durante todo este tiempo: Alejandra, Vivian, Esmeralda, Miguel, Rosalba, Mariela, Blanca, Cristina, Yadira, Virginia, Elvia, Yessica, Claudia, Deisy, Brigsania, Francisco, Alicia, Violeta, Esther, Magda, Mario, Cristina A., Azucena, y a los chicos y chicas de Xalapa que me brindaron su amistad e hicieron amena mi estancia.

DEDICATORIAS

A mis padres por su amor, apoyo incondicional en todo momento, enseñanzas y consejos que siempre me han dado. Pero en especial a mi madre porque a pesar de aquellos momentos difíciles que pasó, siempre estuvo apoyándome y alentándome para seguir adelante.

Agradezco a Dios por la dicha de tener a los dos conmigo.

A mis hermanas y hermano porque siempre han sido un ejemplo a seguir, por todo su apoyo y cariño. Los quiero hermanos!!

A mi familia y amigos por su apoyo.

Contenido

	Pág.
Resumen	iii
Abstract	iv
Índice de Cuadros	xv
Índice de Figuras	xi
Capítulo I	
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo General	2
1.2.2 Objetivos Particulares	2
1.3 Hipótesis	3
1.3.1 Hipótesis General	3
1.3.2 Hipótesis Particulares	3
Capítulo II. Revisión de Literatura: Generalidades del control químico y biológico del hongo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
2.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4
2.1.2 Rango de hospedantes	5
2.1.3 Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5
2.1.4 Infección	6
2.1.5 Métodos de control	8
2.2 Fungicidas	9
2.2.1 Tipos de fungicidas	10
2.2.2 Mecanismos de acción	10

2.3 Control biológico	14
2.4 Sales de bicarbonato	17
2.5 Manejo integrado en el control de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20
Capítulo III. Potencial antagonico de hongos filamentosos hacia <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Resumen	21
Abstract	23
3.1 Introducción	25
3.2 Material y métodos	24
3.2.1 Caracterización de patógeno y antagonistas	24
3.2.2 Control biológico <i>in vitro</i>	25
3.2.2.1 Cultivos duales en cajas de Petri	25
3.2.2.2 Microcultivos Riddell	25
3.2.3 Actividad enzimática	26
3.3 Resultados y discusión	26
3.4 Conclusiones	37
Capítulo IV. Estudio microscópico de la interacción <i>Trichoderma viride-Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Resumen	38
Abstract	39
4.1 Introducción	40
4.2 Material y métodos	41
4.2.1 Microscopía óptica	41
4.2.1.1 Ontogenia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	41

4.2.2 Microscopía electrónica de barrido	42
4.2.2.1 Ontogenia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42
4.2.2.2 Estructura del esclerocio de <i>Sclerotium sclerotiorum</i>	43
4.2.2.3 Confrontación <i>in vitro</i>	43
4.2.2.4 Evaluación de germinación de esporas de <i>Trichoderma viride</i> sobre esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	44
4.2.2.5 Colonización de esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> parasitado por <i>Trichoderma viride</i>	45
4.2.2.6 Determinación del número de esporas vivas de <i>Trichoderma viride</i>	46
4.3 Resultados y discusión	46
4.3.1 Ontogenia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	46
4.3.2 Estructura del esclerocio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56
4.3.4 Confrontación <i>in vitro</i>	58
4.3.5 Germinación de esporas de <i>Trichoderma viride</i> sobre esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	59
4.3.6 Colonización de esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por <i>Trichoderma viride</i> ...	64
4.4 Conclusiones	71
Capítulo V. Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento y perfil de ácidos grasos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	
Resumen	72
Abstract	73
5.1 Introducción	74
5.2 Material y métodos	77
5.2.1 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	77

5.2.2 Efecto de iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i> , y sobre la germinación de esclerocios	77
5.2.3 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i> , solos o en interacción	78
5.2.3.1 Diseño experimental y análisis estadístico	79
5.2.4 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el contenido de ácidos grasos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	79
5.2.4.1 Cultivo de los hongos	79
5.2.4.2 Producción de micelio para análisis de ácidos grasos	79
5.2.4.3 Análisis de ácidos grasos	80
5.3 Resultados y discusión	81
5.3.1 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	81
5.3.2 Efecto de iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i> , y sobre la germinación de esclerocios	84
5.3.3 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i> , solos o en interacción	87
5.3.4 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el contenido de ácidos grasos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	91
5.4 Conclusiones	96
Capítulo VI. Conclusiones generales	97
Literatura citada	98
Anexo I	106
Anexo II	108

Índice de Figuras

		Pág.
Figura 2.1	Clasificación taxonómica (Bolton <i>et al.</i> , 2006) y red micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Ordóñez-Valencia)	4
Figura 2.2	Ciclo y síntomas de la enfermedad causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (modificado de Agrios, 1980)	7
Figura 2.3	Sitios de acción de diferentes fungicidas observados en hongos. aa=aminoácidos; RE=retículo endoplásmico (modificado de Petit <i>et al.</i> , 2012)	13
Figura 3.1	Crecimiento <i>in vitro</i> del fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y de los cuatro hongos antagonistas <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trametes</i> sp., <i>Trametes versicolor</i> y <i>Phanerochaete chrysosporium</i> durante 13 días de evaluación. n=4	27
Figura 3.2.	Cultivo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , de ocho días de crecido en medio de cultivo papa dextrosa agar. A) Colonia de color blanco, micelio algodonoso y esclerocios en proceso de maduración; B) Esclerocios maduros obtenidos de cultivo <i>in vitro</i>	28
Figura 3.3.	Aspecto de las colonias fúngicas al completar su crecimiento sobre el medio de cultivo, A) <i>Trichoderma viride</i> , B) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , C) <i>Trametes</i> sp. y D) <i>Trametes versicolor</i>	28
Figura 3.4.	Confrontamientos <i>in vitro</i> de hongos filamentosos contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A) <i>Trichoderma viride</i> (<i>Tv</i>); B) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (<i>Pc</i>); C) <i>Trametes</i> sp. (<i>T</i>); D) <i>Trametes versicolor</i> (<i>Trav</i>). Cultivos crecidos en medio PDA y observados a los doce días de confrontados	30
Figura 3.5.	Esclerocio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (<i>Ss</i>) degradado por <i>Trichoderma viride</i> (<i>Tv</i>) después de un mes de contacto	31
Figura 3.6.	Eventos observados en microscópio de luz, campo claro (60X), al confrontar <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (<i>Ss</i>) con A) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (<i>Pc</i>), B) <i>Trichoderma viride</i> (<i>Tv</i>), C) <i>Trametes</i> sp. (<i>Tsp</i>) y D). <i>T. versicolor</i> (<i>Trav</i>). Barra=10 μ m	32
Figura 3.7.	Actividad enzimática cualitativa de cuatro hongos antagonistas. La reacción enzimática en cada medio se consideró positiva por la presencia de halos alrededor de la colonia fúngica, y cristales precipitados en el caso de la actividad lipolítica. Dos a siete días (en caso de lipasas) de evaluación	35
Figura 3.8.	Actividad enzimática cualitativa que presenta <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> con la que puede actuar en contra de más de 400 especies de plantas. Dos a siete días (en caso de lipasas) de evaluación	36
Figura 4.1.	Microfotografías de luz (A-C y G-I) y microscopía electrónica de barrido (D-F y J-L) que muestran el desarrollo temprano de esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , previo a la etapa de iniciación. A y D) Crecimiento hifal (24 h). B-C y E-F) Ramificación dicotómica de las hifas (48 h). G-H y J-K)	

	Formación inicial de las agrupaciones de hifas (primordios de esclerocios) y pigmentación (72 h). I y L) Varios primordios desarrollándose en estrecha proximidad para conformar el esclerocio. Microfotografías de microscopía de luz tomadas con aumento 10X (A-C y G-H) y 2X (I). Barra 50 μ m	48
Figura 4.2.	Cultivo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crecido en medio papa dextrosa agar durante nueve días. A) El micelio cubre por completo la caja de Petri al cuarto día, B) Agregación de hifas aéreas (iniciación) que darán origen a los esclerocios (observado al quinto día), C) Esclerocios en proceso de desarrollo, condensación de hifas y exudación (séptimo día), y D) Esclerocios maduros, con una corteza seca y melanizada (novenno día)	50
Figura 4.3.	Diferenciación del esclerocio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A-C) Esclerocio en etapa de iniciación, quinto día de sembrado el cultivo. D-F) Abultamiento de micelio entrelazado al sexto día	51
Figura 4.4.	Esclerocio en etapa de desarrollo, observado al séptimo día de sembrado el cultivo fúngico. A) Estructura globosa del esclerocio en desarrollo, B) Hifas entrelazadas que darán origen a la corteza, C-F) Acercamiento de la red micelial que cubre la superficie del esclerocio	52
Figura 4.5.	Esclerocio en proceso de maduración, al octavo día después de sembrado el cultivo fúngico. A) Estructura esférica, B) Micelio cubriendo la superficie del esclerocio, C) Capa membranosa que comienza a desarrollarse sobre la superficie del esclerocio, D) Hifas proyectándose hacia el exterior, E y F) Células globosas (c) de las puntas hifales	54
Figura 4.6.	Esclerocio maduro después de nueve días de sembrado el hongo. A) Vista panorámica del esclerocio; B) Superficie de la corteza con apariencia rugosa; C) Cavidades sobre la superficie (flecha); D) Células de la corteza debajo de la red hifal; E y F) Células globosas (c) y con textura lisa, en ocasiones cubiertas por una membrana (M)	55
Figura 4.7.	Corte transversal de un esclerocio maduro de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A) Vista panorámica de las partes que conforman al esclerocio maduro: corteza (c) y médula (m); B) Acercamiento de corteza y médula; C) Células que conforman la corteza del esclerocio; D) Médula, en la que se pueden apreciar espacios interhifales (e)	57
Figura 4.8.	Fotografías tomadas a lo largo del esclerocio. A) Extremo izquierdo; B y C) Región interna; D) Extremo derecho	57
Figura 4.9.	Interacciones entre <i>Trichoderma viride</i> (Tv) y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Ss). A) Abundante crecimiento de <i>Trichoderma</i> sobre el patógeno; B y C) Estrangulamiento del patógeno por el hongo antagonista y crecimiento sobre hifa del patógeno; D-I) Pérdida de contenido citoplasmático y daño a la hifa por la presencia del antagonista	59
Figura 4.10.	Esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sumergidos en suspensión de esporas de <i>Trichoderma viride</i> (Experimento I). A-D) Testigo, esclerocio sin esporas de <i>T. viride</i> ; E-H) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> sin incubar; I-L)	

	Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 12 h; M-P) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 24 h; Q-T) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 30 h, espora en proceso de germinación (flecha)	61
1		
Figura 4.11.	Esclerocios sumergidos en agua destilada estéril y arrastrados sobre cultivo de <i>Trichoderma viride</i> (Experimento IIa). A-D) Testigo, esclerocio sin esporas de <i>T. viride</i> ; E-H) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> sin incubar; I-L) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 12 h; M-P) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 24 h; Q-T) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 30 h	62
Figura 4.12.	Esclerocios sumergidos en caldo papa dextrosa y arrastrados sobre cultivo de <i>Trichoderma viride</i> (Experimento IIb). A-D) Testigo, esclerocio sin esporas de <i>T. viride</i> ; E-H) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> sin incubar; I-L) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 12 h; M-P) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 24 h; Q-T) Esclerocio con esporas de <i>T. viride</i> incubado durante 30 h	63
Figura 4.13.	Microfotografías del esclerocio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> parasitado por <i>Trichoderma viride</i> (<i>Tv</i>), 16 días de incubación. Testigo (A-D): A) Esclerocio sin esporas de <i>T. viride</i> mostrando su textura rugosa; B) Superficie de la corteza del esclerocio; C) Células que conforman la corteza del esclerocio (flecha); D) Estructura interna del esclerocio, mostrando la corteza (C) y la médula (M). Esclerocio parasitado por <i>Trichoderma viride</i> (E-H): E) Colonización del esclerocio por <i>T. viride</i> ; F-G) Hifas y esporas de <i>T. viride</i> creciendo sobre la superficie del esclerocio; H) Corte transversal del esclerocio, en contacto con <i>T. viride</i> , que muestra que la médula comienza a colapsar	67
Figura 4.14.	Microfotografías del esclerocio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> parasitado por <i>Trichoderma viride</i> (<i>Tv</i>), después de 30 días de incubación. Testigo (A-D): A) Esclerocio sin esporas de <i>T. viride</i> ; B) Aspecto de la corteza del esclerocio; C) Hundimientos característicos de la superficie del esclerocio; D) Estructura interna del esclerocio en la que se aprecia la corteza (C) y la médula (M). Esclerocio parasitado por <i>Trichoderma viride</i> (E-H): E) Esclerocio micoparasitado en el que se observa degradación de la estructura; F-G) Hifas y esporas de <i>T. viride</i> creciendo sobre la superficie del esclerocio; H) Colapso del esclerocio ocasionando la pérdida de la integridad de la médula	68
Figura 4.15.	Microfotografías del esclerocio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> parasitado por <i>Trichoderma viride</i> (<i>Tv</i>), después de 45 días de incubación. Testigo (A-D): A) Esclerocio sin esporas de <i>T. viride</i> ; B) Superficie rugosa del esclerocio; C) Células que conforman la corteza del esclerocio (flecha); D) Estructura interna del esclerocio mostrando corteza (C) y médula (M). Esclerocio parasitado por <i>Trichoderma viride</i> (E-H): E) Superficie del esclerocio micoparasitada por <i>Trichoderma viride</i> ; F-G) Esporas de <i>T. viride</i> creciendo sobre la superficie del esclerocio; H) Médula completamente degradada por el contacto de hifas (H) de <i>Trichoderma</i>	69
Figura 5.1.	Crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> en PDA ante concentraciones crecientes de bicarbonato de potasio (KHCO ₃), durante seis días de evaluación. A-F) 0 a	82

	10 mM donde el hongo cubrió por completo el medio de cultivo; G-J) 25-40 mM el crecimiento fue inhibido y disminuyó la esporulación	82
Figura 5.2.	Efecto negativo del fungicida iprodione en el crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> durante siete días de crecimiento. A) Testigo, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 6 mM, E) 8 mM, F) 10 mM, G) 25 mM, H) 30 mM, I) 35 mM y J) 40 mM	83
Figura 5.3.	Crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ante concentraciones crecientes de bicarbonato de potasio (KHCO ₃), durante seis días de crecimiento. A) Testigo, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 6 mM, E) 8 mM, F) 10 mM, G) 25 mM, H) 30 mM, I) 35 mM y J) 40 mM	84
Figura 5.4.	Efecto tóxico del fungicida iprodione sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en seis días de crecimiento. A) Testigo, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 6 mM, E) 8 mM, F) 10 mM, G) 25 mM, H) 30 mM, I) 35 mM y J) 40 mM	84
Figura 5.5.	Efecto del fungicida iprodione aplicado en bajas concentraciones, en el crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , y en la germinación de esclerocios de <i>Sclerotinia</i> , después de siete días. Serie A) Efecto en el crecimiento de <i>T. viride</i> . El tratamiento testigo (0 mM) completó su crecimiento y formó esclerocios a diferencia de los tratamientos con el fungicida (0.25 a 1.5 mM). Serie B) efecto en el crecimiento de <i>S. sclerotiorum</i> , mostrando crecimiento arrosetado (0.5 mM) y sobre el disco de PDA inoculado (1.5 mM). Serie C) Efecto inhibitorio de la germinación de esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i>	86
Figura 5.6.	Crecimiento de la colonia de <i>Trichoderma viride</i> (A) y de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (B) en presencia de bicarbonato de potasio (KHCO ₃) y del fungicida iprodione durante siete días de evaluación	88
Figura 5.7.	Efecto del bicarbonato de potasio (KHCO ₃) y del fungicida iprodione en el crecimiento y capacidad antagónica de <i>Trichoderma viride</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , durante siete días de evaluación. Serie A) Efecto en el crecimiento de <i>T. viride</i> ; Serie B) Efecto en el crecimiento de <i>S. sclerotiorum</i> ; Serie C) Confrontación <i>T. viride</i> y <i>S. sclerotiorum</i> en los diferentes tratamientos, donde se puede observar la zona de contacto entre ambos hongos, caracterizada por una barrera	89

Índice de Cuadros

	Pág.
Cuadro 3.1 Actividad enzimática cualitativa de hongos antagonistas y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	34
Cuadro 4.1. Unidades formadoras de colonias (UFC) de esporas vivas de <i>Trichoderma</i> por esclerocio en cada experimento	60
Cuadro 6.1. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en micelio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	91
Cuadro 6.2. Contenido de ácidos grasos en micelio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	93

CAPÍTULO I.

1.1 INTRODUCCIÓN

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es un patógeno destructivo de muchos cultivos importantes (Hegedus y Rimmer, 2005), dado que posee poca especificidad hacia un hospedante infecta a más de 400 especies de plantas (Fernando *et al.*, 2004; Hegedus y Rimmer, 2005), además produce esclerocios, estructuras de resistencia que pueden permanecer viables por muchos años en el suelo (Bolton *et al.*, 2006). Su control se basa generalmente en la aplicación de fungicidas, tales como iprodione, benomil, clorotalonil y metil-tiofanato, los cuales son efectivos bajo condiciones de campo (Saharan y Mehta, 2008); sin embargo, su uso excesivo ha provocado que los suelos se contaminen o bien, que el patógeno adquiera resistencia (Palmer *et al.*, 1997; Palou *et al.*, 2001).

Una alternativa para lograr el control de este hongo fitopatógeno y minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia, es el empleo de bicarbonatos y hongos antagonistas. Los bicarbonatos son efectivos para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos en postcosecha, debido a que poseen propiedades antimicrobianas de amplio espectro (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006). Por otro lado, se han identificado hongos antagonistas y/o micoparásitos de *S. sclerotiorum*, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio o de parasitar y destruir los esclerocios (Mónaco *et al.*, 1998). Entre ellos se incluyen principalmente especies del género *Trichoderma* (Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004), debido a que son fáciles de aislar y cultivar, de rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de varios fitopatógenos (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Por lo anterior, los bicarbonatos y *Trichoderma*, por si solos o en combinación, podrían ser empleados para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, garantizando una eficacia similar o superior a los fungicidas sintéticos, sin los problemas que éstos generan. Además, en el caso específico de *Sclerotinia sclerotiorum*, al no permitir la formación o germinación de los esclerocios se estaría rompiendo el ciclo de vida del patógeno y por lo tanto impidiendo su propagación.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General.

- Evaluar la interacción entre agentes biológicos y químicos en el crecimiento y desarrollo del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

1.2.2 Particulares.

- Evaluar la actividad enzimática *in vitro* de hongos filamentosos y del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Observar mediante microscopía electrónica de barrido la morfología e interacción micoparasítica entre *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Evaluar el efecto de diferentes dosis de bicarbonato de potasio e iprodione en el crecimiento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.
- Determinar la variación de la composición de ácidos grasos de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride* en presencia de bicarbonato de potasio e iprodione.

1.3 HIPÓTESIS

I.3.1 General

- La interacción de agentes biológicos y químicos afecta el crecimiento y desarrollo del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

I.3.2 Particulares

- Los hongos filamentosos tienen mayor actividad enzimática que *Sclerotinia sclerotiorum*.
- La microscopía electrónica de barrido permitirá observar con mayor detalle la morfología e interacción micoparasítica de *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Las diferentes dosis de bicarbonato de potasio e iprodione afectarán el crecimiento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* y de *Trichoderma viride*.
- La composición de los ácidos grasos de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride* se verá afectada por la presencia de bicarbonato de potasio e iprodione.

CAPÍTULO II.

REVISIÓN DE LITERATURA:

GENERALIDADES DEL CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO DEL HONGO

Sclerotinia sclerotiorum

2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es un hongo ascomiceto (Figura 2.1) destructivo de muchos cultivos de importancia económica (Hegedus y Rimmer, 2005; Bolton *et al.*, 2006) que se encuentra distribuido en todo el mundo debido a que posee poca especificidad hacia la infección de una especie en particular (Fernando *et al.*, 2004). Se caracteriza por producir esclerocios, estructuras multihifales y pigmentadas, consideradas de resistencia porque pueden permanecer viables en el suelo por largos periodos aún bajo condiciones desfavorables (Bolton *et al.*, 2006; Bae y Knudsen, 2007).

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Discomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Sclerotinia</i>
Especie	<i>sclerotiorum</i>

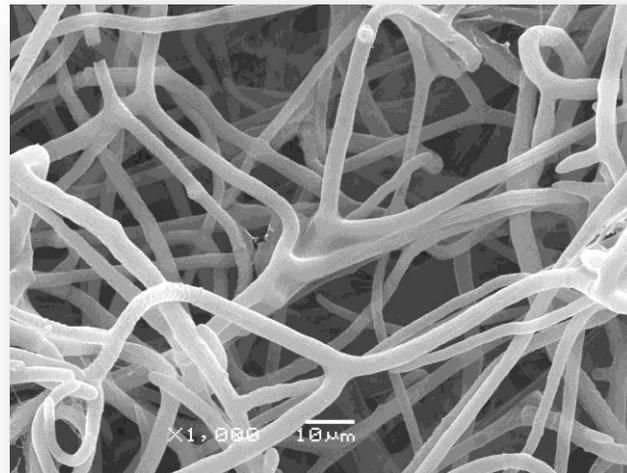


Figura 2.1. Clasificación taxonómica (Bolton *et al.*, 2006) y red micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ordóñez-Valencia).

2.1.2 Rango de hospedantes

Sclerotinia sclerotiorum es un patógeno necrótico que ataca alrededor de 408 especies de plantas cultivadas, silvestres, ornamentales y medicinales (Boland y Hall, 1994; Subbarao, 1998; Fernando *et al.*, 2004; Hegedus y Rimmer, 2005) que pertenecen a 278 géneros y muchas se ubican dentro de las familias Solanaceae, Cruciferae, Asteraceae, Chenopodiaceae y Fabaceae (Subbarao, 1998; Fernando *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2006). Dentro de los cultivos de importancia económica, los hospedantes más susceptibles a ser atacados son frijol, papa, lechuga, girasol, soya, cacahuete, zanahoria, calabaza (Saharan y Mehta, 2008).

2.1.3 Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*

Los esclerocios juegan un papel importante en el ciclo biológico y de infección de *S. sclerotiorum* puesto que son la principal vía por la que el hongo se propaga a través del suelo (Rollins y Dickman, 1998; Saharan y Mehta, 2008).

Dependiendo de las condiciones ambientales, los esclerocios pueden germinar de dos formas:

- 1) formando el micelio que penetra en las raíces y generando podredumbre y marchitamiento, o
- 2) produciendo apotecios en los cuales se originan ascosporas que infectan parte de la planta hospedante (Mónaco *et al.*, 1998; Bolton *et al.*, 2006). Cuando germinan vía apotecios pueden producir uno o varios de éstos en el mismo esclerocio, los apotecios normalmente tienen forma de copa pero a veces son extendidos y llanos con un pequeño orificio central (Saharan y Mehta, 2008), generalmente son de color blanco, amarillo o café. Las ascas son cilíndricas que miden de $130 \times 10 \mu\text{m}$, y contienen ocho ascosporas binucleadas, las cuales son hialinas, no septadas, elípticas y miden de $9 \text{ a } 13 \times 4 \text{ a } 5 \mu\text{m}$ (Subbarao, 1998). Las hifas de *S. sclerotiorum* son hialinas, septadas, ramificadas, multinucleadas y no producen conidios (Bolton *et al.*, 2006).

El desarrollo de los esclerocios se caracteriza por tres estados: 1) iniciación: agregación de hifas, 2) desarrollo: crecimiento hifal para incrementar el tamaño, y 3) maduración: delimitación de la superficie, consolidación interna y melanización (Rollins y Dickman, 1998; Bolton *et al.*, 2006). Cuando el esclerocio ha alcanzado su madurez, su estructura está formada por tres regiones: 1) Corteza, constituye la capa externa del esclerocio, es gruesa y pigmentada; 2) Córtez, capa intermedia, hialina, delgada y compuesta por tejido pseudoparenquimatoso y 3) Médula, región constituida por tejido prosenquimatoso, de color blanco y embebida en una matriz gelatinosa (Willets and Wong, 1971; Bardin y Huang, 2001).

2.1.4 Infección

Las condiciones ambientales que favorecen la infección son humedad alta y temperaturas entre 15 y 25 °C (Subbarao, 1998). El micelio ataca las partes de la planta que están en contacto con el suelo, y una vez invadidas, las hifas comienzan a ramificarse y a formar apresorios que penetran directamente el tejido cortical (Saharan y Mehta, 2008). Después de la penetración, se forma una vesícula, a partir de la cual se desarrollan hifas que crecen y fácilmente invaden las células y los espacios intercelulares destruyendo la pared subcuticular de la epidermis (Hegedus y Rimmer, 2005). Para facilitar la infección en el hospedante, el hongo produce ácido oxálico (AO) y secreta enzimas que ablandan y degradan los tejidos vegetales (Fernando *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2006). Con la producción de AO el hongo acidifica la zona inmediata en la que se encuentra, generando un efecto tóxico sobre el tejido del hospedante y el secuestro del calcio presente en las láminas medias de las paredes celulares de las plantas, provocando así su debilitamiento (Hegedus y Rimmer, 2005). Por el contrario, las celulasas, pectinasas, aspartilproteasas y

endopoligalacturonas actúan a distancia con relación a la zona donde se encuentra el micelio (Fernando *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2006).

Una vez infectada la planta, el hongo invade el tejido cortical con bastante rapidez, sin síntomas visibles, hasta que la planta se marchita. A medida que la enfermedad avanza, el tejido presenta necrosis y abundante micelio blanco y algodonoso (Figura 2.2), a partir del cual se formarán los esclerocios (Bolton *et al.*, 2006). Se ha observado que una planta puede infectar a otra sólo por contacto, y que los tejidos muertos proveen nutrientes para el establecimiento del patógeno (Hegedus y Rimmer, 2005).

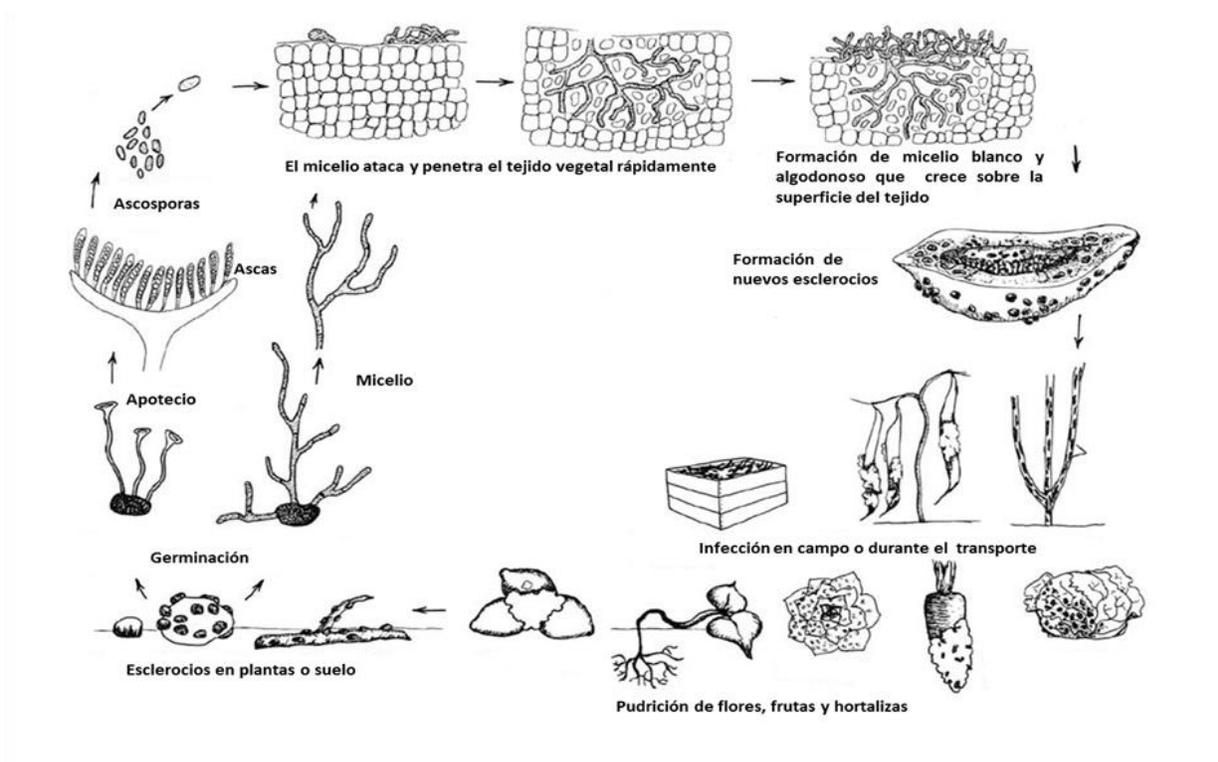


Figura 2.2. Ciclo y síntomas de la enfermedad causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (modificado de Agrios, 1980).

2.1.5 Métodos de control

El control de *Sclerotinia sclerotiorum* es difícil debido al amplio intervalo de hospedantes y a la capacidad de los esclerocios de permanecer viables por varios años (Bae y Knudsen, 2007). Algunos de los métodos más empleados para disminuir la incidencia de la enfermedad causada por el patógeno se mencionan a continuación:

Físicos. Dentro de estos métodos, la solarización es el más empleado y consiste en cubrir el suelo con una película de plástico transparente para que de esta manera la energía solar se aproveche e incremente la temperatura a niveles letales para inactivar malezas, plagas y patógenos (Fernando *et al.*, 2004). El calentamiento del suelo debe ser a temperaturas entre 36 y 50 °C, y a 30 cm de profundidad (Arias *et al.*, 2007). Los efectos resultantes de este método son inducción de supresividad, debilitamiento de propágulos, liberación de gases, cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo, y estimulación del crecimiento vegetal (Zavaleta-Mejía, 1999).

Culturales. Las prácticas culturales se utilizan a menudo para evitar la propagación del patógeno, incluyen: selección del sitio, labranza reducida, rotación de cultivos, fertilidad del suelo, fecha de siembra, elección del cultivar, distancia entre surcos, densidad de siembra, control de malezas, raleo y manejo del riego (Tu, 1997). La rotación de cultivos se considera como el método más limitado, dada la amplia gama de hospedantes susceptibles a ser atacados por *S. sclerotiorum* (Clarkson y Whipps, 2002; Fernando *et al.*, 2004). Además, es necesario rotar los cultivos mínimo 5 años con cultivos no susceptibles al patógeno para reducir el nivel de infección (Fernando *et al.*, 2004).

Químicos. Existen diferentes grupos de fungicidas recomendados para el control del patógeno, tal es el caso de benzimidazoles y dicarboximidas (Saharan y Mehta, 2008). Los tratamientos químicos incluyen como ingredientes activos benomil, captán, clorotalonil, diclorán,

procimidona, folpet, metil-tiofanato, tiabendazol, vinclozolin e iprodione (Bardin y Huang, 2001; Arias *et al.*, 2007; Saharan y Mehta, 2008). Aún y cuando la aplicación de fungicidas es el método más empleado, no siempre son efectivos y seguros para el ambiente, además algunos son caros y se ha reportado que inducen resistencia al patógeno (Tu, 1997; Lu, 2003).

Biológicos. Se han reportado más de 30 especies entre bacterias y hongos como antagonistas y micoparásitos de *Sclerotinia* (Subarao, 1998), dentro de los cuales se encuentran *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Bacillus amyoliquefaciens* (Saharan y Mehta, 2008) y especies del género *Trichoderma* (Howell, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004; Fernando *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004). *Coniothyrium minitans* y las diferentes especies de *Trichoderma* son considerados como micoparásitos destructivos de *S. sclerotiorum* porque degradan los tejidos de los esclerocios (Arias *et al.*, 2007). Por ello se han desarrollado varios productos comerciales con base en estos hongos para el control de enfermedades causadas por el patógeno, los cuales para obtener un resultado satisfactorio, se deben aplicar cuando el hongo se encuentre en forma de esclerocio o cuando comienza a germinar pues es más vulnerable a ser atacado (Saharan y Mehta, 2008).

La integración de varios métodos ayudaría a obtener mejores resultados en el control de *Sclerotinia sclerotiorum*.

2.2 FUNGICIDAS

Por muchos años los agricultores han aplicado productos químicos a los cultivos a fin de evitar pérdidas por el ataque de enfermedades, los fungicidas constituyen uno de los métodos más comúnmente empleados en la agricultura para el control de enfermedades ocasionadas por hongos (García *et al.*, 2003). Varios fungicidas se encuentran disponibles en el mercado, con

diferentes propiedades en cuanto a sistemicidad, especificidad, duración de la actividad y riesgo de resistencia (Gisi y Sierotzki, 2008).

2.2.1 Tipos de fungicidas

Los fungicidas pueden ser clasificados en dos principales categorías: de contacto y sistémicos. Los primeros, tienen una acción preventiva al matar al hongo y sus esporas germinadas, antes de que el micelio pueda crecer y desarrollarse dentro de los tejidos de la planta. Los segundos, conocidos como curativos o erradicantes, matan el hongo cuando el micelio ha penetrado el parénquima del tejido vegetal, deteniendo así la infección en la planta (García *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2012).

2.2.2 Mecanismos de acción

Los fungicidas pueden actuar sobre la síntesis de lípidos, esteroides y otros componentes de membrana (García *et al.*, 2003; Avis, 2007), aminoácidos y síntesis de proteínas (Avis, 2007), transducción de señales, respiración, mitosis y división celular, síntesis de ácidos nucleicos, e incluso algunos otros pueden actuar en diversos sitios (Figura 2.3, Yang *et al.*, 2011).

A) Efecto sobre la síntesis de lípidos, esteroides y otros componentes de membrana. Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBE) interfieren en la biosíntesis del ergosterol, principal componente de las membranas celulares de la mayoría de los hongos (Ma y Michailides, 2005; Avis, 2007). En función del sitio de acción son capaces de inhibir reacciones de isomerización (morfolinas) o la desmetilización (DMI) de los carbonos C₄ o C₂₄, en dos posibles precursores del ergosterol, lanosterol y 24-metilendehidrolanosterol, respectivamente. Químicamente, los fungicidas IBE corresponden a imidazoles, piperazinas, piridinas, pirimidinas

y triazoles (Siegel, 1981; Yang *et al.*, 2011). El diclorán es considerado como fototóxico, ya que hongos expuestos a este fungicida, llegan a ser sensibles a la radiación solar, con lo cual se destruye la estructura del ácido linoleico, un lípido común de la membrana celular. El etridiazol causa la hidrólisis de los fosfolípidos en ácidos grasos libres y lisofosfátidos, provocando la lisis de las membranas (Yang *et al.*, 2011).

B) Efecto sobre aminoácidos y síntesis de proteínas. Varios fungicidas interfieren con la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, afectando las funciones biológicas de los microorganismos impactados. El pirimetanil, el ciprodinil y el mepanipirim inhiben la síntesis de metionina (Buchenauer y Walker, 2007; Yang *et al.*, 2011).

C) Efecto sobre transducción de señales. El fludioxonil inhibe la germinación de esporas, elongación del tubo germinativo y crecimiento del micelio en *Botrytis cinerea* y está relacionado con la interferencia en la vía de transducción de señales osmorregulatorias del hongo. También presenta efecto inhibitorio sobre un gran número de genes involucrados en uno de los dos componentes del sistema de transducción de señales en hongos filamentosos (Yang *et al.*, 2011).

D) Efecto sobre síntesis de ácidos nucleicos. Los fungicidas del grupo de las Fenilamidas afectan la síntesis de ácidos nucleicos inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa I. El metalaxil, interfiere con la síntesis del ácido nucleico a través de la inhibición de la actividad de la ARN polimerasa I bloqueando así la síntesis del ARNr a nivel de la transcripción de la uridina (Yang *et al.*, 2011). Los fungicidas del grupo de los dicarboximidas, como el iprodione y el vinclozolin, muestran diferentes efectos incluyendo inestabilidad mitótica, segregación somática de

cromosomas, inhibición de síntesis de ADN, inhibición de síntesis de pared celular e incremento en los niveles de ácidos grasos libres (Orth *et al.*, 1992).

E) Efectos sobre respiración. Algunos fungicidas se han reportado como inhibidores de la respiración, al afectar el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en el hongo (Yang *et al.*, 2011). El diflumetorim, inhibe la actividad oxido-reductasa de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) conduciendo a la muerte celular, mientras que el boscalid, el carboxin y el flutolanil causan una disfunción de la succinato deshidrogenasa (SDH) en el ciclo tricarboxílico y la cadena transportadora de electrones, inhibiendo la actividad del Complejo II y respiración en las células fúngicas (Gisi y Sierotzki, 2008; Yang *et al.*, 2011).

F) Efecto sobre mitosis y división celular. Los fungicidas del tipo de los benzimidazoles tienen impacto sobre la mitosis y división celular, sus efectos inhibitorios se observan sobre la polimerización de tubulina dentro de los microtúbulos. El benomil y el carbendazim, dos de los fungicidas más populares dentro de este grupo, tienen la capacidad de inhibir la mitosis en los hongos (Yang *et al.*, 2011). Además el segundo, inhibe el desarrollo de los tubos germinales y la formación de apresorios (García *et al.*, 2003).

G) Fungicidas con actividad multisitio. Estos fungicidas son empleados en las actividades agronómicas, debido a sus amplios sitios de impacto para el control de enfermedades. Dentro de estos se ubican el clorotalonil, el mancozeb, el captán, el tiram, así como aquellos a base de sulfatos (Yang *et al.*, 2011).

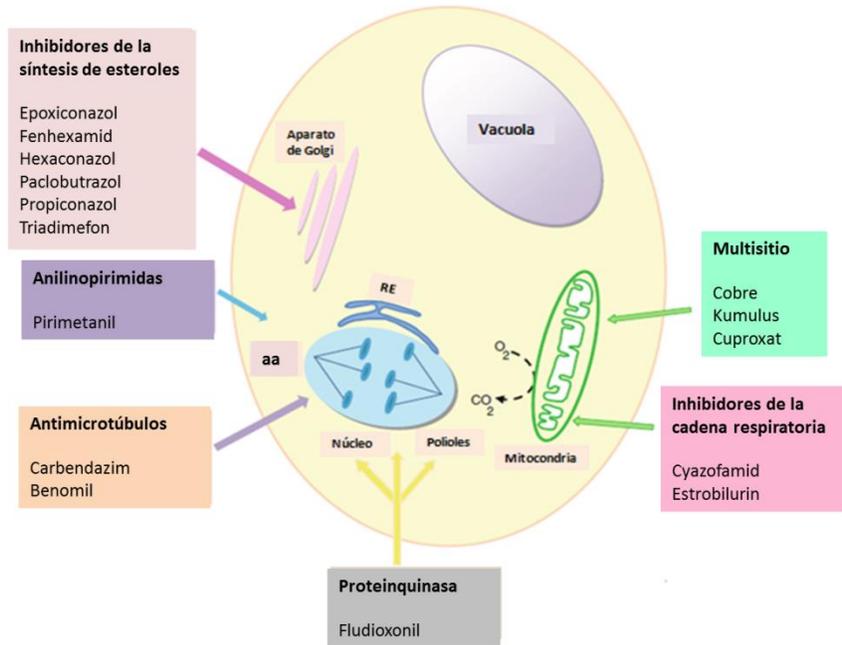


Figura 2.3. Sitios de acción de diferentes fungicidas observados en hongos. aa=aminoácidos; RE= retículo endoplásmico (modificado de Petit *et al.*, 2012).

El uso de fungicidas permite una protección efectiva contra una amplia variedad de patógenos pero al mismo tiempo, a largo plazo, pueden generar residuos en alimentos y ambiente, cepas resistentes a éstos o afectar a otros microorganismos del suelo. Por ejemplo, el dimetomorf puede influir en la actividad de las bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno, causando impacto sobre los procesos de nitrificación y amonificación (Yang *et al.*, 2011). Otros interfieren con las vías metabólicas de las plantas y pueden afectar los procesos fotosintéticos (García *et al.*, 2003). Así, el triadimefon, el propiconazol, el hexaconazol y el paclobutrazol pueden presentar fitotoxicidad para los cultivos y efectos estimulantes sobre la fisiología de las plantas (Petit *et al.*, 2012).

2.3 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es el empleo de organismos que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas (Serrano y Galindo, 2007). Estos organismos son conocidos como agentes de biocontrol, biocontroladores, antagonistas u organismos antagónicos (Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007a). Las principales ventajas que ofrece este tipo de práctica son bajo costo, no contamina el ambiente y no presenta problemas de residuos; sin embargo, las investigaciones publicadas han sido obtenidas principalmente *in vitro* y bajo condiciones controladas (Elad *et al.*, 1999).

En el caso de los patógenos con hábitos radicales, los organismos más empleados para el control de enfermedades en los diferentes cultivos corresponden a bacterias y hongos. Los mecanismos empleados para dicho fin son competencia por espacio o nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, micoparasitismo (Ezziyyani *et al.*, 2004) e inducción de resistencia en la planta (Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Corrêa *et al.*, 2007); los cuales pueden operar de manera independiente o simultánea (Howell, 2003).

Competencia por espacio o nutrientes. La similitud de los hábitos alimentarios, tanto de los patógenos como de los antagonistas, constituye una de las principales bases de la competencia como mecanismo de control (Viterbo *et al.*, 2007). Por lo tanto, la competencia por nutrientes tales como hierro, nitrógeno y carbono puede ser una solución para el control de patógenos del suelo (Jensen y Lumsden, 1999). Por ejemplo, muchos patógenos necesitan hierro para vivir (Alexander, 1980), y algunas especies del género *Trichoderma* producen sideróforos encargados de quelatarlo por lo que al ya no estar disponible para el patógeno, éste comienza a limitar su

crecimiento (Benítez *et al.*, 2004). En el caso de competencia por espacio, si los sitios de infección están ocupados por el antagonista, el patógeno tendrá dificultades para establecerse en el tejido vegetal (Howell, 2003).

Antibiosis. La antibiosis se considera como la inhibición o destrucción de un organismo a través de la producción de compuestos tóxicos, volátiles, no volátiles y enzimas líticas de otro organismo (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Viterbo *et al.*, 2007). Muchos microorganismos producen y secretan uno o más compuestos con actividad antibiótica (Heydari y Pessaraki, 2010), estos compuestos disuelven o dañan polímeros estructurales de la pared celular de patógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2007). Los hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* tienen el potencial para producir diferentes metabolitos secundarios, de los cuales algunos funcionan como antibióticos ya que se ha reportado que en evaluaciones *in vitro*, inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Jensen y Lumsden, 1999). *Gliocladium virens* produce Gliovirin, un antibiótico que actúa sobre el hongo *Pythium ultimum* provocando la coagulación de su protoplasma (Viterbo *et al.*, 2007).

Micoparasitismo. El micoparasitismo se define como el ataque directo de un hongo sobre otro hongo, y es un proceso que involucra eventos secuenciales como reconocimiento, ataque, penetración y muerte del hospedante (Benítez *et al.*, 2004). Generalmente, el desarrollo de las hifas es directo hacia las hifas del hongo patógeno, a las que se adhiere y penetra, para extraer los nutrimentos, provocando con ello daños en las zonas de contacto (Howell, 2003).

De acuerdo a Barnett y Binder el micoparasitismo se clasifica en: 1) Necrotrófico en el cual el resultado de la relación es la destrucción y muerte del hospedante, y 2) Biotrófico donde el desarrollo del parásito es favorecido por una estructura viva del hospedante (Viterbo *et al.*,

2007). Dentro del micoparasitismo biotrófico se distinguen tres grupos: 1) Micoparásitos internos, los cuales causan poco daño al hospedante en la fase temprana de su desarrollo, pero conforme se acerca el momento de la esporulación se incrementa, 2) Micoparasitismo biotrófico por contacto, se lleva a cabo por el extremo de la hifa donde hay una célula reguladora, que al entrar en contacto con la superficie de la pared del hospedante aumenta la permeabilidad de la membrana, y permite con ello mayor aporte de sustancias para el parásito, y 3) Micoparasitismo biotrófico haustorial, el contacto entre las hifas del parásito y del hospedante da lugar a la formación de un apresorio, posteriormente la invasión se lleva a cabo a través de la pequeña prolongación de una hifa digitiforme que penetra a la célula hospedante, y se ramifica produciendo una estructura absorbente llamada haustorio (Baker, 1987; Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007b).

Los principales eventos que constituyen el micoparasitismo son el enrollamiento de hifas, formación de haustorios y apresorios (Boosalis, 1964), aposiciones en la pared celular, intervención enzimática que promueve cambios en el micelio y estructuras reproductivas del hospedante como lisis, arrugamiento, explosión y colapso (Ferrera-Cerrato, 1977). La producción de enzimas quitinasas, glucanasas y proteasas, se considera parte del micoparasitismo, ya que parecen actuar sinérgicamente debilitando la pared celular de los hongos patógenos (Benítez *et al.*, 2004).

Varios investigadores consideran al micoparasitismo como uno de los principales mecanismos para el control biológico de patógenos; por ello se piensa que este potencial podría explotarse comercialmente en la agricultura (Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007b).

Inducción de resistencia. La inducción de resistencia consiste en la estimulación, por parte de moléculas activadoras, de los mecanismos de defensa en el hospedante (Howell, 2003), estas

moléculas incluyen proteínas, péptidos y compuestos de bajo peso molecular (Viterbo *et al.*, 2007).

En ciertos casos, la inducción de resistencia inicia con una respuesta local por parte de la planta alrededor del punto de necrosis y está asociada con un incremento rápido de la síntesis de ácido salicílico (AS) y la posterior activación de un gran número de genes que codifican para la producción de proteínas relacionadas con la patogenicidad (Bailey y Lumsden, 1998), a este tipo de respuesta se le denomina Resistencia Sistémica Adquirida (RSA). En algunos otros casos, la resistencia es mediada por la producción de Ácido Jasmónico (AJ) y/o etileno y es llamada Resistencia Sistémica Inducida (RSI) (Viterbo *et al.*, 2007, Heydari y Pessaraki, 2010). La similitud de ambas se basa en que, las plantas, luego de ser expuestas a un agente inductor, activan sus mecanismos de defensa tanto en el sitio de infección como en áreas más distantes. La diferencia entre RSA y RSI radica en la naturaleza del elicitador (molécula presente en el inductor).

Se ha demostrado que varias plantas son resistentes al ataque de patógenos cuando son inoculadas con hongos inductores de resistencia (Harman *et al.*, 2004). Por ejemplo, algunas cepas de *Trichoderma* inducen cambios metabólicos en las plantas y aumentan la resistencia a una amplia gama de microorganismos patógenos y virus (Viterbo *et al.*, 2007; Heydari y Pessaraki, 2010).

2.4 SALES DE BICARBONATO

Dentro de las alternativas al uso de los fungicidas y que presentan un efecto mínimo sobre el ambiente y la salud, se ubican las sales inorgánicas. Estas sales son utilizadas principalmente dentro de la industria de la alimentación como aditivos para evitar la fermentación, controlar el

pH y desarrollar texturas o sabores deseados (Aharoni *et al.*, 1997; Smilanick *et al.*, 1999; Bombelli y Wright, 2006). Existen reportes que indican que estos compuestos, poseen propiedades antimicrobianas de amplio espectro (Olivier *et al.*, 1998) que son eficaces en el control de muchos hongos fitopatógenos (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006) causantes de diversas enfermedades en follaje, tallo, frutas/tubérculos (pre y postcosecha), semillas y raíces. Las sales inorgánicas se agrupan en bicarbonatos, fosfatos, silicatos, cloruros, fosfitos y misceláneos, y se considera que tienen actividad de contacto y erradicante, es decir, que tienden a suprimir las infecciones por hongos existentes en la superficie de la planta después de que los síntomas se han desarrollado (Deliopoulos *et al.*, 2010).

Los bicarbonatos son efectivos inhibidores del crecimiento de varios hongos fitopatógenos *in vitro* (Palmer *et al.*, 1997). De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés), el uso de KHCO_3 y NaHCO_3 como fungicidas no son perjudiciales para los seres humanos y para el ambiente, y por lo tanto pueden ofrecer una alternativa segura a los fungicidas convencionales (Deliopoulos *et al.*, 2010). La Compañía de Desarrollo Hortícola en 2005, reportó los siguientes como beneficios del uso de KHCO_3 sobre fungicidas convencionales: (a) bajo riesgo en el desarrollo de resistencia fúngica, (b) bajo costo, y (c) intervalos cortos de aplicación.

Aún se desconoce cómo es que actúan los bicarbonatos, sin embargo se considera que hay varios mecanismos posibles implicados en la expresión del efecto antifúngico. Estos han sido vinculados a procesos tales como elevación del pH en la superficie de la hoja (Ziv y Zitter, 1992), daño a los componentes de membranas (Avis, 2007), colapso de las paredes celulares de los hongos debido al desequilibrio de K^+ (Zavaleta-Mejía, 1999), deshidratación de esporas

(Deliopoulos *et al.*, 2010) e inhibición de las reacciones de la fosforilación oxidativa (Olivier *et al.*, 1998).

En diversos estudios se ha reportado que los bicarbonatos y carbonatos de sodio, potasio y amonio inhiben el crecimiento en postcosecha de hongos patógenos de frutas, hortalizas y plantas ornamentales (Olivier *et al.*, 1998; Palou *et al.*, 2001; Karabulut *et al.*, 2003; Arslan *et al.*, 2006). En cultivos de zanahoria, pepino y melón se ha demostrado el control de patógenos mediante la aplicación de bicarbonatos (Aharoni *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006). Smilanick *et al.* (1999) reportaron que una breve inmersión de cítricos en soluciones de carbonato o bicarbonato de sodio redujo la incidencia del moho verde. Por otra parte, la aplicación foliar de bicarbonatos de sodio y potasio redujo la severidad de la enfermedad causada por *Leveillula taurica* en pimiento (Fallik *et al.*, 1997). En los patógenos se han observado efectos sobre sus estructuras y crecimiento; por ejemplo, en *Helminthosporium solani* se observó disminución de la formación de conidios después de su exposición a KHCO_3 (Olivier *et al.*, 1998). *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* presentaron inhibición en su crecimiento *in vitro* al ser expuesto a diferentes bicarbonatos y KHCO_3 , respectivamente (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006, Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009). Ziv y Zitter (1992) encontraron pronunciados efectos perjudiciales de los bicarbonatos en el crecimiento *in vitro* e incidencia de la enfermedad de varios agentes patógenos foliares de cucurbitáceas.

La posibilidad de utilizar estas sales en el manejo de enfermedades causadas por hongos permitiría el reemplazo de fungicidas convencionales, reduciendo así los daños que éstos generan al ambiente y la salud.

2.5 MANEJO INTEGRADO EN EL CONTROL DE *Sclerotinia sclerotiorum*

Para el caso particular de *Sclerotinia sclerotiorum* una única estrategia de control no ha disminuido el daño satisfactoriamente, por lo que el manejo integrado (combinación de métodos físicos, culturales, control químico o biológico) es necesario (Subbarao, 1998).

Con la finalidad de potenciar el efecto fungicida se ha buscado la combinación de estos productos con el control biológico o de sales. Por ejemplo, la aplicación de estas últimas en conjunto con algunos antagonistas microbianos ha demostrado ser eficaz para controlar enfermedades postcosecha de frutas y verduras (Olivier *et al.*, 1998; Palou *et al.*, 2001). *Trichoderma* sp. cepa R39 mantuvo su efecto antagónico al ser confrontado con *S. sclerotiorum* en concentraciones de 0 a 25 mM de KHCO_3 (Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), efectos que también reportan Erper *et al.* (2011) al confrontar *Rhizoctonia solani* y *S. sclerotiorum* con *Trichoderma* a diferentes concentraciones de KHCO_3 . También se han alcanzado excelentes resultados combinando *T. virens* y metalaxyl contra *Pythium ultimum*, *T. harzianum* y captán contra *Verticillium dahliae* (Ordentlich *et al.*, 1990), y *T. virens* y thiram contra *Rhizoctonia solani* (Benítez *et al.*, 2004). Inclusive cantidades reducidas del fungicida pueden estresar y debilitar el patógeno, haciéndolo más susceptible al ataque posterior por el antagonista (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

CAPÍTULO III

POTENCIAL ANTAGÓNICO DE HONGOS FILAMENTOSOS HACIA *Sclerotinia sclerotiorum*

Resumen

En este capítulo se evaluó el crecimiento y la capacidad antagónica de cuatro cepas de hongos filamentosos: *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. y *T. versicolor*, hacia *Sclerotinia sclerotiorum*, mediante enfrentamientos *in vitro* y microcultivos. Además, se evaluó su actividad enzimática (proteasas, lipasas, amilasas, pectinasas y celulasas) a nivel cualitativo, por medio de la medición de halos de hidrólisis en placas de agar, con el respectivo sustrato. De las cuatro cepas, *Trichoderma viride* inhibió el crecimiento del patógeno a nivel macroscópico. Los hongos que presentaron mayor actividad enzimática al producir amilasas, pectinasa, lipasas, proteasas y celulasas, fueron *Trametes* sp. y *Trametes versicolor*. Los daños ocasionados a las estructuras del patógeno por los hongos, pero principalmente por *Trichoderma viride*, se diagnosticaron con base en la presencia de granulaciones del micelio.

Palabras clave. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Trametes*, actividad enzimática, amilasa, celulasa, lipasa, pectinasa

CHAPTER III

POTENTIAL ANTAGONISM OF FILAMENTOUS FUNGI AGAINST *Sclerotinia sclerotiorum*

Abstract

This chapter evaluated the growth and the antagonistic ability of four filamentous fungal strains: *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. and *T. versicolor*, against *Sclerotinia sclerotiorum*, by means of *in vitro* confrontations and fungal microcultures. In addition the qualitative enzymatic activity (proteases, lipases, amylases, pectinases and cellulases) was determined via detection of hydrolytic halos observed in the corresponding agar plates. *Trichoderma viride* had better growth inhibition for *Sclerotinia* than the other three fungal species. *Trametes* sp. and *Trametes versicolor* showed higher activities of amylases, pectinases, lipases, proteases, and cellulases. Damages of *Sclerotinia* structures due to *Trichoderma* were diagnosed by the presence of granules in the mycelium.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Trametes*, enzymatic activity, amylase, cellulase, lipase, pectinase

3.1 INTRODUCCIÓN

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, es un hongo habitante del suelo de extensa distribución, que causa marchitamiento y muerte de plantas, afectando a más de 400 especies (Boland y Hall, 1994). El empleo de productos químicos y la aplicación de prácticas culturales son las principales medidas adoptadas para reducir los daños causados por este patógeno (Fernando *et al.*, 2004). Sin embargo, existe interés en todo el mundo para explorar alternativas a los fungicidas sintéticos con el fin de minimizar los riesgos asociados con el desarrollo de cepas resistentes a éstos compuestos químicos. El control biológico surge como una alternativa, ya que mediante el uso de microorganismos que antagonicen patógenos se podrían controlar agentes causales de enfermedades de plantas (Benítez *et al.*, 2004).

Muchos hongos poseen mecanismos que permiten prevenir de manera eficiente enfermedades tanto foliares como de la raíz, causadas por otros hongos. Uno de estos mecanismos es el micoparasitismo (Brimner y Boland, 2003), en el cual se observan enrollamientos de hifas, formación de haustorios y apresorios, y liberación de enzimas que generan cambios en el micelio y en estructuras reproductivas del hospedante (Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007b).

Las enzimas son un componente importante en el micoparasitismo; los organismos involucrados en este fenómeno, poseen enzimas constitutivas (forman parte de su morfología y metabolismo) y enzimas que son reguladas durante el ataque (Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007b). Estas funcionan rompiendo los polisacáridos, quitina y β -glucanos que son responsables de la integridad de la pared celular de los hongos (Howell, 2003).

Se han reportado varios microorganismos antagonistas (hongos, bacterias, actinomicetos, levaduras, algas y mosquitos de hongos) que reducen la actividad patógena de *S. sclerotiorum* (Saharan y Mehta, 2008). Dentro de los hongos se pueden citar a *Coniothyrium minitans*,

Trichoderma spp., *Gliocladium* spp., *Sporidesmium sclerotivorum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Fernando *et al.*, 2004). Las especies del género *Trichoderma*, además de *Coniothyrium minitans*, figuran entre los biocontroladores más prometedores e investigados (Bae y Knudsen, 2007; Corrêa *et al.*, 2007; Abdullah *et al.*, 2008), siendo las cepas de *T. virens*, *T. viride* y sobre todo *T. harzianum* las más empleadas (Markovich y Kononova, 2002; Benítez *et al.*, 2004). Estos hongos actúan a través de la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que generan cambios estructurales a nivel celular como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular en los patógenos causantes de enfermedades en las plantas (Howell, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004).

A partir de este experimento se evaluó el potencial antagónico de los hongos *Trametes* sp., *Trametes versicolor*, *Trichoderma viride* y *Phanerochaete chrysosporium* hacia el hongo *S. sclerotiorum*, mediante confrontamientos *in vitro* y su actividad enzimática.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Caracterización de patógeno y antagonistas.

El hongo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* fue obtenido de la colección de germoplasma del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados. Como antagonistas, se utilizaron los hongos *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. y *Trametes versicolor*, obtenidos de la misma colección que el patógeno. Patógeno y antagonistas fueron reactivados en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA; Merck®) e

incubados a 28 °C, y diariamente se midió el crecimiento de la colonia en cada uno de los hongos.

3.2.2 Control biológico *in vitro*.

3.2.2.1 Cultivos duales en cajas de Petri.

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en cajas de Petri, conteniendo 20 mL de PDA. Cada hongo antagonista fue colocado en un extremo de la caja con un disco de 5 mm de PDA con crecimiento fúngico activo. Después de un periodo de incubación a 28 °C y con base en la velocidad de crecimiento de cada hongo, en el extremo opuesto de la caja de Petri, se colocó otro disco de PDA de 5 mm con el patógeno a confrontar. El crecimiento en cada uno de los enfrentamientos fúngicos fue evaluado cada 24 h. Se consideraron cinco repeticiones por cada enfrentamiento, antagonista y patógeno.

3.2.2.2 Microcultivos Riddell.

Para evaluar el antagonismo a nivel microscópico, se realizaron microcultivos con base en la técnica de Riddell (1950) con algunas modificaciones. Dentro de una caja de Petri de vidrio se colocó un portaobjetos fijado a un círculo de papel filtro con cinta adhesiva, y se esterilizaron en autoclave. Una vez estéril el sistema (121 °C, 18 min), sobre el portaobjetos se puso un disco de PDA de 10 mm de diámetro por 20 mm de espesor, en un extremo del disco y con ayuda de una aguja de disección, se inoculó el micelio del hongo antagonista y se le colocó un cubreobjetos estéril. Con la finalidad de mantener la humedad en la caja de Petri se adicionaron 2 mL de glicerol al 10%. Cuando se observó crecimiento del hongo, se procedió a inocular micelio del patógeno en el extremo opuesto. En el momento en que el disco de agar fue cubierto con el micelio de ambos organismos, el glicerol se reemplazó con formaldehído al 10%; dos h después

el portaobjetos se retiró de la caja de Petri. El cubreobjetos se colocó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón en lactofenol, el disco de agar se retiró y a la zona en que se encontraba se le colocó una gota del colorante y un nuevo cubreobjetos, obteniendo dos preparaciones por microcultivo, las cuales se sellaron y observaron con un microscopio Carl Zeiss modelo III con cámara digital integrada.

3.2.3 Actividad enzimática.

De cada uno de los hongos antagonistas (*Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes sp.* y *Trametes versicolor*), se evaluó la producción cualitativa de las enzimas Proteasa (Ferrera-Cerrato, 1977), Lipasa (Sierra, 1957), Amilasa (Society of American Bacteriologist, 1951), Pectinasa (Ferrera-Cerrato, 1977) y Celulasa (Corlay, 1997). La composición de los medios de cultivo para la evaluación de cada enzima, se describe en el Apéndice I.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Caracterización de patógeno y antagonistas.

El crecimiento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* es relativamente rápido, pues en tan solo tres días cubrió por completo la caja de Petri; *Trichoderma viride* y *Phanerochaete chrysosporium* completaron su crecimiento en cuatro días. En contraste, *Trametes sp.* y *Trametes versicolor* son considerados como hongos de lento crecimiento pues cubrieron la caja en 12 y 13 días, respectivamente (Figura 3.1).

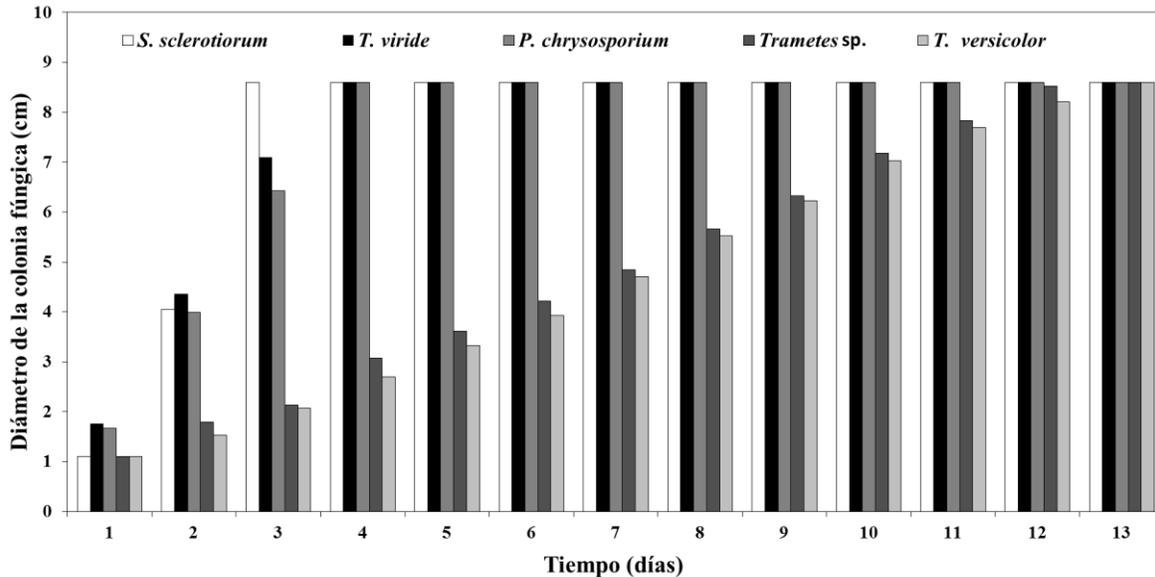


Figura 3.1. Crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* y de los cuatro hongos antagonistas *Trichoderma viride*, *Trametes sp.*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* durante 13 días de evaluación. n=4

El patógeno *S. sclerotiorum* produjo hifas hialinas en su estado inicial, más tarde el micelio se fue tornando blanco, compactado, y tomó un aspecto algodonoso, al margen del cultivo, a partir del quinto día, comenzaron a formarse los esclerocios (Figura 3.2), que son las estructuras de resistencia que permiten al hongo permanecer viable por varios años en el suelo (Bolton *et al.*, 2006). En aproximadamente una semana los esclerocios llegaron a su estado de madurez, caracterizado por presentar coloración negra resultado de la acumulación de melanina en su corteza (Jones, 1970; Willetts y Wong, 1980; Erental *et al.*, 2008). Esta melanina se cree juega un papel importante en la protección contra agentes ambientales nocivos (rayos UV, especies reactivas de oxígeno) y contra el ataque por microorganismos antagonistas (Willetts y Bullock, 1992; Bolton *et al.*, 2006; Erental *et al.*, 2008; Saharan y Mehta, 2008).

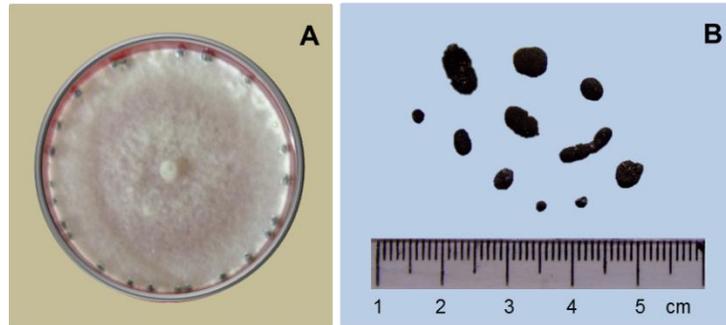


Figura 3.2. Cultivo de *Sclerotinia sclerotiorum*, de ocho días de crecido en medio de cultivo papa dextrosa agar. A) Colonia de color blanco, micelio algodónoso y esclerocios en proceso de maduración; B) Esclerocios maduros obtenidos de cultivo *in vitro*.

El micelio de *Trichoderma viride* inicialmente fue de color blanco y de consistencia esponjosa, al paso de los días fue cambiando de verde claro a verde oscuro conforme se fue dando la esporulación (Figura 3.3A). En el caso de *Phanerochaete chrysosporium* el micelio fue plano, de color blanco con apariencia harinosa cuando esporuló (Figura 3.3B). *Trametes* sp. y *T. versicolor* presentaron micelio plano, de color blanco y apariencia algodónosa-felposa (Figura 3.3C), aunque en el segundo presentó una apariencia felposa (Figura 3.3D).

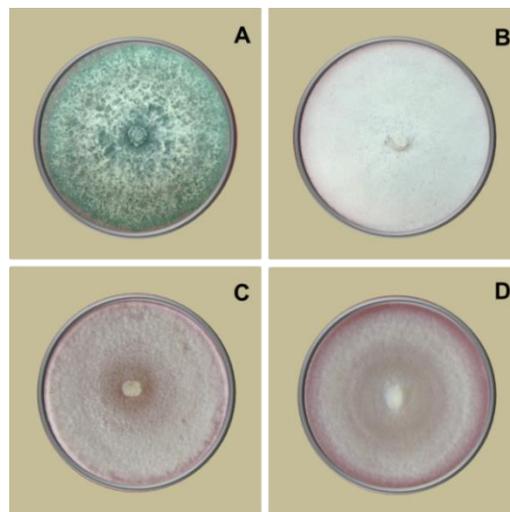


Figura 3.3. Aspecto de las colonias fúngicas al completar su crecimiento sobre el medio de cultivo, A) *Trichoderma viride*, B) *Phanerochaete chrysosporium*, C) *Trametes* sp. y D) *Trametes versicolor*.

3.3.2 Control biológico *in vitro*.

La selección de organismos con propiedades antagónicas sobre aquellos que producen enfermedades constituye una alternativa de control para disminuir la incidencia de enfermedades. Los resultados de las pruebas de antagonismo mostraron que *T. viride* tuvo efecto sobre el crecimiento de *S. sclerotiorum*, puesto que al momento de encontrarse las hifas de ambos hongos se observó la alineación del micelio en forma de barrera y una banda amarillenta a café en la zona de interacción, retardando así el crecimiento del patógeno (Figura 3.4). La densidad de micelio del patógeno se redujo así como la formación de esclerocios de tal manera que solo se llegaron a formar escasamente de tres a cuatro estructuras en cada placa. El crecimiento del antagonista continuó a pesar de las barreras físicas, hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del patógeno e incluso, esporulando sobre él.

Este efecto se puede atribuir a la capacidad hiperparasítica y a la liberación de la enzima hidrolítica β -1,3-glucanasa por parte de *Trichoderma*, que pudiera estar actuando sobre los β -glucanos que forman parte de la composición interna de los esclerocios y/o pared celular del micelio del patógeno (Bolton *et al.*, 2006). Lo anterior concuerda con los reportes en la literatura relacionados con la efectividad de *Trichoderma* para inhibir y micoparasitar diferentes hongos patógenos de plantas, a través de su actividad fisiológica y bioquímica (Harman *et al.*, 2004).

En contraste, los hongos que demostraron tener un grado de antagonismo más bajo en las pruebas realizadas fueron *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. y *T. versicolor*, de los cuales no existen antecedentes como micoparásitos de fitopatógenos. Los tres hongos mostraron también menor o escasa actividad antagónica, permitiendo que el patógeno creciera sobre su

micelio y facilitando así la formación de esclerocios en mayor cantidad, en comparación con *Trichoderma* (Figura 3.4B, C y D).

En el caso del género *Trametes* el hecho de que no se percibiera actividad antagonica hacia *Sclerotinia*, fue debido a su lento crecimiento; Cundom *et al.* (2002) mencionan al respecto que esto no es obstáculo para que tales hongos puedan tener potencial antagonico, sino que depende en gran parte de sus mecanismos de acción.

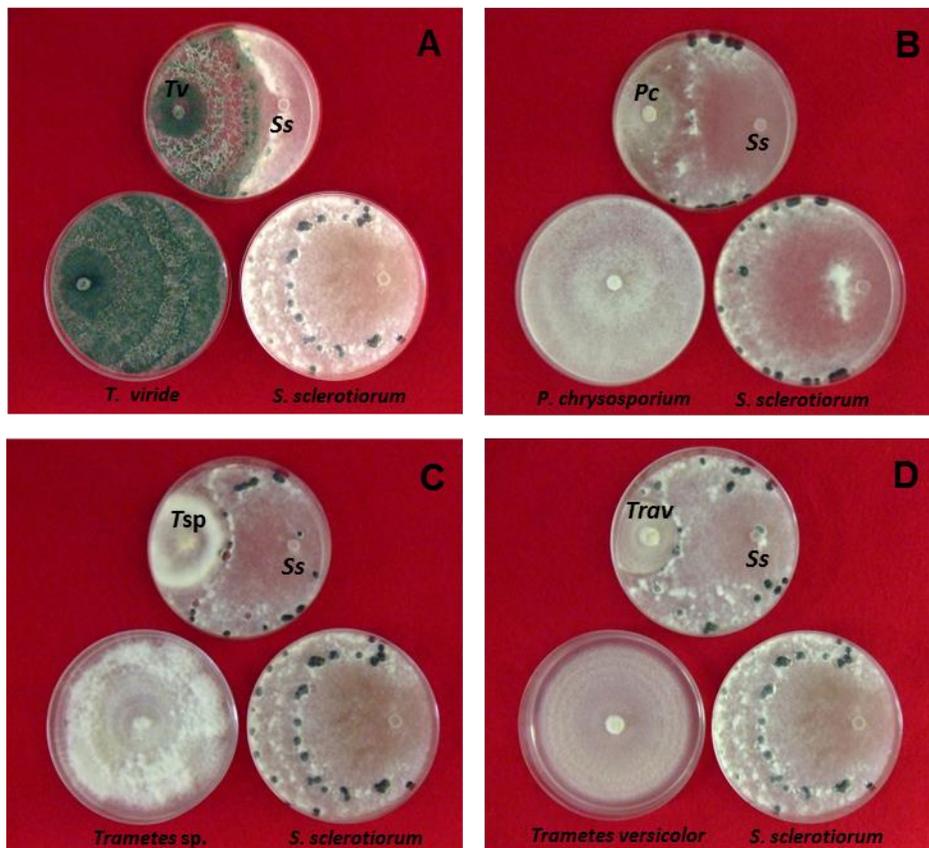


Figura 3.4. Confrontamientos *in vitro* de hongos filamentosos contra *Sclerotinia sclerotiorum*. A) *Trichoderma viride* (Tv); B) *Phanerochaete chrysosporium* (Pc); C) *Trametes* sp. (T); D) *Trametes versicolor* (Trav). Cultivos crecidos en medio PDA y observados a los doce días de confrontados.

De los cultivos donde se confrontaron *T. viride* y *S. sclerotiorum*, los esclerocios que estuvieron expuestos al antagonista a lo largo de un mes, se deshicieron por completo al contacto

con la punta de una aguja de disección (Figura 3.4), lo que corrobora lo descrito por Ibarra-Medina *et al.* (2010) quienes reportaron que IBA-3 (*T. koningii*) e IBA-4 (*T. viride*) degradaron con mayor eficacia los esclerocios de *S. sclerotiorum*.

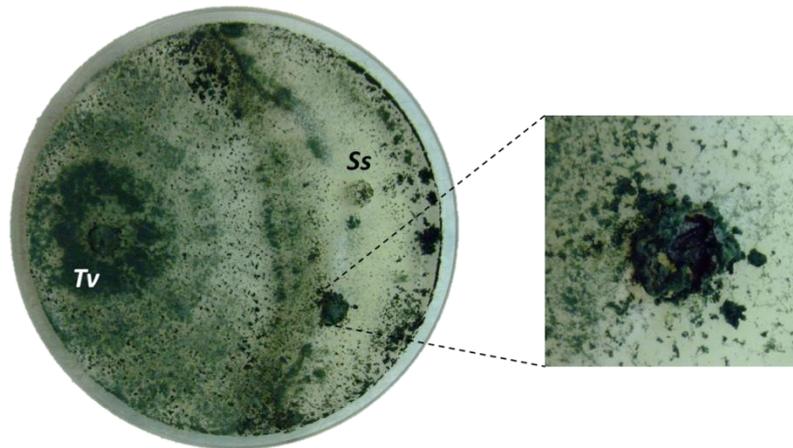


Figura 3.5. Esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) degradado por *Trichoderma viride* (Tv) después de un mes de contacto.

A nivel microscópico se observó granulación de las hifas de *S. sclerotiorum* por efecto del ataque de los cuatro hongos antagonistas (Figura 3.6). En el caso de *Trichoderma* se observaron indicios de que este hongo estuvo a punto de penetrar al hospedante; sin embargo su mecanismo de micoparasitismo en su mayoría fue por contacto. Ibarra-Medina (2008) reportó que la cepa de *Trichoderma viride* además de granulación, provocó enrollamiento y vacuolación de las hifas de *S. sclerotiorum* al confrontarlos.

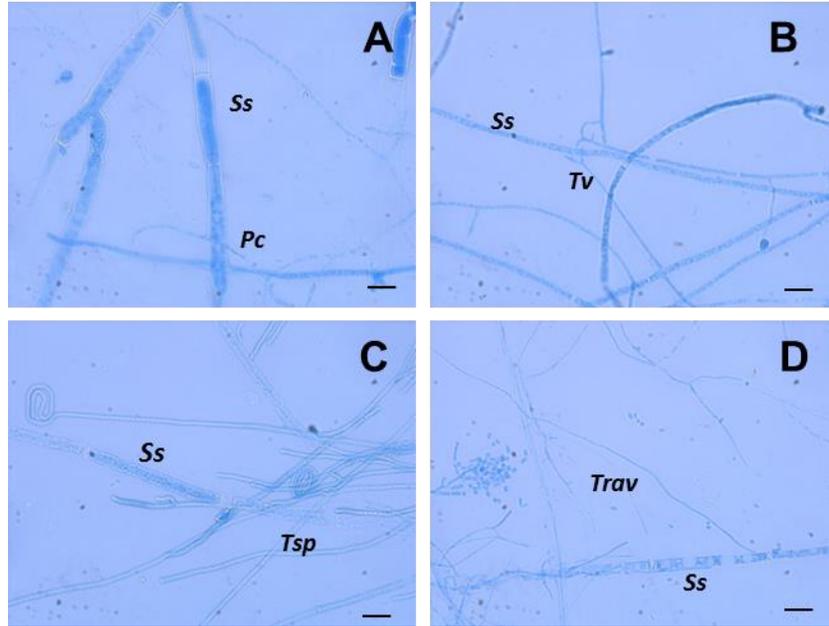


Figura 3.6. Eventos observados en microscópio de luz, campo claro (60X), al confrontar *Sclerotinia sclerotiorum* (*Ss*) con A) *Phanerochaete chrysosporium* (*Pc*), B) *Trichoderma viride* (*Tv*), C) *Trametes* sp. (*Tsp*) y D) *T. versicolor* (*Trav*). Barra=10 μ m.

Los efectos observados sobre las estructuras del patógeno, pueden estar relacionados con la producción de enzimas tales como quitinasa, β -glucanasa, celulasa y proteasa por parte de *Trichoderma*, que lisan o digieren las paredes de los hongos; y que son un componente importante en el proceso del micoparasitismo (Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007a). *Trichoderma viride* antagoniza varios fitopatógenos, y aunque su modo de acción no es claro, muchos investigadores han sugerido que las enzimas líticas producidas por este hongo podrían ser un factor principal que determinen sus características antagonicas (Harman *et al.*, 2004).

En el caso de *P. chrysosporium* y *Trametes*, estos hongos son comúnmente utilizados en estudios de biodegradación de compuestos orgánicos recalcitrantes debido a sus propiedades ligninolíticas (Diez, 2010). Además, *P. chrysosporium* ha sido probado para la degradación de

una gran variedad de compuestos como hidrocarburos, compuestos aromáticos clorados, compuestos fenólicos, insecticidas y fungicidas, entre otros, encontrando excelentes resultados y logrando en muchos casos la mineralización total de estos compuestos (Lopera *et al.*, 2005).

3.3.3 Actividad enzimática.

De especial importancia es la determinación de enzimas extracelulares relacionadas con la lisis de la pared celular del patógeno durante el micoparasitismo (Verma *et al.*, 2007). La actividad de algunas de las enzimas que participan en dicho proceso fue evaluada en cada hongo de manera cualitativa, en medios de cultivo específicos, por la presencia o ausencia de halos o cristales precipitados alrededor de cada una de las colonias que crecieron sobre los respectivos medios.

Dicha actividad enzimática se resume en el Cuadro 3.1 y como se puede apreciar, los hongos que presentaron mayor producción de enzimas (amilasas, lipasas, proteasas, celulasas y pectinasas) fueron *Trametes* sp. y *T. versicolor*, siendo este último el que dio positivo en todas las pruebas realizadas. No obstante, a pesar de tener la capacidad de producir enzimas, estos hongos fueron los que presentaron menor efecto antagónico hacia *S. sclerotiorum*. *Phanerochaete chrysosporium* tiene la capacidad de producir amilasas, lipasas y celulasas (Figura 3.7), aunque también su efecto antagónico hacia *S. sclerotiorum* en los cultivos duales no fue muy eficiente. En contraste, *Trichoderma* fue el que menor actividad enzimática mostró, destacándose únicamente por la producción de celulasas, lipasas y amilasas, demostrándose también que es eficiente en el control de *S. sclerotiorum* al inhibir el crecimiento del micelio y micoparasitar los esclerocios.

Cuadro 3.1. Actividad enzimática cualitativa de hongos antagonistas y *Sclerotinia sclerotiorum*.

	Amilolítica	Lipolítica	Proteolítica	Celulolítica	Pectinolítica	
					pH 5	pH7
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Trametes sp.</i>	+	-	+	+	+	-
<i>Trametes versicolor</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma viride</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	-	-	-	-	+

+ Reacción positiva, - Reacción negativa

Trichoderma spp. es bien conocido por la producción de enzimas líticas y la penetración de sus hifas en el hongo fitopatógeno, tal fenómeno ha sido considerado como la base del antagonismo. Los reportes indican que el sistema enzimático mediante el cual actúan sobre el patógeno incluye quitinobiasas, endoquitinasas, exoquitinasas, glucanasas, DNasas, α -amilasas, celulasas, lipasas, manasas, xilasas, entre otras (Witkowska y Maj, 2002; Lara-Hernández y Ferrera-Cerrato, 2007a).

Jones *et al.* (1974) reportaron que las enzimas β -(1,3)-glucanasa y quitinasa están involucradas en la destrucción de la pared celular de *S. sclerotiorum* por *C. minutans* y *T. viride* (Saharan y Mehta, 2008). Además, se ha demostrado que la interacción de *Trichoderma* spp. con su hospedante es específica y controlada por componentes presentes en la pared celular del fitopatógeno, lo cual hace que estos microorganismos sean reconocidos y posteriormente atacados (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008). Las enzimas líticas como 1,3-glucanasas y quitinasas, excretadas por *T. harzianum* fueron involucradas en la degradación celular de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfii*, y por lo tanto en el control de estos patógenos (Elad *et al.*, 1999)

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

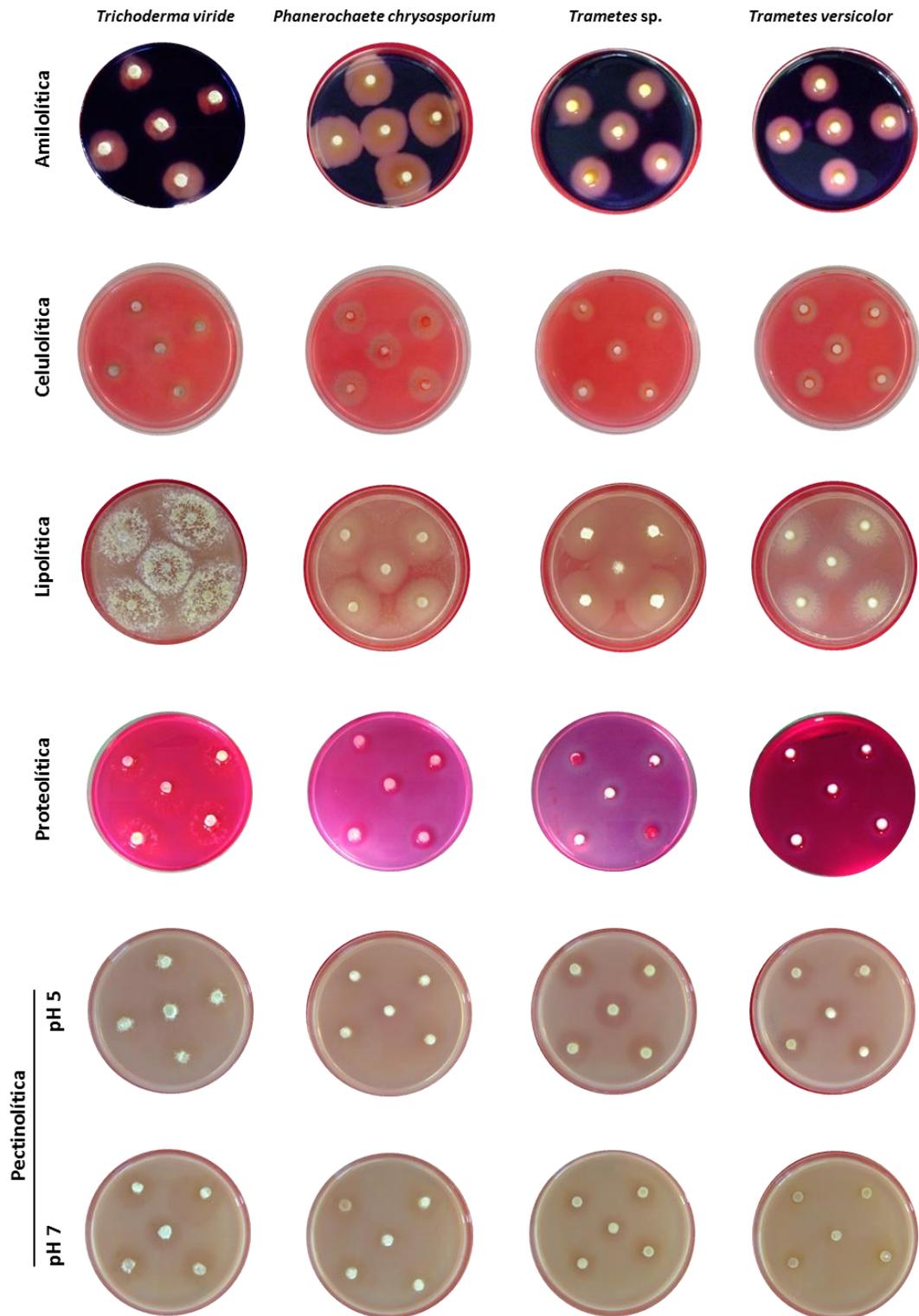


Figura 3.7. Actividad enzimática cualitativa de cuatro hongos antagonistas. La reacción enzimática en cada medio se consideró positiva por la presencia de halos alrededor de la colonia fúngica y, cristales precipitados en el caso de la actividad lipolítica. Dos a siete días (en caso de lipasas) de evaluación.

nitrógeno y son consideradas de las más empleadas en aplicaciones biotecnológicas (Treichel *et al.*, 2010).

Las enzimas son un componente clave dentro del micoparasitismo, es por ello que las especies del género *Trametes*, al secretar más enzimas que *Phanerochaete chrysosporium* y *Trichoderma viride*, se esperaría que mostraran mayor actividad antagónica hacia *Sclerotinia sclerotiorum*; sin embargo, no fue así. Pero no se debe descartar la posibilidad de seguir realizando pruebas sobre el sistema enzimático que poseen estos hongos.

3.4 CONCLUSIONES

- La prueba de la confrontación *in vitro* demuestra que de los cuatro hongos evaluados, *Trichoderma viride* es el hongo que mejor potencial antagónico tiene hacia *S. sclerotiorum*, aún y cuando presentó menor actividad enzimática, pues de las cinco enzimas evaluadas solo tres mostraron actividad (amilasas, lipasas y celulasas).
- Los hongos del género *Trametes* presentaron la mayor actividad enzimática y *Sclerotinia sclerotiorum* solo presentó actividad amilolítica y pectinolítica (pH 7).

CAPÍTULO IV

ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LA INTERACCIÓN *Trichoderma viride* - *Sclerotinia sclerotiorum*

Resumen

La ontogenia de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* fue observada y comparada mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, lo cual permitió conocer más sobre los eventos que se llevan a cabo durante el proceso de su formación. Además se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), la estructura interna del esclerocio, y la interacción con *Trichoderma viride* sobre hifas y esclerocios crecidos en sistemas *in vitro*. El desarrollo del esclerocio observado, mediante las dos técnicas de microscopía, mostró el mismo patrón de crecimiento del patógeno, sin embargo mediante la microscopía de barrido se pudo apreciar con mejor detalle cada uno de los eventos que anteceden al esclerocio maduro. La estructura del esclerocio está integrada por una corteza y una médula, esta última se perdió completamente cuando el esclerocio fue incubado por 45 días con esporas de *T. viride*. Por lo anterior, *Trichoderma viride* tiene gran potencial para ser utilizado en el control de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Palabras clave: esclerocio, corteza, médula, antagonismo, microscopía

CHAPTER IV

MICROSCOPICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN *Trichoderma viride* -

Sclerotinia sclerotiorum

Abstract

Sclerotia ontogeny in *Sclerotinia sclerotiorum* was observed and assessed throughout light and scanning electron microscopy (SEM), by which the events of sclerotia formation were followed. In addition, the inner sclerotia structures were observed by SEM as well as the interaction of *Trichoderma viride* on hyphae and sclerotia under *in vitro* systems. Regardless the type of microscopy, the sclerotia development showed similar growth patterns in the pathogen. However, the SEM let better and detailed observations of each fungal events towards sclerotia maturation. Thus, inner sclerotium structure is composed by a cortex and medulla, which was completely degraded when sclerotia were incubated with spores of *T. viride*, during 45 days. *Trichoderma viride* showed high potential for being utilized as part of controlling *Sclerotinia sclerotiorum*.

Key words: sclerotium, cortex, medulla, antagonism, microscopy

4.1 INTRODUCCIÓN

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, produce estructuras de resistencia llamadas esclerocios, que le permiten sobrevivir en el suelo bajo condiciones climáticas adversas durante largos períodos en ausencia de un hospedante (Abawi y Grogan, 1979; Bolton *et al.*, 2006; Saharan y Mehta, 2008).

Se han distinguido tres estados de desarrollo del esclerocio: 1) la iniciación: que implica la agregación de hifas, 2) el desarrollo del crecimiento hifal para incrementar el tamaño, y 3) la maduración que consiste en la delimitación de la superficie, consolidación interna y melanización (Rollins y Dickman, 1998; Bolton *et al.*, 2006). De acuerdo con Willetts y Wong (1971) cada esclerocio está formado por tres capas: una corteza gruesa y pigmentada, una intermedia delgada (córtez) y una interna de color blanco llamada médula. La corteza es la región más externa, que está constituida por hifas estrechamente organizadas para formar una capa continua (Willetts y Wong, 1971; Willetts y Bullock, 1992), que está cubierta por melanina, la cual le da el color negro característico al esclerocio. El córtex (región intermedia) es una capa delgada compuesta de células pseudoparenquimatosas y corresponde a la zona de acumulación y almacenaje de materiales de reserva (Willetts y Bullock, 1992). La médula conformada de tejido prosenquimatoso, se encuentra embebida en una matriz fibrilar y compuesta de carbohidratos, principalmente β -glucanos y proteínas (Le Tourneau, 1979).

Cuando las condiciones son favorables, los esclerocios germinan e infectan a nivel del suelo, o forman apotecios cuyas ascosporas al ser dispersadas, pueden producir infecciones a la parte aérea de las plantas (Saharan y Mehta, 2008).

El empleo de productos químicos y la aplicación de prácticas culturales son las principales medidas adoptadas para reducir los daños causados por *S. sclerotiorum* (Fernando *et al.*, 2004).

Sin embargo, el control del hongo por medio de prácticas convencionales es difícil, de tal forma que la aplicación de fungicidas es cada vez más cuestionada por los serios daños que ocasionan a la salud humana y animal, y por los cambios ecológicos provocados debido al abuso de los mismos. Por tales razones, el control biológico está recibiendo considerable atención principalmente para hongos patógenos del suelo, además se ha demostrado que los esclerocios son vulnerables al ataque de muchos microorganismos (Bolton *et al.*, 2006).

Varios hongos se comportan como antagonistas de *S. sclerotiorum*, las especies del género *Trichoderma* son las más investigadas debido a que son fáciles de aislar y cultivar, su crecimiento es rápido en diferentes sustratos, y tienen la habilidad de sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Benítez *et al.*, 2004; Ezziyyani *et al.*, 2004).

Es por ello que en esta fase experimental, se evaluó la morfología e interacción micoparasítica entre *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum* mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), así como el desarrollo de los esclerocios tanto por microscopía óptica como por MEB.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Microscopía óptica.

4.2.1.1 Ontogenia de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Se realizaron microcultivos Riddell (1950) con algunas modificaciones. Dentro de una caja de Petri se colocó un círculo de papel filtro y sobre él un portaobjetos (fijado con rollos de cinta adhesiva), esterilizados a 121 °C durante 18 min. Sobre el portaobjetos se colocó un disco de PDA de 10 mm de diámetro por 20 mm de espesor, y con ayuda de una aguja de disección se inoculó micelio del hongo en un extremo del disco, y se puso un cubreobjetos estéril sobre él. Con la finalidad de mantener la humedad en la caja de Petri se adicionaron 2 mL de glicerol al

10%. Cada 24 h y durante cuatro días se realizaron preparaciones del hongo, para lo cual se reemplazó el glicerol con formaldehído al 10% dejándolo actuar durante dos h para fijar las estructuras fúngicas. Posteriormente, el cubreobjetos fue retirado de la caja de Petri y colocado sobre un portaobjetos limpio y con una gota de azul de algodón en lactofenol. Una vez retirado el disco de agar del portaobjetos original, se colocó otra gota de colorante y un cubreobjetos sobre éste. Finalmente, las preparaciones fueron selladas y observadas bajo un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo III) con cámara digital integrada.

Para las observaciones macroscópicas se prepararon cajas de Petri con medio PDA y se inocularon en el centro con un disco de micelio de *S. sclerotiorum*. Los cultivos fueron incubados en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente (~22 °C), y a partir del cuarto día y hasta que se observó la presencia de esclerocios maduros (noveno día) se realizó el seguimiento del desarrollo del hongo mediante la toma de fotografías.

4.2.2 Microscopía electrónica de barrido.

4.2.2.1 Ontogenia de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Se prepararon cajas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), a las cuales se le colocaron membranas Millipore® estériles de aproximadamente 1 cm de diámetro, inoculadas con un disco de PDA con micelio de *Sclerotinia sclerotiorum*. Los cultivos fueron incubados en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente (~22 °C), y a partir del quinto día y hasta que se observó la presencia de esclerocios maduros se fueron retirando las membranas (noveno día) y se fijaron en FAA (alcohol etílico 50 mL, ácido acético glacial 5 mL, formaldehído 10 mL, y agua destilada 35 mL) y se procesaron para observarlas en el microscopio electrónico de barrido (MEB). Para lo cual las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30,

50, 70, 80, 90 y 100%) durante una hora por cada concentración, pero con dos cambios en la última. Una vez deshidratadas las muestras, se colocaron en un desecador a punto crítico (tousimis, Samdri-795). Posteriormente se sombrearon con oro en un Ionizador (Jeol, Fine Coat Ion Sputter JFC-1100). Finalmente, cada una de las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope Jeol JSM-6360LV).

4.2.2.2 Estructura del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los esclerocios de 15 días de haberse formado, se removieron del medio de cultivo PDA, se partieron por la mitad, se fijaron en FAA y se procesaron para observarse mediante microscopía electrónica de barrido.

4.2.2.3 Confrontación *in vitro*.

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en cajas de Petri, conteniendo 20 mL de PDA. En un extremo de cada caja de Petri se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio activo de *S. sclerotiorum*. Después de un día de incubación a 28 °C, en el extremo opuesto de las cajas se colocó otro disco de PDA de 5 mm con micelio activo de *Trichoderma viride*. En medio de ambos hongos, se colocaron membranas Millipore® estériles (8 mm de diámetro), de manera que al crecer los hongos y sus hifas se encontraran, el micelio quedara sobre las membranas. Adicionalmente se prepararon cajas inoculadas con *T. viride* o con *S. sclerotiorum* como testigos, y a cada una se le colocaron cinco membranas. Finalmente, los cultivos fueron incubados por cuatro días más.

Una vez que se observó crecimiento de micelio sobre las membranas, tanto en los testigos como en los confrontamientos, éstas se extrajeron con unas pinzas y se sumergieron en fijador

FAA donde se mantuvieron hasta el momento de procesarlas para observarlas en el microscopio electrónico de barrido.

4.2.2.4 Evaluación de germinación de esporas de *Trichoderma viride* sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para esta evaluación se llevaron a cabo dos experimentos, los cuales se describen a continuación:

Experimento I. Se realizó una suspensión de esporas a partir de un cultivo esporulado de *T. viride* (10 días crecido en PDA) y 10 mL de agua destilada estéril, en la cual se introdujeron durante una hora 30 esclerocios (de 15 días de formados). Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron cinco esclerocios por caja de Petri con Agar-Agua (2%) y se incubaron a 28 °C. Al mismo tiempo, esclerocios que no fueron inoculados con esporas de *Trichoderma* se consideraron como testigos. En intervalos de 0, 6, 12, 18, 21 y 30 h, los esclerocios de una caja (testigos e inoculados) se fijaron con FAA.

Experimento II.

A) Dieciocho esclerocios maduros, se sumergieron en agua destilada estéril y posteriormente se deslizaron sobre un cultivo esporulado de *Trichoderma* (10 días crecido en PDA). Por caja de Petri con medio de cultivo Agar-Agua (2%) se colocaron tres esclerocios y se incubaron a 28 °C, con sus respectivos testigos.

B) Otros 18 esclerocios se sumergieron en caldo papa dextrosa (PDB) diluido al 50% y posteriormente se deslizaron sobre un cultivo esporulado de *Trichoderma* (10 días crecido en PDA). Por caja de Petri con medio de cultivo Agar-Agua (2%) se colocaron tres esclerocios y se incubaron a 28 °C, con sus respectivos testigos.

Al igual que en el experimento I en intervalos de 0, 6, 12, 18, 21 y 30 h, los esclerocios de una caja (testigos e inoculados) se fijaron con FAA para ser observados bajo el microscopio electrónico de barrido. De cada experimento se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) por esclerocio.

4.2.2.5 Colonización de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma viride*.

De un cultivo de *T. viride* crecido durante 10 días en medio PDA y esporulado, se hizo una suspensión con 10 mL de agua destilada estéril, en la cual se sumergieron durante una hora esclerocios maduros (15 días de formados). Una vez transcurrida la hora, los esclerocios se sacaron, se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo Agar-Agua (2%) y se incubaron a 28 °C durante 45 días; al mismo tiempo se incubaron cajas con esclerocios sin esporas de *Trichoderma* como testigo. A los 16, 30 y 45 días se extrajeron esclerocios del medio de cultivo de cada tratamiento y se fijaron con FAA para observarse en el microscopio electrónico de barrido.

La mayoría de las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMYL) de la UNAM, con la ayuda de la Bióloga Yolanda Hornelas Orozco, y las muestras que corresponden al desarrollo del esclerocio, en el microscopio del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la asesoría del M. en C. Rafael E. Quintanar Zúñiga.

4.2.2.6 Determinación del número de esporas vivas de *Trichoderma viride*.

De cada experimento, se tomaron cinco esclerocios impregnados con esporas de *Trichoderma*, se colocaron en 5 mL de agua destilada estéril y se agitaron. A partir de la suspensión obtenida del lavado de los esclerocios se realizaron diluciones (10^{-1} - 10^{-4}). De cada dilución se sembraron 0.1 μ L en cajas de Petri con medio PDA+Rosa de bengala, se incubaron a 28 °C y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) fúngicas a las 24 h. De cada dilución se sembraron cinco cajas.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Ontogenia de *Sclerotinia sclerotiorum*

De acuerdo con la clasificación de Townsend y Willetts (1954) el desarrollo del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* es del tipo terminal, el cual se caracteriza por un patrón de ramificación bien definido en la punta de la hifa. Willetts y Wong (1971) reportaron que algunas especies del género *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. libertiana*, and *S. minor*), surgen a partir de repetidas ramificaciones dicotómicas de una hifa principal y su posterior fusión. Este patrón de desarrollo, que antecede a la etapa de iniciación, se corroboró con las observaciones realizadas tanto en los microcultivos como en los cultivos donde se colocaron las membranas (Figura 4.1).

Se apreció crecimiento de micelio 24 h después de haber sembrado el hongo, a partir de una hifa principal se observaron ramificaciones laterales que formaban ángulos agudos (Figura 4.1A y D). Los primordios comenzaron a surgir cuando el crecimiento apical se detuvo y las puntas de las hifas presentaron sucesivas ramificaciones dicotómicas (Figura 4.1B, C, E y F). Las ramificaciones siguieron hasta que se formó una masa hifal que comenzó a pigmentarse (Figura

4.1G y H). La ramificación y fusión de hifas son probablemente el principal proceso que ocurre una vez que la iniciación se desencadena; después de que las hifas están en contacto éstas tienden a adherirse (Erental *et al.*, 2008). Como se aprecia en la Figura 4.1I y L varios primordios que se desarrollan en estrecha proximidad se fusionan para comenzar a formar un esclerocio maduro, el tamaño del esclerocio va a depender del número de primordios que se lleguen a unir (Townsend y Willetts; 1954; Willetts y Wong; 1971). Debido a que los primordios usualmente se forman después de que el micelio ha cubierto el sustrato, su producción puede ser una respuesta a cambios en la disponibilidad de nutrientes (Le Tourneau, 1979).

En algunos reportes se menciona que los primordios están involucrados en el proceso de infección, Garg *et al.* (2010) los observaron sobre tejido de cotiledones de *Brassica napus* dos días posteriores a la inoculación del hongo.

La producción de micelio vegetativo activo siempre precede a la iniciación del esclerocio, y durante este periodo de crecimiento el hongo absorbe nutrientes del sustrato. Los materiales estructurales y de reserva incorporados en el micelio son luego degradados por enzimas como arilesterasa y fosfatasa ácida, para proveer energía y nutrientes al esclerocio en desarrollo (Willetts y Bullock, 1992). Esta etapa del ciclo de vida del hongo solo se puede observar a nivel microscópico y debido a la dificultad en predecir los sitios donde el desarrollo tomará lugar son escasas las investigaciones al respecto.

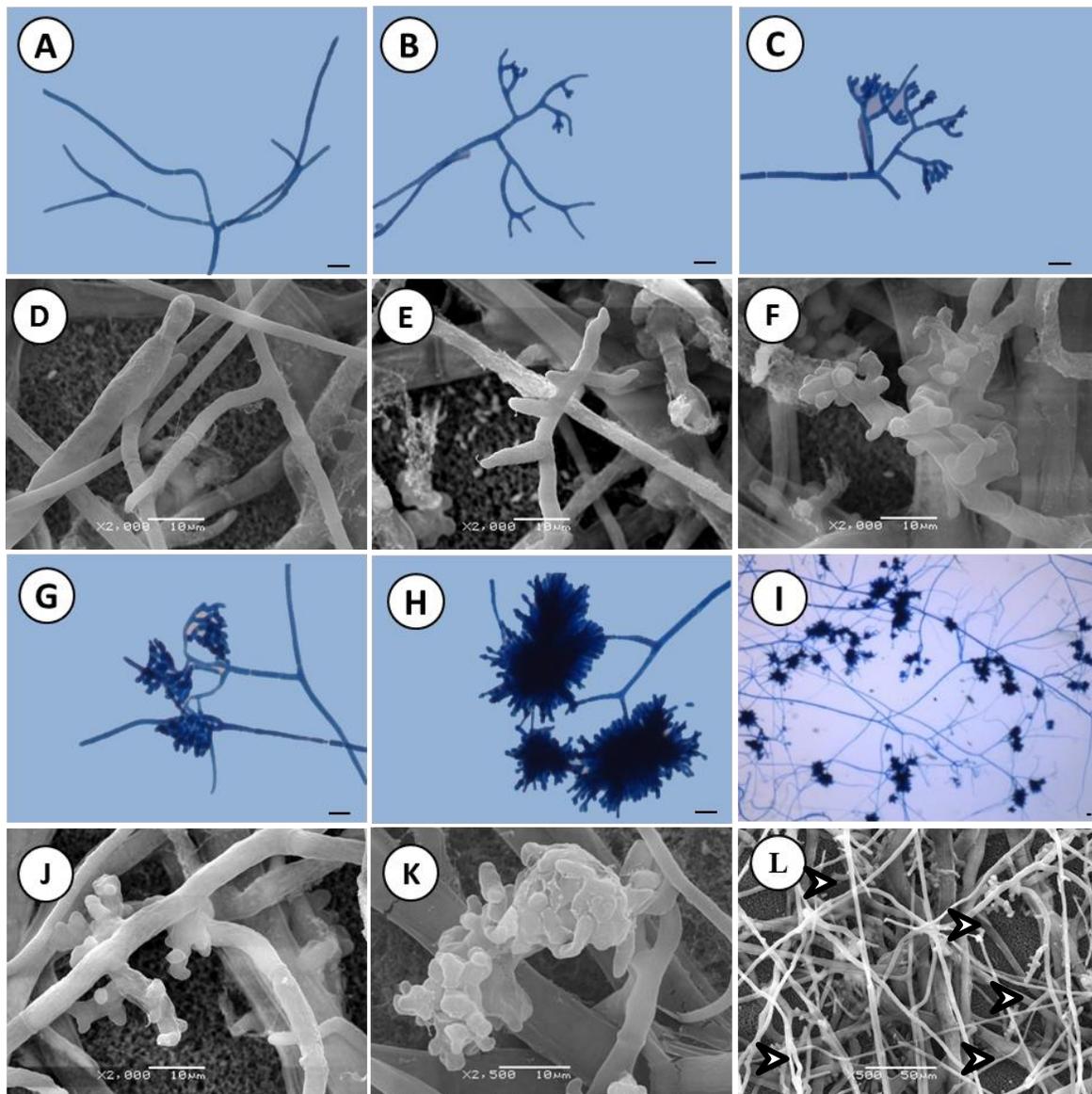


Figura 4.1. Microfotografías de luz (A-C y G-I) y microscopía electrónica de barrido (D-F y J-L) que muestran el desarrollo temprano de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, previo a la etapa de iniciación. A y D) Crecimiento hifal (24 h). B-C y E-F) Ramificación dicotómica de las hifas (48 h). G-H y J-K) Formación inicial de las agrupaciones de hifas (primordios de esclerocios) y pigmentación (72 h). I y L) Varios primordios desarrollándose en estrecha proximidad para conformar el esclerocio. Microfotografías de microscopía de luz tomadas con aumento 10X (A-C y G-H) y 2X (I). Barra 50 μ m.

Las observaciones a nivel macroscópico mostraron que al cuarto día de haber inoculado el hongo, las hifas ya habían colonizando completamente la caja, y a partir del quinto día algunas

hifas comenzaron a agruparse cerca del borde exterior (Figura 4.2A). En cajas de cultivo, cuando el hongo es inoculado desde el centro, es común observar el patrón de formación de los esclerocios en forma de un anillo alrededor o en el borde de la placa (Willettts y Wong, 1971; Le Tourneau, 1979). Cook (1970) consideró este momento como edad 0 del esclerocio y la describió como una masa hifal que no puede ser removida del medio, posiblemente por la secreción de una substancia parecida a mucílago que puede funcionar como un adhesivo (Erental *et al.*, 2008). Estos agregados, de color blanco y apariencia algodonosa (Figura 4.2B) constituyen parte de lo que es la etapa de iniciación en el proceso de formación de los esclerocios.

Durante la etapa de desarrollo, a partir del sexto día, los agregados se compactaron y presentaron coloración grisácea (Figura 4.2C) y aparecieron pequeñas gotas de exudados sobre su superficie. Hay reportes que indican que estos exudados contienen sales, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas solubles y enzimas como fenoloxidasas, peroxidasas, catalasas y glucosidasas (Willettts y Wong, 1980).

La superficie del esclerocio siguió obscureciéndose los días posteriores hasta ser completamente de color negro, de consistencia rígida y sin presencia de exudados (noveno día, Figura 4.2D). Este comportamiento, característico durante la fase de maduración, es resultado de la acumulación de melanina (Jones, 1970; Erental *et al.*, 2008), un compuesto que se cree juega un papel importante en la protección contra agentes ambientales nocivos (rayos UV, especies reactivas de oxígeno) y ataque por microorganismos antagonistas (Willettts y Bullock, 1992; Bolton *et al.*; 2006; Erental *et al.*, 2008; Saharan y Mehta, 2008). Cuando el esclerocio está completamente maduro (aproximadamente una semana), éste puede ser removido del sustrato con facilidad (Le Tourneau, 1979).

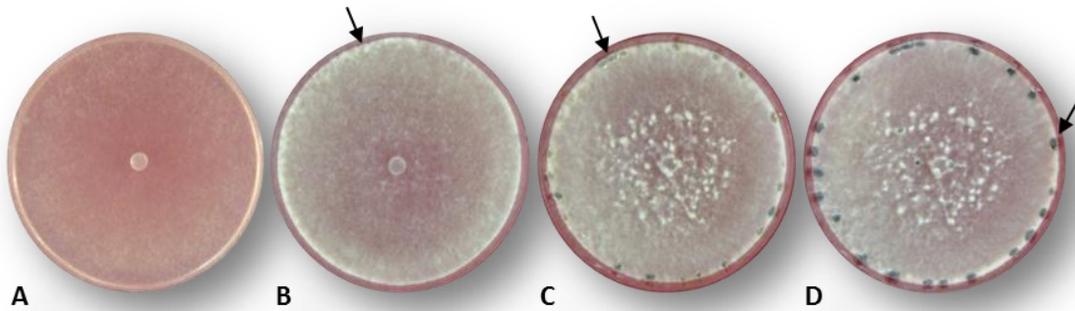


Figura 4.2. Cultivo de *Sclerotinia sclerotiorum* crecido en medio papa dextrosa agar durante nueve días. A) El micelio cubre por completo la caja de Petri al cuarto día, B) Agregación de hifas aéreas (iniciación) que darán origen a los esclerocios (observado al quinto día), C) Esclerocios en proceso de desarrollo, condensación de hifas y exudación (séptimo día), y D) Esclerocios maduros, con una corteza seca y melanizada (novenno día).

Al igual que en la formación de los primordios, se dio seguimiento de las etapas de iniciación, desarrollo y maduración a través de microscopía electrónica de barrido aparte de la óptica, observándose el mismo comportamiento. Durante la etapa de iniciación, los agregados hifales que se apreciaron a simple vista en las cajas el quinto día, surgieron como una masa de micelio entrelazado y formaron un ligero abultamiento sobre el medio (Figura 4.3A y D), así también se observó la secreción de una sustancia que, como se mencionó anteriormente, puede funcionar como adhesivo hifal.

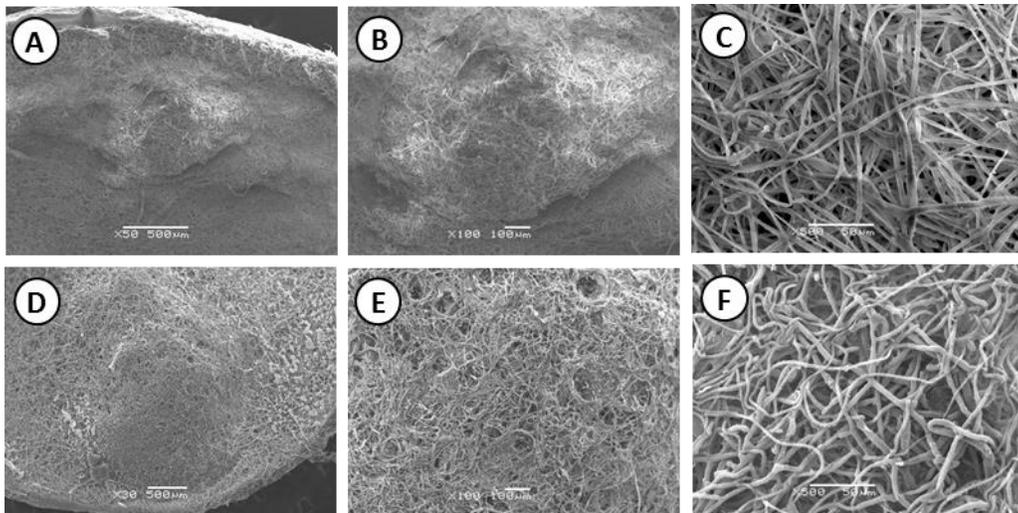


Figura 4.3. Diferenciación del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum*. A-C) Esclerocio en etapa de iniciación, quinto día de sembrado el cultivo. D-F) Abultamiento de micelio entrelazado al sexto día.

Entre el sexto (Figura 4.3A-C) y séptimo día (Figura 4.3D-F) del estado de desarrollo, las hifas coalescieron y comenzaron a compactarse, dando origen a una estructura redonda y de mayor tamaño, las hifas que cubren su superficie se unieron aparentando un tejido sólido. Pequeñas gotas de exudados fueron observadas sobre la superficie del esclerocio; sin embargo, al momento de realizar la fijación de las muestras éstas se perdieron. Colotelo (1974) reportó que las células de la corteza de *S. sclerotiorum* están cubiertas por un material membranoso que proviene de restos colapsados de los exudados secretados durante el desarrollo.

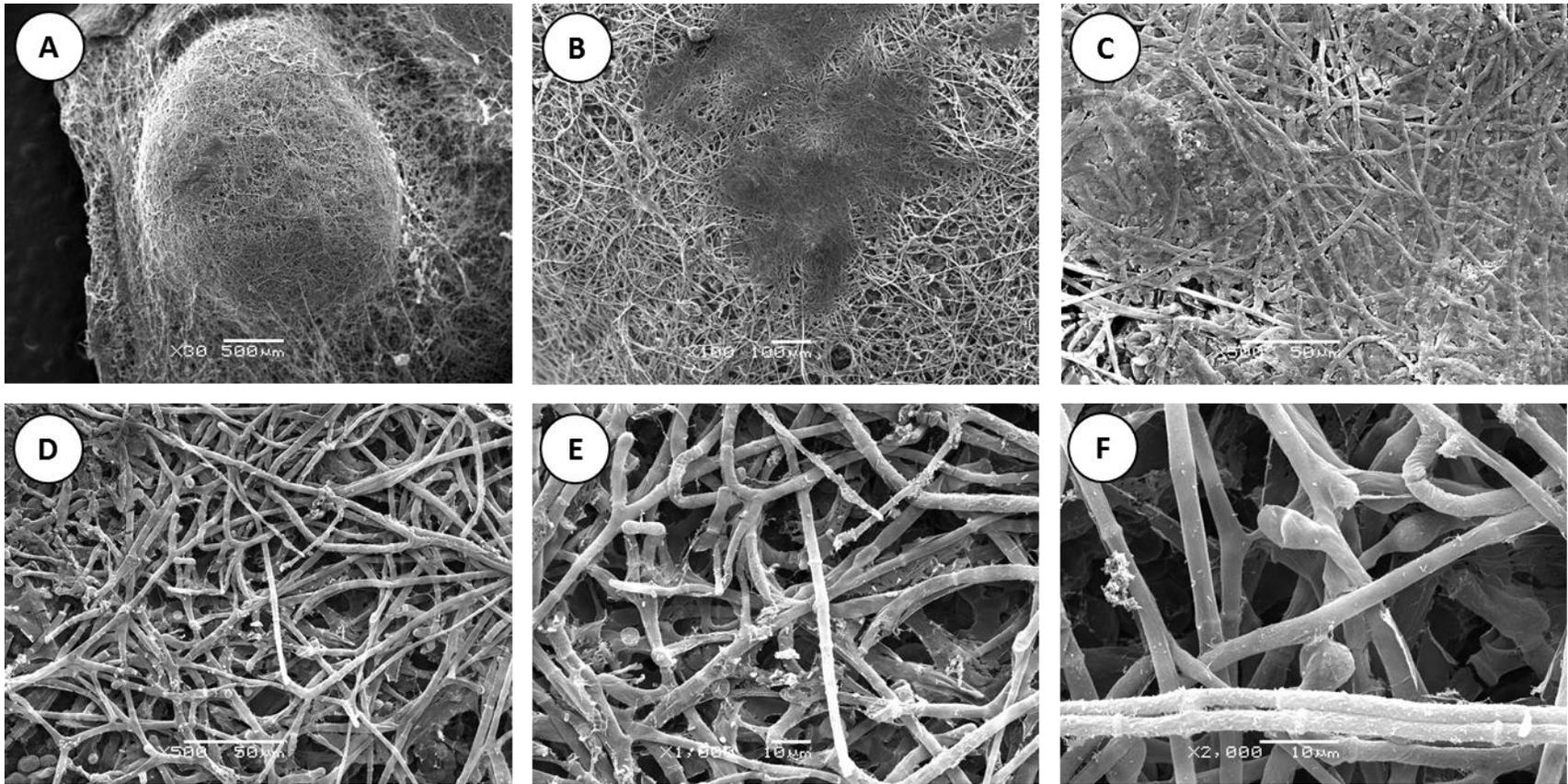


Figura 4.4. Esclerocio en etapa de desarrollo, observado al séptimo día de sembrado el cultivo fúngico. A) Estructura globosa del esclerocio en desarrollo, B) Hifas entrelazadas que darán origen a la corteza, C-F) Acercamiento de la red micelial que cubre la superficie del esclerocio.

Al octavo día, el esclerocio presentó una forma más definida que le permitió ser separado del medio de cultivo (Figura 4.5A), pero aún se pudieron observar algunas hifas cubriéndolo (Figura 4.5B y C), el ápice de las hifas de la parte interna comenzaron a hincharse, a hacerse globosas y a proyectarse hacia la superficie externa (Figuras 4.5D-F). Willetts y Wong (1971) reportaron que este patrón se debe a la reducción del espacio libre dentro del esclerocio, por lo que las puntas de las hifas se proyectan de manera ordenada hacia la superficie.

Después de nueve días de crecimiento, el esclerocio ya está maduro, su forma es esférica, de color negro (Figura 4.6A), textura rugosa (Figura 4.6B) en la cual son visibles marcadas depresiones (Figura 4.6C) y no se aprecian gotas de exudados sobre su superficie. Este patrón de desarrollo de esclerocios de *S. sclerotiorum* concuerda con lo descrito por Colotelo (1974) y Erental *et al.* (2008), aunque el primero menciona que al cuarto día después de la inoculación se aprecia a simple vista la formación del esclerocio. Durante esta etapa los esclerocios pasan por procesos como deposición de polisacáridos estructurales y de almacenaje, pigmentación y deshidratación del tejido (Willetts y Wong, 1980).

Las etapas de iniciación y maduración pueden verse afectadas por factores como fotoperiodo, temperatura, concentración de oxígeno y nutrientes (Willetts y Bullock, 1992). Además, se ha demostrado que el pH influye sobre el desarrollo del esclerocio; en pH neutro o alcalino la formación de esclerocios es inhibida (Rollins y Dickman, 1998).

Cada una de las etapas descritas mediante microscopía de barrido se corrobora con lo observado previamente mediante microcultivos de Riddell.

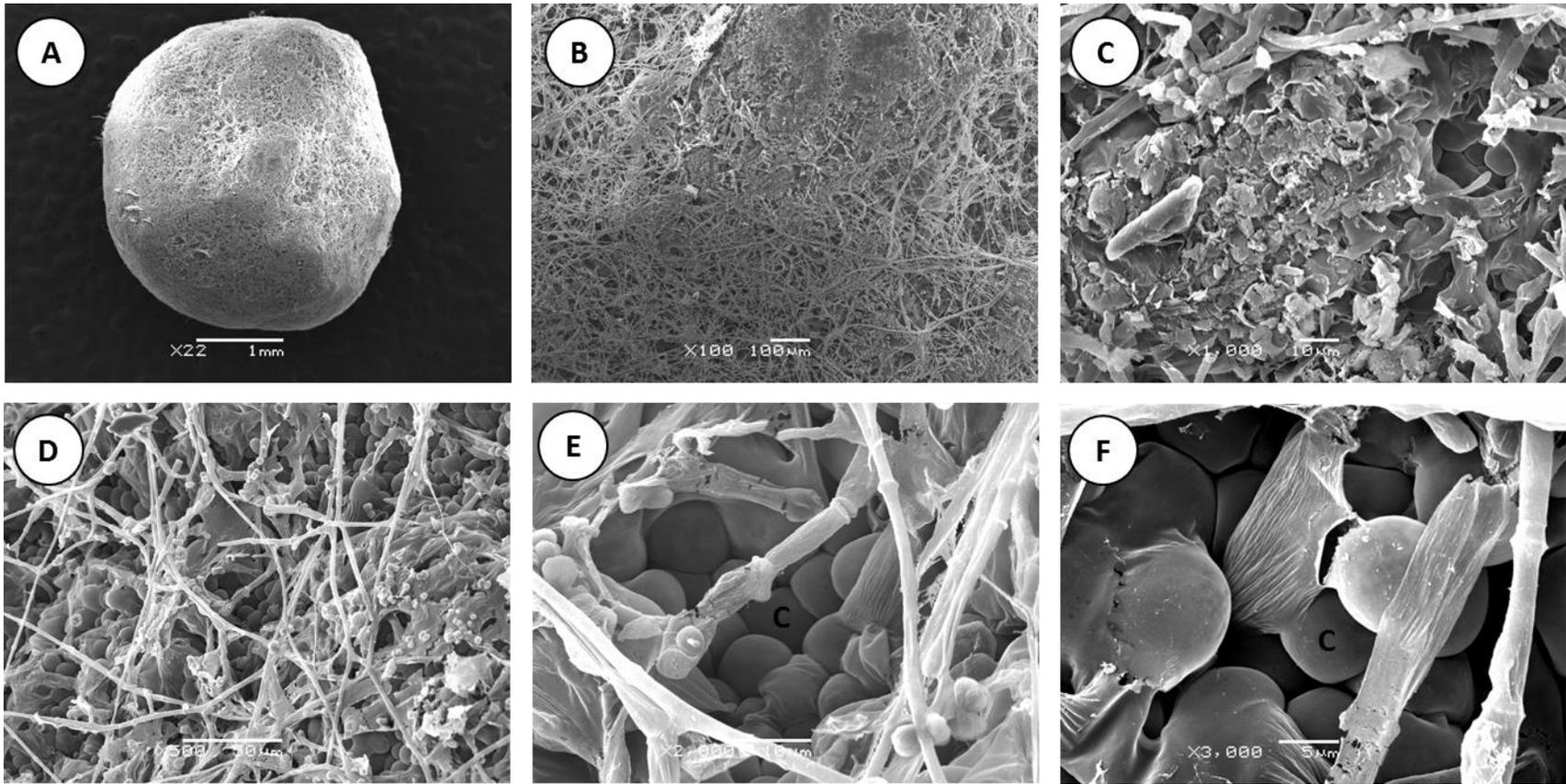


Figura 4.5. Esclerocio en proceso de maduración, al octavo día después de sembrado el cultivo fúngico. A) Estructura esférica, B) Micelio cubriendo la superficie del esclerocio, C) Capa membranosa que comienza a desarrollarse sobre la superficie del esclerocio, D) Hifas proyectándose hacia el exterior, E y F) Células globosas (c) de las puntas hifales.

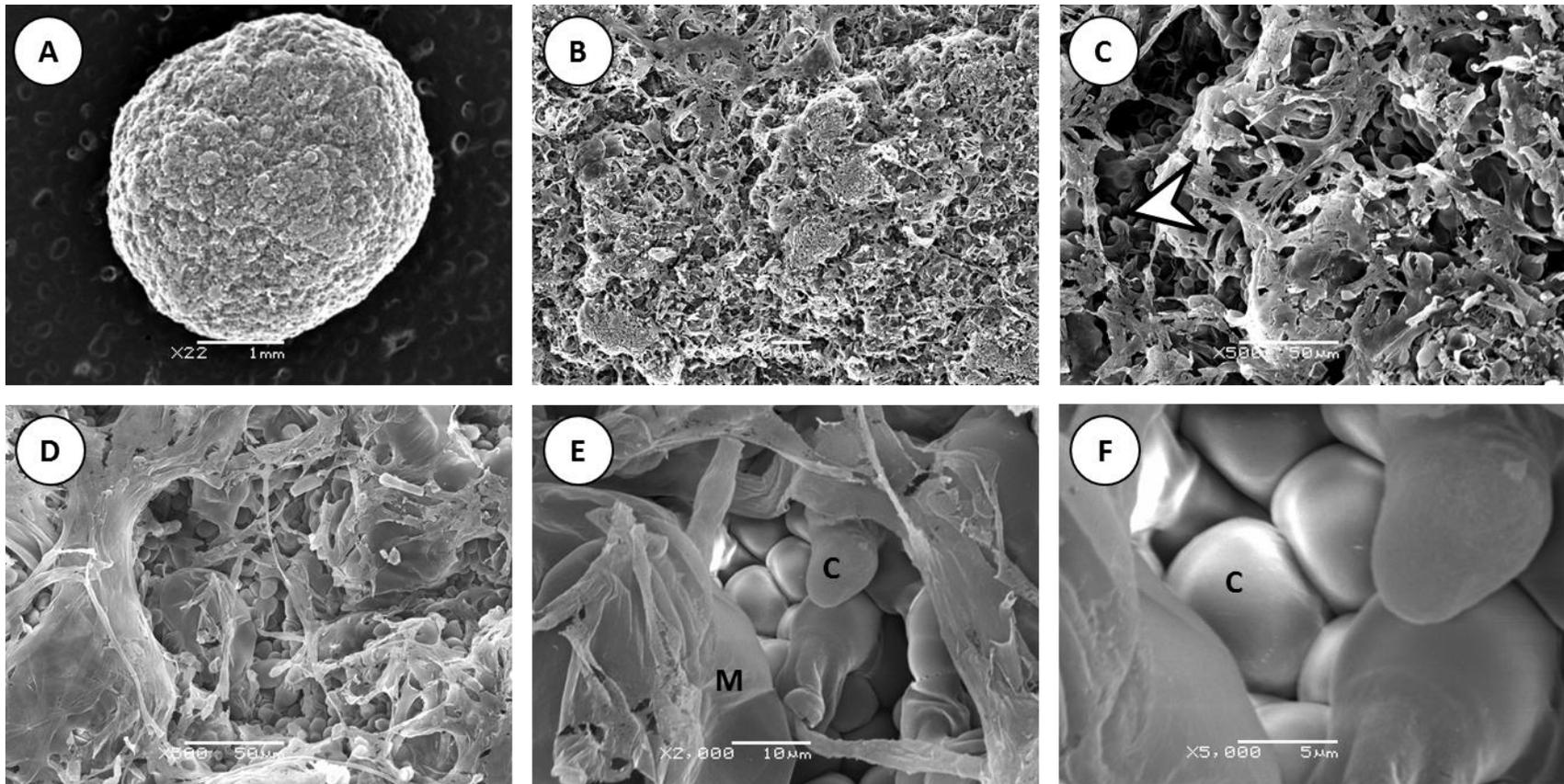


Figura 4.6. Esclerocio maduro después de nueve días de sembrado el hongo. A) Vista panorámica del esclerocio; B) Superficie de la corteza con apariencia rugosa; C) Cavidades sobre la superficie (flecha); D) Células de la corteza debajo de la red hifal; E y F) Células globosas (c) y con textura lisa, en ocasiones cubiertas por una membrana (M).

4.3.2. Estructura del esclerocio de *S. sclerotiorum*.

Se ha reportado que cuando el esclerocio se encuentra maduro está conformado por tres regiones diferentes: corteza, córtex y médula (Townsend y Willetts, 1954; Willets y Wong, 1971). En el presente experimento se logró observar que el esclerocio de *S. sclerotiorum* está constituido por dos capas: corteza y médula (Figura 4.7A) y aunque se observó cierto grado diferencial entre ambas capas fue difícil identificar con certeza la presencia de un córtex como lo reportaron Townsend y Willetts (1954) y Willets y Wong (1971); sin embargo, se coincide con lo descrito por Colotelo (1974) y Arseniuk y Macewicz (1994).

La corteza corresponde a la región más externa y está integrada por hifas estrechamente organizadas para formar una capa continua (Figura 4.7B), cuya punta está hinchada y sus paredes son las más gruesas de todas las células del esclerocio (Figura 4.7C). Esta región se encuentra cubierta por melanina, la cual confiere el color negro al esclerocio.

La médula constituye la mayor parte del volumen del esclerocio, y consta de hifas filamentosas que penetran en todas direcciones creando una red fibrilar entretejida; además se observaron espacios interhifales entre ellas (Figura 4.7D). Aparentemente, la función de la médula es contener las reservas nutritivas que son utilizadas durante el periodo de supervivencia o germinación, además está compuesta de carbohidratos, principalmente β -glucanos y proteínas (Le Tourneau, 1979). En la Figura 4.8 se aprecia la estructura a lo largo del esclerocio, las Figuras 4.8A y D corresponden a los extremos izquierdo y derecho respectivamente, y las Figuras 4.8B y C a la parte central.

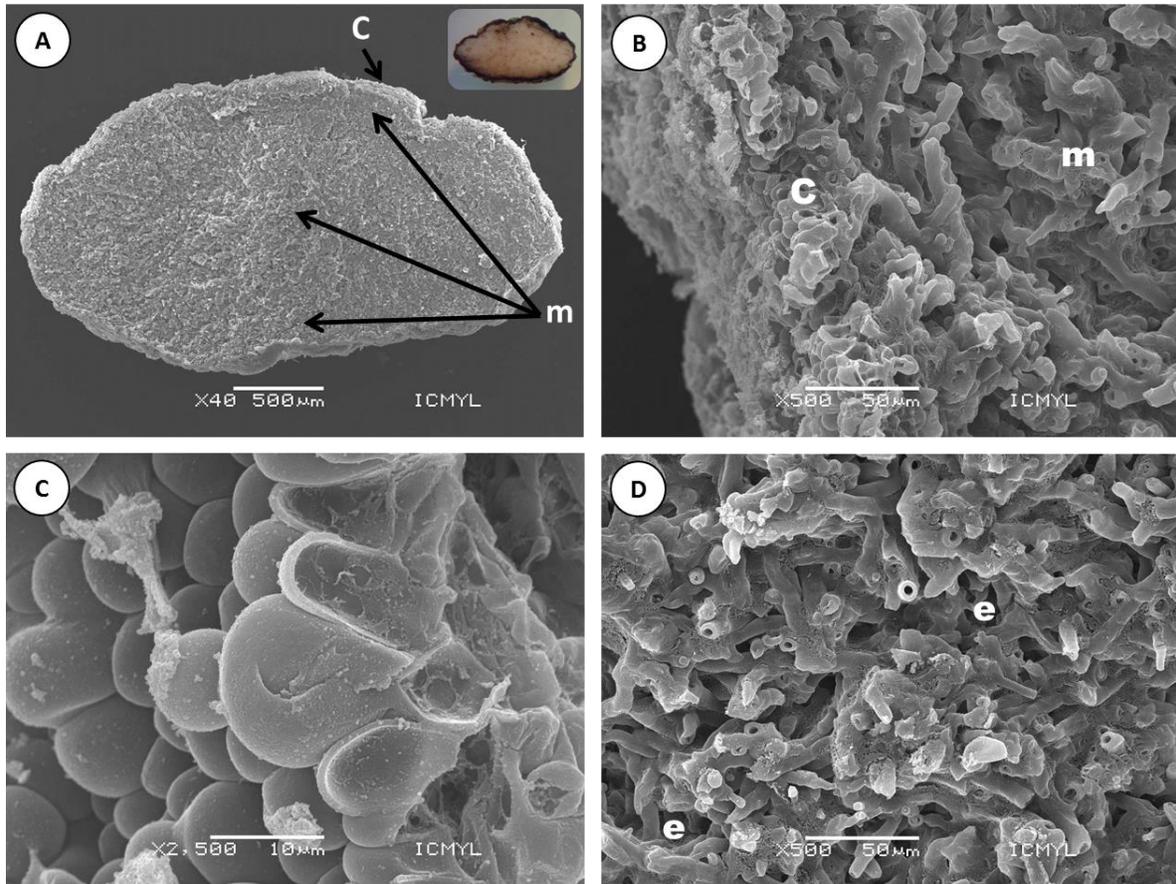


Figura 4.7. Corte transversal de un esclerocio maduro de *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Vista panorámica de las partes que conforman al esclerocio maduro: corteza (c) y médula (m); B) Acercamiento de corteza y médula; C) Células que conforman la corteza del esclerocio; D) Médula, en la que se pueden apreciar espacios interhifales (e).

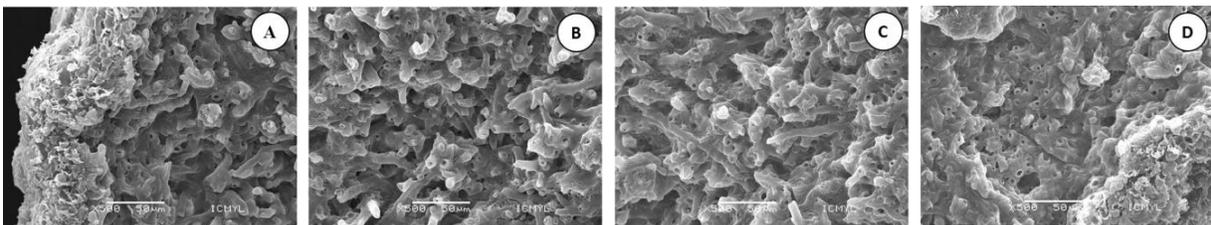


Figura 4.8. Fotografías tomadas a lo largo del esclerocio. A) Extremo izquierdo; B y C) Región interna; D) Extremo derecho.

4.3.4 Confrontación *in vitro*.

En cuanto a la interacción entre ambos hongos se observó que *Trichoderma* creció en abundancia sobre *S. sclerotiorum* (Figura 4.9A). Así también se observó enrollamiento y estrangulación del patógeno por parte del hongo antagonista (Figuras 4.9B y C). En su mayoría, *Trichoderma* creció sobre *S. sclerotiorum* pero se perdió la capa que recubre las hifas de *S. sclerotiorum*, dañándolas y ocasionando la liberación de contenido citoplasmático (Figuras 4.9D), esto debido posiblemente a la producción de enzimas hidrolíticas las cuales generan cambios estructurales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Ezziyyani *et al.*, 2004). Eslaminejad *et al.* (2012) al observar microscópicamente la zona de interacción entre *R. solani* y *T. viride* detectaron que el micelio de *T. viride* creció sobre la superficie del patógeno, sin llegar a enrollarlo, pero causando el colapso de las hifas por lo que sugirieron la acción de enzimas tales como quitinasas y glucanasas.

Estos eventos encontrados en la interacción entre *Trichoderma* y *S. sclerotiorum*, demuestran que el antagonista puede controlar al patógeno, como se observó a nivel macroscópico.

Las especies del género *Trichoderma* forman parte de un grupo complejo de hongos filamentosos, clasificados como hongos mitospóricos, caracterizados por no presentar un estado sexual determinado, y se encuentran de manera natural en el suelo, donde pueden vivir saprofiticamente o parasitando a otros hongos (Zago *et al.*, 2001). Las especies clasificadas dentro de este género se han utilizado en experimentos de control biológico de muchos hongos patógenos de plantas, por su facilidad de ser aisladas y cultivadas, su crecimiento rápido en diferentes sustratos, y su habilidad de sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Benítez *et al.*, 2004; Ezziyyani *et al.*, 2004). Con base en lo observado, *Trichoderma viride* es una buena alternativa para el control de *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que en estudios previos se ha

comprobado su acción efectiva contra otros patógenos (Ibarra-Medina *et al.*, 2010; Eslaminejad *et al.*, 2012).

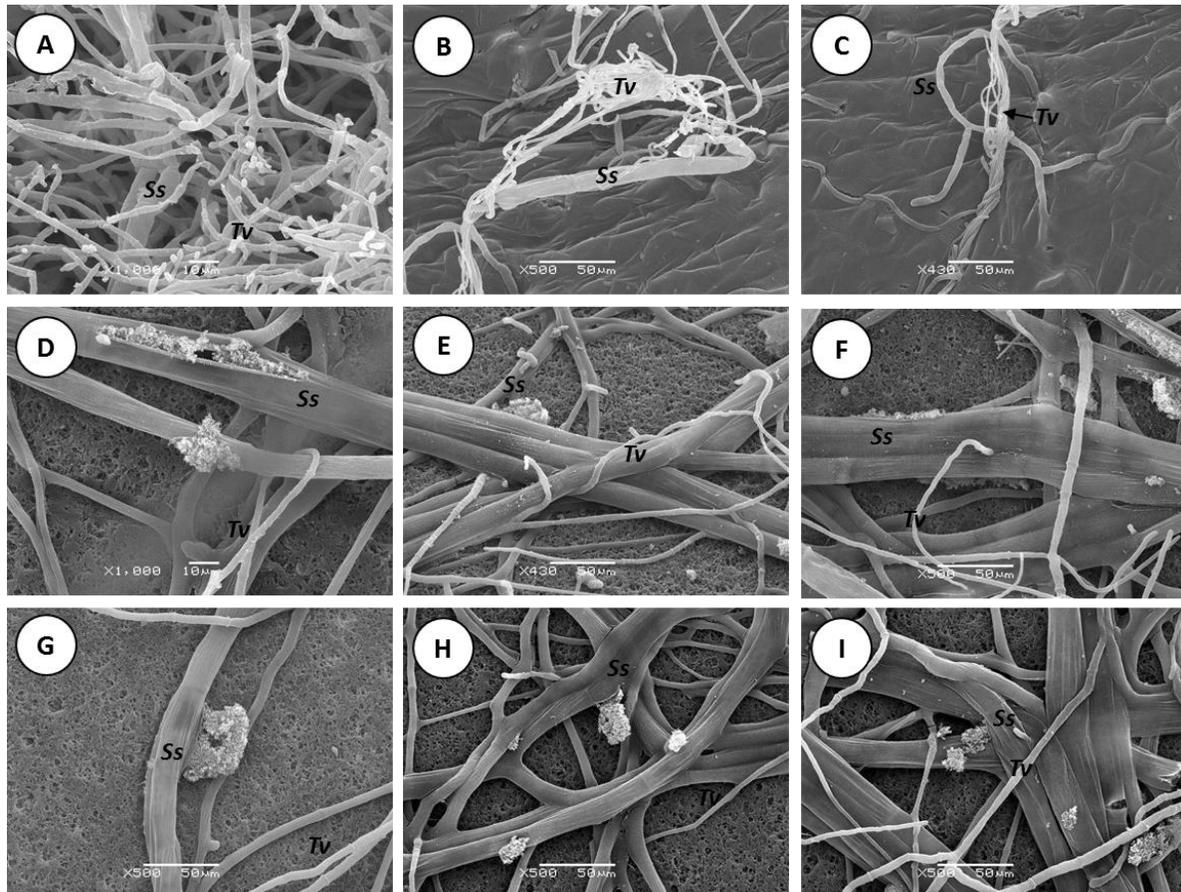


Figura 4.9. Interacciones entre *Trichoderma viride* (Tv) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss). A) Abundante crecimiento de *Trichoderma* sobre el patógeno; B y C) Estrangulamiento del patógeno por el hongo antagonista y crecimiento sobre hifa del patógeno; D-I) Pérdida de contenido citoplasmático y daño a la hifa por la presencia del antagonista.

4.3.5 Germinación de esporas de *Trichoderma viride* sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

En los experimentos realizados para seguir el proceso de germinación de las esporas de *Trichoderma* sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum*, se observó que al sumergir los esclerocios

en la solución de esporas (Experimento I) muy pocas de ellas quedaron adheridas a la superficie del esclerocio. En contraste, en los Experimentos IIA y IIB, las esporas se adhirieron mejor cuando los esclerocios fueron previamente sumergidos en agua destilada estéril o en caldo papa dextrosa (PDB). Lo anterior se constató con los resultados del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada experimento (Cuadro 4.1), pues se registró menor cantidad en el experimento I que en los experimentos IIA y IIB.

Cuadro 4.1. Unidades formadoras de colonias (UFC) de esporas vivas de *Trichoderma* por esclerocio en cada experimento.

Experimento	Adherente	UFC (por esclerocio)
I	Suspensión de esporas de <i>T. viride</i> en agua destilada estéril	70 X 10 ⁵
IIA	Esclerocios sumergidos en agua destilada estéril y arrastrados sobre cultivo de <i>T. viride</i>	296 X 10 ⁵
IIB	Esclerocios sumergidos en caldo papa dextrosa y arrastrados sobre cultivo de <i>T. viride</i>	278 X 10 ⁵

Los resultados reflejan que durante las 30 h en las que se mantuvieron los esclerocios con las esporas de *T. viride*, no se observó la formación de tubos germinativos en éstas. Únicamente se logró apreciar en una espora, del Experimento I (Figura 4.10) a las 30 h, una ligera prolongación en su base (Figura 4.10T), sugiriendo que se estaba llevando a cabo el proceso de germinación.

Aún y cuando las esporas se localizaron sobre el esclerocio, en ninguno de los experimentos a los intervalos evaluados, se observó algún daño sobre éste. Lo anterior hace suponer que fue poco el tiempo de exposición, para que el micoparásito pudiera actuar sobre el patógeno, o bien porque *S. sclerotiorum* esté segregando alguna sustancia que está impidiendo la germinación de las esporas, o incluso el simple hecho de encontrarse una tras otra. Con respecto a esto último,

hay reportes que indican que cuando las esporas de *Aspergillus niger* se encuentran en condiciones de hacinamiento, producen sustancias auto inhibitorias que impiden su germinación (Barrios-González *et al.*, 1989).

Al igual que en el experimento anterior, tanto en el experimento IIA (Figura 4.11) como en el IIB (Figura 4.12) no se observó germinación de las esporas de *T. viride* durante las 30 horas evaluadas.

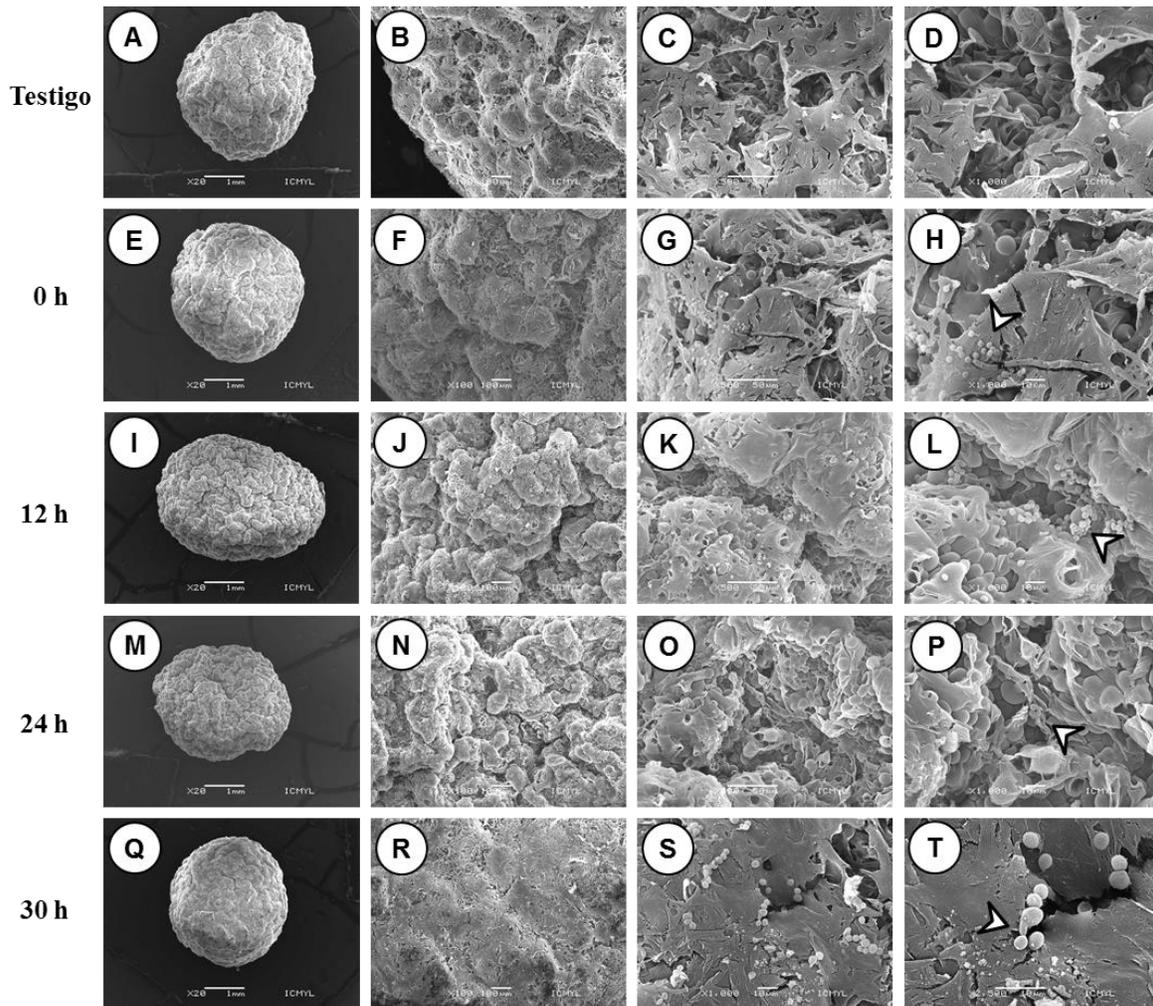


Figura 4.10. Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* sumergidos en suspensión de esporas de *Trichoderma viride* (Experimento I). A-D) Testigo, esclerocio sin esporas de *T. viride*; E-H) Esclerocio con esporas de *T. viride* sin incubar; I-L) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 12 h; M-P) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 24 h; Q-T) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 30 h, espora en proceso de germinación (flecha).

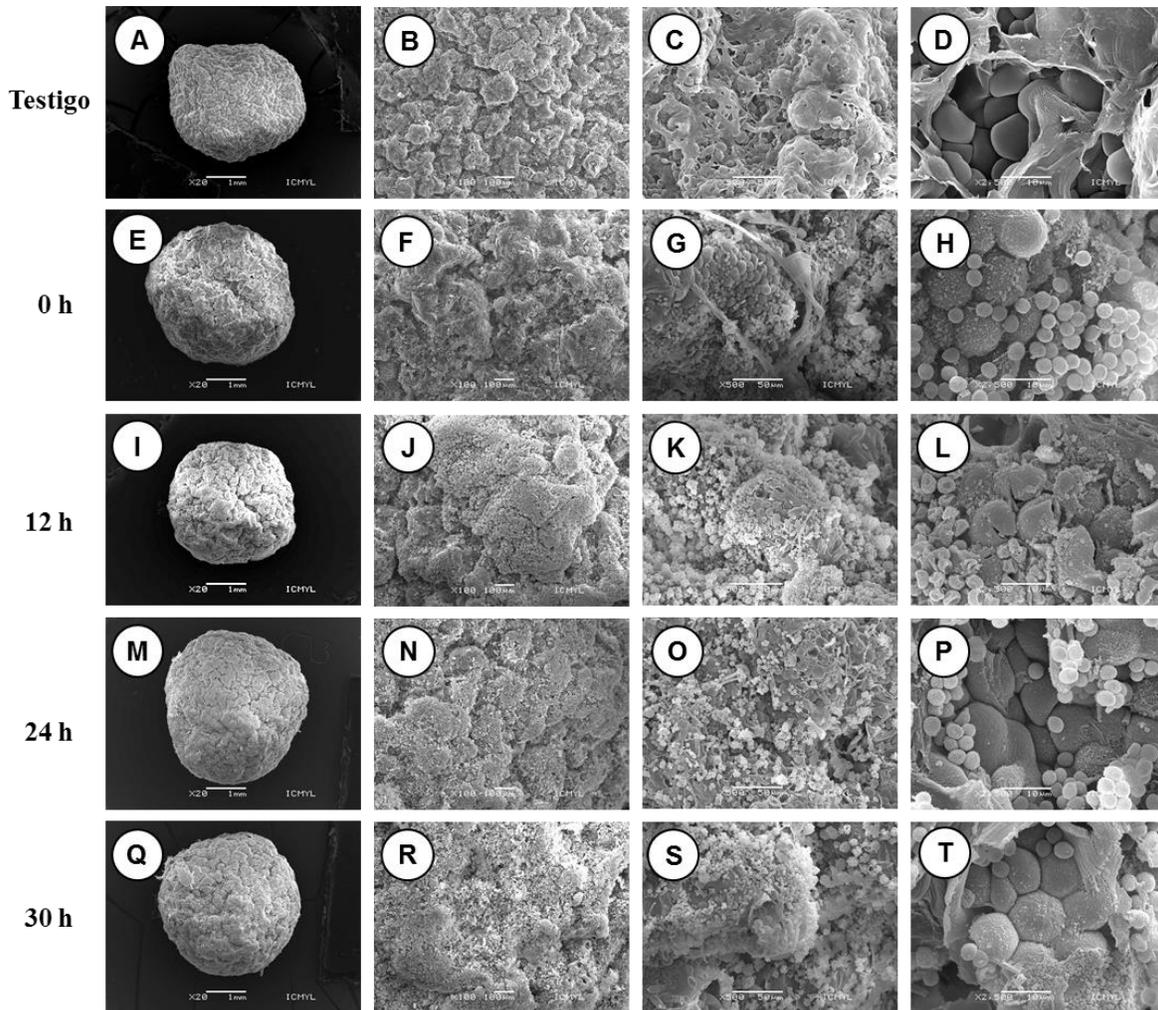


Figura 4.11. Esclerocios sumergidos en agua destilada estéril y arrastrados sobre cultivo de *Trichoderma viride* (Experimento IIa). A-D) Testigo, esclerocio sin esporas de *T. viride*; E-H) Esclerocio con esporas de *T. viride* sin incubar; I-L) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 12 h; M-P) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 24 h; Q-T) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 30 h.

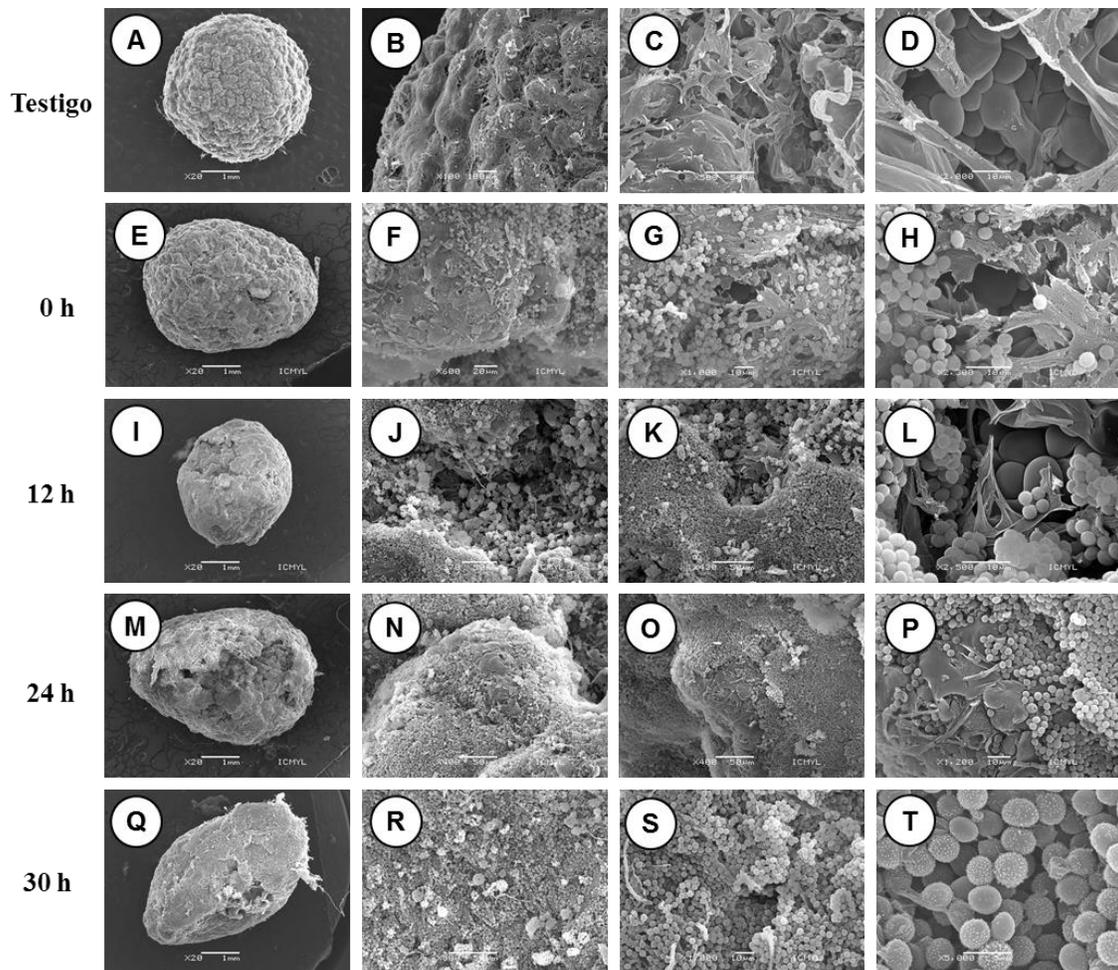


Figura 4.12. Esclerocios sumergidos en caldo papa dextrosa y arrastrados sobre cultivo de *Trichoderma viride* (Experimento IIb). A-D) Testigo, esclerocio sin esporas de *T. viride*; E-H) Esclerocio con esporas de *T. viride* sin incubar; I-L) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 12 h; M-P) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 24 h; Q-T) Esclerocio con esporas de *T. viride* incubado durante 30 h.

4.3.6 Colonización de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma viride*.

Trichoderma viride se consideró como alternativa para el control de *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que en estudios previos en laboratorio, se comprobó su acción efectiva en la degradación de los esclerocios (Ibarra-Medina *et al.*, 2010). En la Figura 4.13 se puede observar como después de 16 días de estar el esclerocio en contacto con *T. viride*, presenta deformación y destrucción en gran parte de su estructura (Figura 4.13E) en comparación con el testigo (Figura 4.13A). Este efecto de *Trichoderma* sobre esclerocios también fue observado por Ibarra-Medina *et al.* (2010) cuando confrontaron estos mismos hongos. En el día 16, el esclerocio estaba completamente invadido por esporas e hifas del micoparásito (Figura 4.13E-H).

Después de 30 días *T. viride* afectó la estructura del esclerocio, en comparación con el Testigo (Figura 4.14A-D). Las hifas del antagonista crecieron abundantemente sobre la superficie del esclerocio (Figura 4.14F), y formaron una densa red (Figura 4.14G), a diferencia del esclerocio de 16 días, este ya comenzaba a ablandarse. El tejido medular colapsó, quedando el esclerocio plano y, posteriormente comenzó a desintegrarse (Figura 4.14H), dando apariencia de láminas sobrepuestas y perdiendo la organización de las hifas.

A los 45 días, el esclerocio estaba muy blando, había perdido la rigidez que lo caracteriza (Figura 4.15A), y después de realizado el proceso de secado y al momento de montarlo para observarlo al microscopio se fracturó (Figura 4.15E).

No se encontraron conidios de *T. viride*, dentro del esclerocio degradado, pero fueron abundantes sobre su superficie (Figura 4.15F y G) en donde se observaron algunas hifas que

crecían a lo largo de la corteza pero sin penetrarla (Figura 4.15H). La médula presentó apariencia de un material poroso, completamente degradada. Henis *et al.* (1983) reportaron que el micelio de las especies *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. hamatum*, parecía crecer a través de la corteza y córtex, del esclerocio de *Sclerotium rolfsii*, sin afectar las células hospedantes. Lo anterior contrasta con el efecto observado con *T. viride* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*, al parecer el modo de acción de *T. viride* sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum* es por medio de secreción de compuestos enzimáticos, que actúan principalmente sobre la médula, la cual al irse degradando ocasiona que la rigidez del esclerocio se pierda y, posteriormente las células de la corteza comiencen a dañarse (Dos Santos y Dhingra, 1982).

Con herramientas moleculares como PCR en tiempo real y la inserción del gen de la fluorescencia, Sarrocco *et al.* (2006) así como Kim y Knudsen (2011), dieron seguimiento al proceso de colonización de esclerocios de *S. sclerotiorum* por los hongos *T. virens* y *T. harzianum*. Ellos observaron que después de 20 días, la médula del esclerocio fue colonizada por el antagonista y muchos tejidos fueron reemplazados por hifas de *Trichoderma*. Verma *et al.* (2007), demostraron que la médula de los esclerocios de *Sclerotium delphinii* (mantenidos sobre cultivos de agar) fue completamente reemplazada por hifas y clamidosporas de *T. hamatum*, además indicaron la penetración e infección de *Trichoderma* spp. en esclerocios de *S. rolfsii*, donde la producción de clamidosporas fue mayor en comparación a los conidios. En interacción con *S. trifoliorum* las hifas de *C. minutans* aparentemente crecieron a través del tejido del esclerocio sin causar muchos daños físicos, no obstante sobre el exterior se observaron con frecuencia picnidios (Henis *et al.*, 1983).

Los resultados obtenidos de este trabajo mostraron daño a la médula del esclerocio, pero nunca se observaron esporas u otras estructuras de *T. viride* dentro del esclerocio, además cabe señalar que las células de la corteza, las cuales están cubiertas por melanina, aparentemente fueron más resistentes al ataque. Esta aparente resistencia se debe posiblemente a que la deposición de melanina en las paredes de la corteza reduce la permeabilidad de las células, protege al esclerocio de los agentes ambientales perjudiciales y de la degradación biológica por enzimas producidas por el mismo hongo o por microorganismos antagonistas (Willettts y Bullock, 1992).

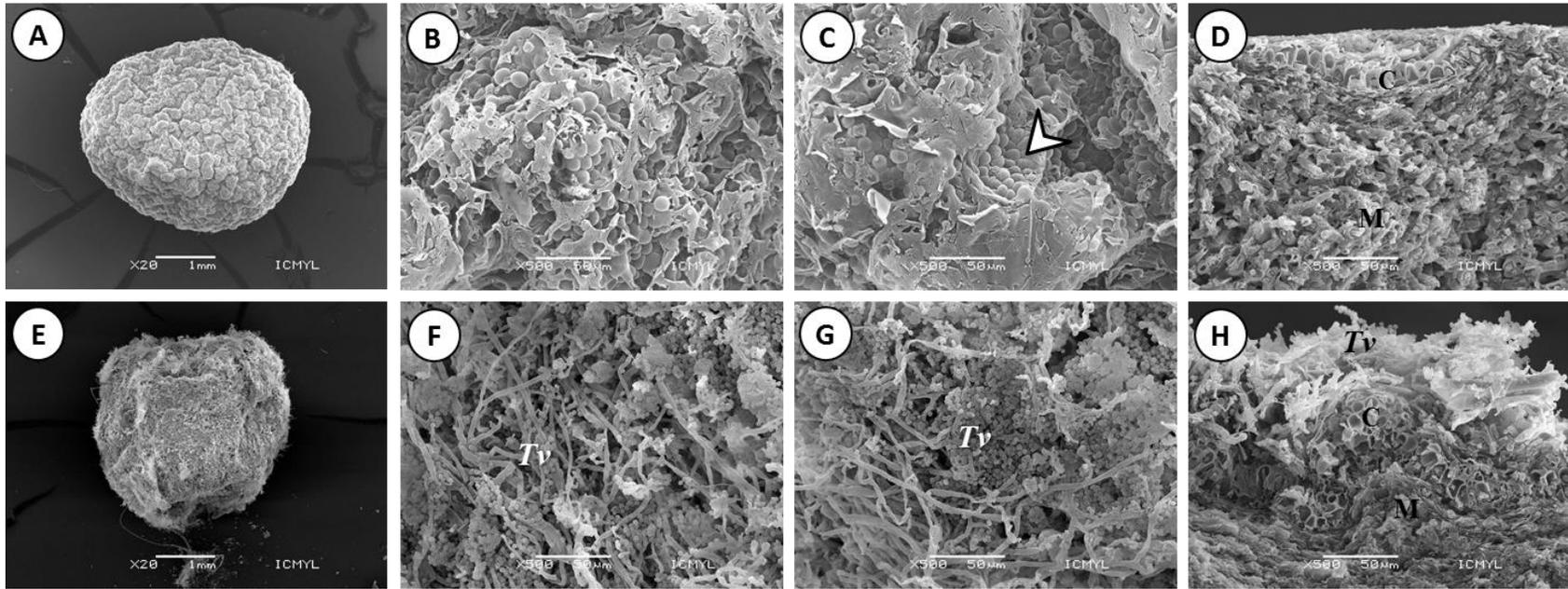


Figura 4.13. Microfotografías del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitado por *Trichoderma viride* (*Tv*), 16 días de incubación. Testigo (A-D): A) Esclerocio sin esporas de *T. viride* mostrando su textura rugosa; B) Superficie de la corteza del esclerocio; C) Células que conforman la corteza del esclerocio (flecha); D) Estructura interna del esclerocio, mostrando la corteza (C) y la médula (M). Esclerocio parasitado por *Trichoderma viride* (E-H): E) Colonización del esclerocio por *T. viride*; F-G) Hifas y esporas de *T. viride* creciendo sobre la superficie del esclerocio; H) Corte transversal del esclerocio, en contacto con *T. viride*, que muestra que la médula comienza a colapsar.

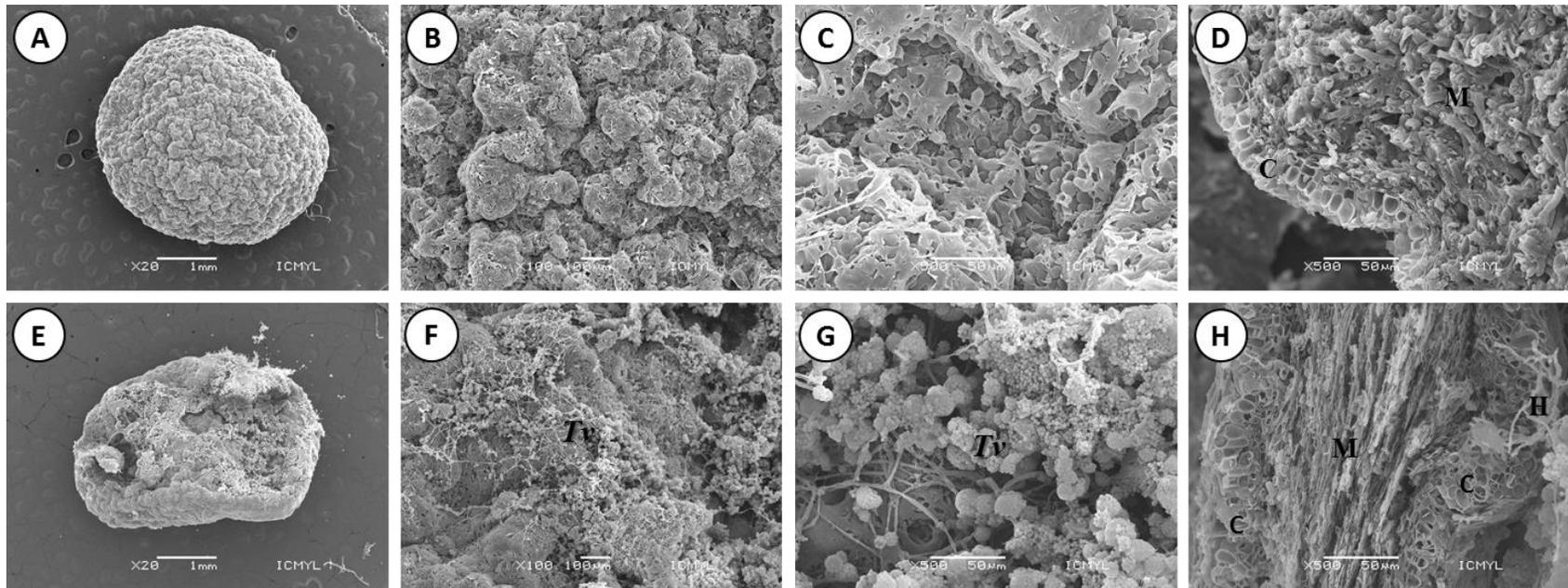


Figura 4.14. Microfotografías del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitado por *Trichoderma viride* (*Tv*), después de 30 días de incubación. Testigo (A-D): A) Esclerocio sin esporas de *T. viride*; B) Aspecto de la corteza del esclerocio; C) Hundimientos característicos de la superficie del esclerocio; D) Estructura interna del esclerocio en la que se aprecia la corteza (C) y la médula (M). Esclerocio parasitado por *Trichoderma viride* (E-H): E) Esclerocio micoparasitado en el que se observa degradación de la estructura; F-G) Hifas y esporas de *T. viride* creciendo sobre la superficie del esclerocio; H) Colapso del esclerocio ocasionando la pérdida de la integridad de la médula. En esta imagen aún se aprecia parte de las hifas que conforman el área medular del esclerocio, a diferencia de cuando la incubación se prolongó hasta los 45 días donde las hifas fueron completamente destruidas.

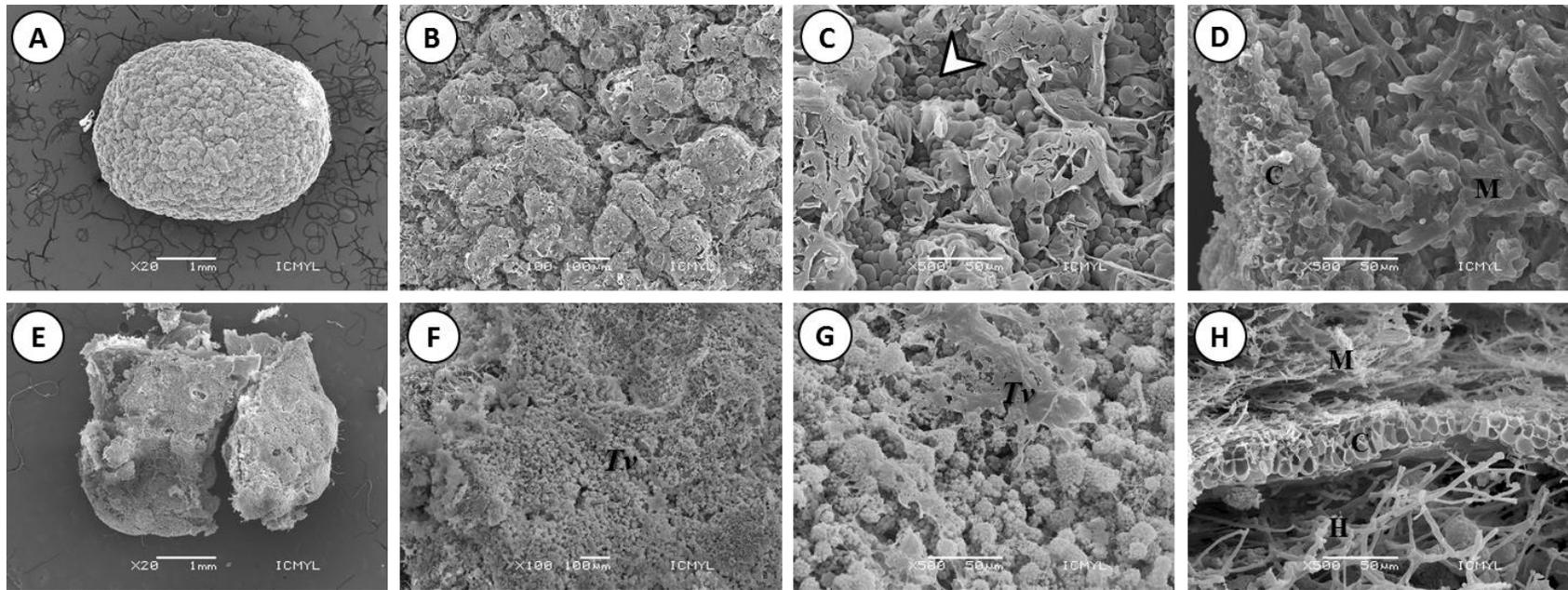


Figura 4.15. Microfotografías del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitado por *Trichoderma viride* (*Tv*), después de 45 días de incubación. Testigo (A-D): A) Esclerocio sin esporas de *T. viride*; B) Superficie rugosa del esclerocio; C) Células que conforman la corteza del esclerocio (flecha); D) Estructura interna del esclerocio mostrando corteza (C) y médula (M). Esclerocio parasitado por *Trichoderma viride* (E-H): E) Superficie del esclerocio micoparasitada por *Trichoderma viride*; F-G) Esporas de *T. viride* creciendo sobre la superficie del esclerocio; H) Médula completamente degradada por el contacto de hifas (H) de *Trichoderma*.

Trichoderma viride demostró su habilidad antagónica hacia los esclerocios de *S. sclerotiorum*, al causar severos daños a la médula que se hicieron más evidentes conforme aumentó el periodo de incubación (de 16 a 45 días). Ibarra-Medina *et al.* (2010) reportaron deformación, colapso y agrietamiento en los esclerocios de *S. sclerotiorum* cuando estuvieron expuestos a *T. viride*, durante un periodo de ocho a diez días a partir del encuentro miceliar. Por otro lado, el hongo *Sporidesmium sclerotivorum* en ambientes naturales puede llegar a infectar el esclerocio de *S. sclerotiorum* en dos semanas, y bajo condiciones ambientales apropiadas, puede destruirlo completamente en ocho semanas (Willetts y Wong, 1980), o bien una vez que el esclerocio es dañado otros organismos pueden invadirlo y desintegrarlo (Coley-Smith y Cooke, 1971).

Saharan y Mehta (2008) describieron que la estructura interna del esclerocio contiene β -glucanos, quitina, glucógeno, aminoácidos, ácidos grasos y proteínas; por lo tanto, la degradación de la región medular por el antagonista puede ser debido a la liberación de β -glucanasas (Bolton *et al.*, 2006). Jones *et al.* (1974) reportaron que *T. viride* secreta dichas enzimas y que están involucradas en la destrucción de las paredes del esclerocio. Así también *Coniothyrium minitans* ha sido reportado como hiperparásito de esclerocios de *S. sclerotiorum* a través de la secreción de β -1,3 glucanasas, las cuales degradan y lisan los tejidos de los esclerocios (Willetts y Wong, 1980).

El control de la enfermedad podría ser posible si el ciclo de vida del hongo fuera interrumpido, evitando la formación o la germinación de los esclerocios, por lo que *Trichoderma viride* puede ser considerado como un buen micoparásito para llevar a cabo dicha acción.

4.4 CONCLUSIONES

- Las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica de barrido no solo confirmaron lo visualizado mediante microscopía óptica, sino que además permitieron tener mayor apreciación de los eventos que acontecen durante el proceso de formación de los esclerocios.

- La estructura del esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* está conformada por corteza y médula.

- Se describe con detalle el desarrollo de los esclerocios, desde la bifurcación de las hifas hasta la formación de la estructura rígida que caracteriza a los esclerocios.

- *Trichoderma viride* demostró su efecto micoparasítico hacia los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* al causar severos daños a médula.

CAPÍTULO V

EFECTO DE BICARBONATO DE POTASIO E IPRODIONE SOBRE EL CRECIMIENTO Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* Y *Trichoderma viride*

Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica del bicarbonato de potasio (KHCO_3) y del fungicida iprodione a diferentes concentraciones frente a los hongos *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*, en medio de cultivo papa dextrosa agar. Las concentraciones de bicarbonato mayores a 10 mM de KHCO_3 inhibieron el crecimiento de *T. viride* y la formación de esclerocios de *S. sclerotiorum*, y ambos hongos mostraron cambios en la morfología del micelio. En el caso del fungicida iprodione el efecto fue mayor ya que a la concentración de 0.25 mM inhibió el crecimiento de ambos hongos. La adición combinada del KHCO_3 y del fungicida no controla al patógeno; sin embargo, el antagonismo hacia *Sclerotinia* mediante KHCO_3 o *Trichoderma* resultó ser más eficiente. Mediante cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas, se evaluó el contenido de ácidos grasos de los hongos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, en presencia del fungicida iprodione (0.25 mM) y del bicarbonato de potasio (10 mM). Los ácidos palmítico, oleico y linoleico fueron los predominantes en *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, pero se vieron disminuidos por la presencia del bicarbonato y del fungicida.

Palabras clave: fungicida, crecimiento, lípidos, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico

CHAPTER V

EFFECT OF POTASSIUM BICARBONATE AND IPRODIONE ON GROWTH AND FATTY ACID PROFILES OF *Sclerotinia sclerotiorum* AND *Trichoderma viride*

Abstract

The antifungal activity of potassium bicarbonate (KHCO_3) and iprodione on growth and development of *Trichoderma viride* and *Sclerotinia sclerotiorum* was assessed on potato dextrose agar. Concentrations of bicarbonate greater than 10 mM inhibited the growth of *T. viride* and the formation of sclerotia by *S. sclerotiorum*, and both fungi showed changes on the mycelium morphology. In the case of the fungicide iprodione its main effect was evident at the concentration of 0.25 mM which inhibited the growth of both fungi. The combined addition of KHCO_3 and the fungicide did not control the growth of the pathogen; however, the single application of KHCO_3 or the inoculation of *Trichoderma* resulted in more efficient control to the pathogen. By means of gas chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) the content of fatty acids of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Trichoderma viride*, were assessed in the presence of iprodione (0.25 mM) or potassium bicarbonate (10 mM). The palmitic, oleic, and linoleic acids were the most abundant in both *Sclerotinia sclerotiorum* and *Trichoderma viride*, but all those acids were diminished due to the application of potassium bicarbonate or iprodione.

Key words: fungicide, growth, lipids, palmitic acid, linoleic acid, oleic acid

5.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades de mayor incidencia en los cultivos que generan grandes pérdidas se encuentra la producida por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. Los principales métodos de control se basan en la utilización de fungicidas, especialmente los del grupo de las dicarboximidas, cuyos modos de acción incluyen inestabilidad mitótica, segregación somática de cromosomas, inhibición de síntesis de DNA, inhibición de síntesis de pared celular e incremento en los niveles de ácidos grasos libres (Orth *et al.*, 1992). En este grupo se encuentra el fungicida iprodione, 3-(3,5-diclorofenil)-*N*-isopropil-2,4-dioxoimidazolidin-1-carboximida, el cual posee un espectro de acción amplio y una actividad esencialmente protectora contra hongos de los géneros *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Sclerotium* y *Phoma* (Muiño *et al.*, 2010; Pommer y Lorenz, 1982). Este fungicida inhibe la germinación de las esporas y por consecuencia bloquea el crecimiento del micelio (Morales *et al.*, 2013); además interfiere en la síntesis de ADN, de proteínas y ARN que están relacionados con la síntesis de la pared celular y, en el metabolismo de los esteroides y lípidos (Muiño *et al.*, 2010).

Sin embargo, la aplicación repetida de los fungicidas ha provocado la aparición de cepas resistentes de los hongos *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *S. homoeocarpa* y *S. minor*, que están genéticamente relacionados con *S. sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2009), por lo que se están buscando alternativas al uso de estos productos.

Los bicarbonatos poseen propiedades antimicrobianas de amplio espectro, mostrando eficiencia en el control de muchos hongos fitopatógenos en postcosecha (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006). Algunos reportes indican que los bicarbonatos y carbonatos de sodio, potasio y amonio inhiben el crecimiento en postcosecha de varios hongos patógenos de frutas, hortalizas y plantas ornamentales (Olivier *et al.*, 1998; Palou *et al.*, 2001; Arslan *et al.*, 2006).

Por ejemplo, una breve inmersión de cítricos en soluciones de carbonato o bicarbonato de sodio redujo la incidencia del moho verde causado por *Penicillium digitatum* (Smilanick *et al.*, 1999). Además, la aplicación foliar de bicarbonatos de sodio y potasio redujo la severidad de la enfermedad causada por el hongo *Leveillula taurica* en pimiento (Fallik *et al.*, 1997). Otros cultivos en los que se ha demostrado el control de patógenos mediante la aplicación de bicarbonatos corresponden a zanahoria, pepino y melón (Aharoni *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006). Los bicarbonatos pueden alterar la permeabilidad de la membrana fúngica e inhibir las reacciones involucradas en la fosforilación oxidativa (Olivier *et al.*, 1998). La eficiencia de estos compuestos depende de su concentración (generalmente entre 0.2 y 3%) y de la susceptibilidad del microorganismo. Los mecanismos por los cuales son inhibidos aún no son bien entendidos pero de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, por sus siglas en inglés), estos compuestos son considerados seguros para la salud y el ambiente (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006).

Una alternativa más a la aplicación de los fungicidas es el uso de microorganismos antagonistas. Las especies del género fúngico *Trichoderma* han sido reportadas como potenciales agentes de control biológico de hongos fitopatógenos del suelo pues poseen la capacidad de producir metabolitos tóxicos o enzimas líticas capaces de inhibir o parasitar el micelio o los esclerocios de hongos fitopatógenos (Abdullah *et al.*, 2008).

Por otra parte, los componentes lipídicos de los hongos juegan un importante papel en la organización celular, particularmente en las membranas citoplasmáticas (Nombela-Cano y Peberdy, 1971). Además, funcionan como fuentes de reserva de energía, proporcionan la estructura de membranas y algunas paredes celulares y, constituyen hormonas que participan en la reproducción sexual (Moore-Landecker, 1996; Moat *et al.*, 2002; Tortora *et al.*, 2007). Los

lípidos se constituyen por grasas neutras o triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y esteroides (Moat *et al.*, 2002; Tortora *et al.*, 2007). Los ácidos grasos son importantes constituyentes de las células fúngicas cuyas funciones son almacenaje de material y componentes de plasmalema y membranas de organelos celulares, integran a menudo más del 70% del contenido total de lípidos (Frostegård *et al.*, 1991). Así también tienen efectos en el crecimiento, esporulación, germinación de las esporas, y la gametogénesis en los hongos (Brennan *et al.*, 1975).

El interés en la composición de los ácidos grasos radica en que la información obtenida se emplea para estudios fisiológicos, quimiotaxonómicos e intragenéricos de diferenciación en muchos organismos tales como bacterias, algas y hongos (Stahl y Klug, 1996). Aunque los hongos generalmente producen menos tipos y cantidades que las bacterias, también son útiles para su identificación y caracterización (Stahl y Klug, 1996; Larsen *et al.*; 1998, Fraga *et al.*, 2008), además en los últimos años se ha considerado su potencial como fuente de combustibles (Subramaniam *et al.*, 2010).

Dado las ventajas que se obtienen al emplear microorganismos antagonistas y sales de bicarbonatos como controladores de hongos patógenos, su aplicación ya sea en conjunto o por separado es una buena alternativa para el control de *S. sclerotiorum*, por lo que en este capítulo se evaluó el efecto del bicarbonato de potasio e iprodione en el crecimiento *in vitro* y contenido de ácidos grasos de *S. sclerotiorum* y *T. viride*.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio utilizó a los hongos *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*, que fueron reactivados y mantenidos en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) a 28 °C. El trabajo consistió de cuatro fases experimentales que se describen a continuación.

5.2.1. Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.

Se utilizó el método del cultivo en cajas de PDA enriquecido con 2, 4, 6, 8, 10, 25, 30, 35 y 40 mM del fungicida iprodione (Bayer®), y otra serie de cajas de Petri con bicarbonato de potasio (KHCO₃, Fermont®) aplicado en las mismas concentraciones; además, se incluyó un tratamiento testigo sin fungicida o sin bicarbonato. Todos los tratamientos consistieron tanto para iprodione como para bicarbonato, de cuatro repeticiones.

Posteriormente, se tomaron discos de 5 mm de diámetro con micelio recién crecido, de cada hongo, y se colocaron en cada una de las cajas y se incubaron a 28 °C en oscuridad. Diariamente se midió el diámetro de la colonia de cada uno de los hongos durante seis días.

5.2.2. Efecto de iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, y sobre la germinación de esclerocios.

Con base en los resultados obtenidos de la fase anterior se realizó otro ensayo disminuyendo la concentración del fungicida. Para lo cual se prepararon cajas de PDA con iprodione aplicado a razón de 0.25, 0.37, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mM, además de un testigo sin el fungicida. El medio de cultivo preparado para cada concentración se vertió en cajas de Petri, por cuadruplicado. Al igual que en el experimento anterior, se tomaron discos de 5 mm de diámetro con micelio en activo

crecimiento de *S. sclerotiorum* o de *T. viride*, colocados en cada una de las cajas e incubados a temperatura ambiente (~22 °C). Diariamente se midió el diámetro de la colonia de los hongos, durante siete días.

De manera simultánea se evaluó la germinación de esclerocios de *S. sclerotiorum*, obtenidos de cultivos en PDA durante una semana, con las mismas concentraciones y también se observaron durante siete días.

5.2.3. Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, solos o en interacción

En los ensayos se utilizó el método del cultivo en cajas de PDA con los siguientes tratamientos: Testigo, 10 mM de KHCO₃, 0.25 mM de iprodione, y la aplicación combinada de KHCO₃ + iprodione. El medio de cultivo preparado se vertió en cajas de Petri, considerando cuatro cajas por cada tratamiento. Se tomaron discos de 5 mm de diámetro con micelio en activo crecimiento de *S. sclerotiorum* o de *T. viride*, que se colocaron en cada caja, y se incubaron a temperatura ambiente (~22 °C). Diariamente se midió el diámetro de la colonia de los hongos, durante siete días.

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en cajas de Petri, conteniendo 20 mL de PDA de cada uno de los tratamientos mencionados. Para lo cual se colocó en un extremo de la caja de Petri un disco de 5 mm de PDA con crecimiento activo de *Trichoderma*. Después de un día de incubación, en el extremo opuesto de la caja de Petri, se colocó otro disco de PDA de 5 mm con micelio activo de *S. sclerotiorum*. Se dejaron incubando a temperatura ambiente (~22 °C) durante siete días.

5.2.3.1 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental consistió en un factorial 2 X 3, dos niveles de hongos (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*), y tres tratamientos: Testigo (solo medio PDA), KHCO_3 (10 mM) e iprodione (0.25 mM). Se tuvieron seis tratamientos distribuidos completamente al azar, cada uno con cuatro repeticiones. En total 24 unidades experimentales. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

5.2.4 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el contenido de ácidos grasos de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.

5.2.4.1 Cultivo de los hongos.

Las cepas de *S. sclerotiorum* y *T. viride* usadas fueron obtenidas del banco de germoplasma del laboratorio de Microbiología y reactivadas en placas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA).

5.2.4.2 Producción de micelio para análisis de ácidos grasos.

Los hongos fueron crecidos en matraces de 125 mL en una incubadora con agitación a 150 rpm y temperatura de 27 ± 1 °C, cada matraz contenía 50 mL de medio líquido Joham (Anexo II). El diseño experimental consistió en un factorial 2 X 3, dos niveles de hongos (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*), y tres del compuesto a evaluar: Testigo (solo medio líquido), KHCO_3 (10 mM) e iprodione (0.25 mM). Se tuvieron 6 tratamientos distribuidos completamente al azar, cada uno con tres repeticiones. En total 18 unidades experimentales y adicionalmente se colocaron dos matraces con únicamente medio de cultivo.

Se prepararon soluciones para inocular con micelio (*S. sclerotiorum*) y esporas (*T. viride*). A cultivos de *S. sclerotiorum* de cuatro días de crecimiento se le adicionaron 30 mL de agua

destilada estéril, se raspó el micelio y se concentró en un matraz. De la misma manera se realizó en cultivos de *T. viride* con cinco días de esporulados. Se aplicaron 2 mL de cada solución a los tratamientos correspondientes, y se dejaron en agitación por 6 días. En cada tratamiento el micelio fue filtrado (con una jeringa y papel filtro estériles), liofilizado y almacenado hasta la evaluación de los ácidos grasos.

5.2.4.3 Análisis de ácidos grasos

Extracción de grasa.

El micelio liofilizado se sometió a agitación durante 2 h a temperatura ambiente para extraer los lípidos presentes en las células fúngicas. Se empleó cloroformo (CHCl₃): metanol (MeOH) (1:2) como solvente de extracción. Posteriormente el extracto se centrifugó durante 15 min a 2500 rpm y el sobrenadante se concentró en rotavapor bajo vacío.

Esterificación de ácidos grasos.

Se prepararon los ésteres metílicos, mediante la técnica propuesta por Egan *et al.* (1981), utilizando BF₃ en metanol al 14%. Para lo cual a cada uno de los extractos se le adicionó 1 mL de BF₃-MeOH y 100 µL de C19:0 (Sigma-Fluka) como estándar interno, posteriormente se pusieron en baño maría (70-80 °C) con agitación, durante 30 min y finalmente se centrifugó durante tres min.

Se realizó la extracción de los ésteres metílicos utilizando 1.0 mL de hexano grado HPLC, el extracto hexánico, fue secado con NaSO₄ y filtrado, para su posterior inyección al cromatógrafo de gases.

Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).

Del extracto hexánico obtenido al finalizar la esterificación, se inyectaron 2 µL de cada una de las muestras. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies,

modelo 6890N (Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5%-fenilmetilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 150 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 210 °C usando una rampa de calentamiento de 30 °C/min. De 210 °C pasó a 213 °C a una velocidad de 1°C/min; finalmente de esta temperatura pasó a 225 °C a una velocidad de 20 °C /min, durante 28 min haciendo un total de 38.6 min por corrida para cada muestra. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fué 250 °C, inyección split, con una relación de split de 50:1. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un detector de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar (37 component FAME mix, Supelco) analizado bajo las mismas condiciones, el cual fue utilizado como estándar externo para la cuantificación de ácidos grasos.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.

El KHCO₃ permitió el crecimiento de *T. viride* en las concentraciones de 2 a 10 mM; sin embargo, a partir de 25 mM el crecimiento comenzó a retardarse en comparación con el Testigo (0 mM) y se observó la formación de anillos en el cultivo debido al retraso en la esporulación. En la

concentración más alta (40 mM) se retardó (aunque no completamente) la formación de esporas (Figura 5.1). La adición de KHCO_3 causó modificaciones en el patrón de crecimiento de *Trichoderma*, en las concentraciones de 25 a 40 mM el micelio fue más compacto y agrupado en el centro de la colonia.

En contraste, cuando *T. viride* se sembró con el fungicida, solo el tratamiento Testigo cubrió toda la caja de Petri, a partir de la concentración de 2 mM el crecimiento fue completamente inhibido. En las concentraciones de 4 a 10 mM se logró observar un ligero crecimiento del micelio, pero de forma arroquetada y aérea, y no se observó esporulación más que en el testigo (Figura 5.2).

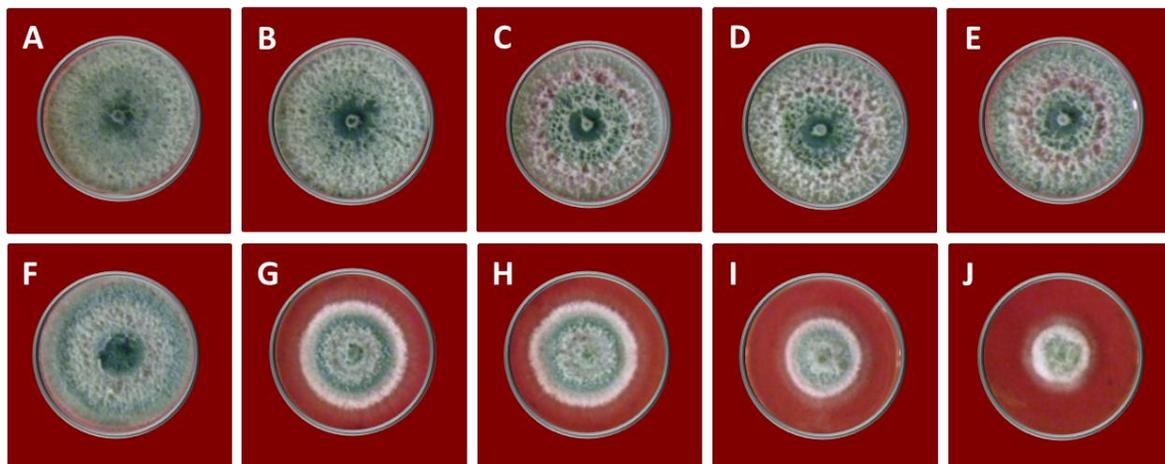


Figura 5.1. Crecimiento de *Trichoderma viride* en PDA ante concentraciones crecientes de bicarbonato de potasio (KHCO_3), durante seis días de evaluación. A-F) 0 a 10 mM donde el hongo cubrió por completo el medio de cultivo; G-J) 25-40 mM el crecimiento fue inhibido y disminuyó la esporulación.

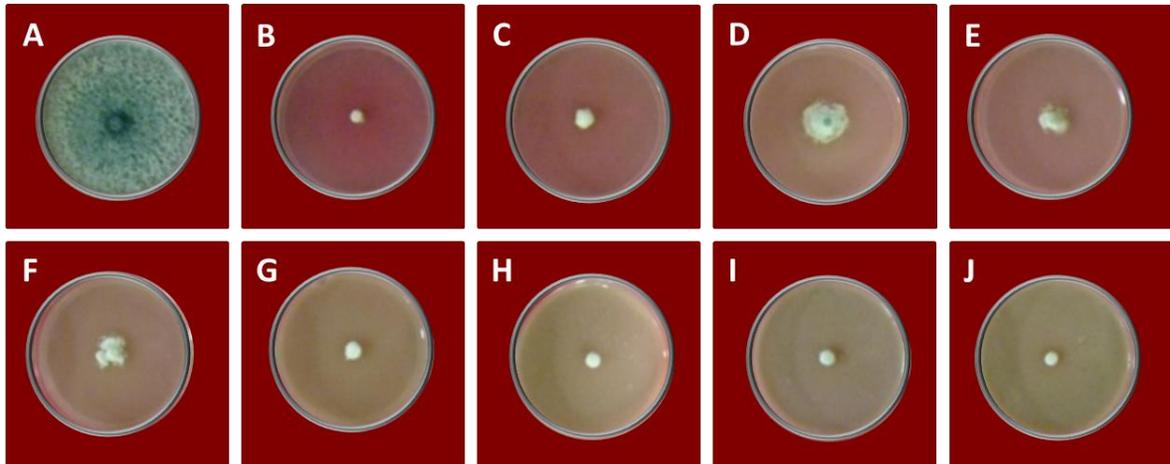


Figura 5.2. Efecto negativo del fungicida iprodione en el crecimiento de *Trichoderma viride* durante siete días de crecimiento. A) Testigo, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 6 mM, E) 8 mM, F) 10 mM, G) 25 mM, H) 30 mM, I) 35 mM y J) 40 mM.

En el caso de *S. sclerotiorum*, el KHCO_3 permitió el crecimiento fúngico en todas las concentraciones; sin embargo, con 35 y 40 mM no cubrió por completo la caja de Petri. Al igual que en *Trichoderma*, se observó la formación de anillos con micelio poco abundante en comparación con las concentraciones menores, en las cuales el micelio presentó consistencia algodonosa. Un efecto muy marcado fue la inhibición de la formación de esclerocios, mientras que en el Testigo se completó su estado final de maduración (negro y de consistencia dura). En las concentraciones de 2 a 10 mM los esclerocios solo llegaron a la etapa de diferenciación (conglomeración de micelio algodonoso), y ante 25 a 40 mM no hubo formación de ellos (Figura 5.3).

El fungicida tuvo efecto tóxico sobre el patógeno, al inhibir por completo su crecimiento en todas las concentraciones evaluadas; solo cubrió el medio de cultivo en el Testigo, y por consiguiente, los esclerocios formados estaban completamente maduros (Figura 5.4).

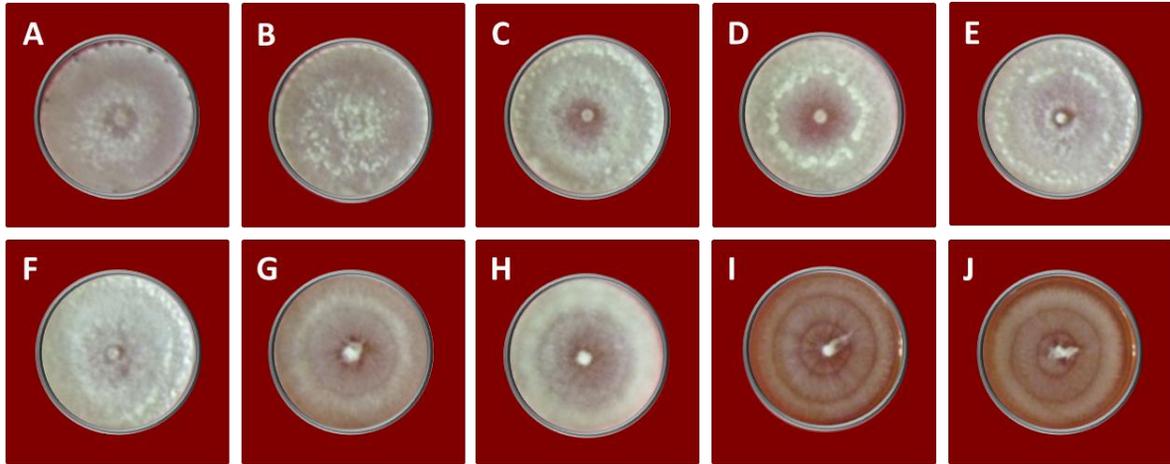


Figura 5.3. Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* ante concentraciones crecientes de bicarbonato de potasio (KHCO_3), durante seis días de crecimiento. A) Testigo, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 6 mM, E) 8 mM, F) 10 mM, G) 25 mM, H) 30 mM, I) 35 mM y J) 40 mM.

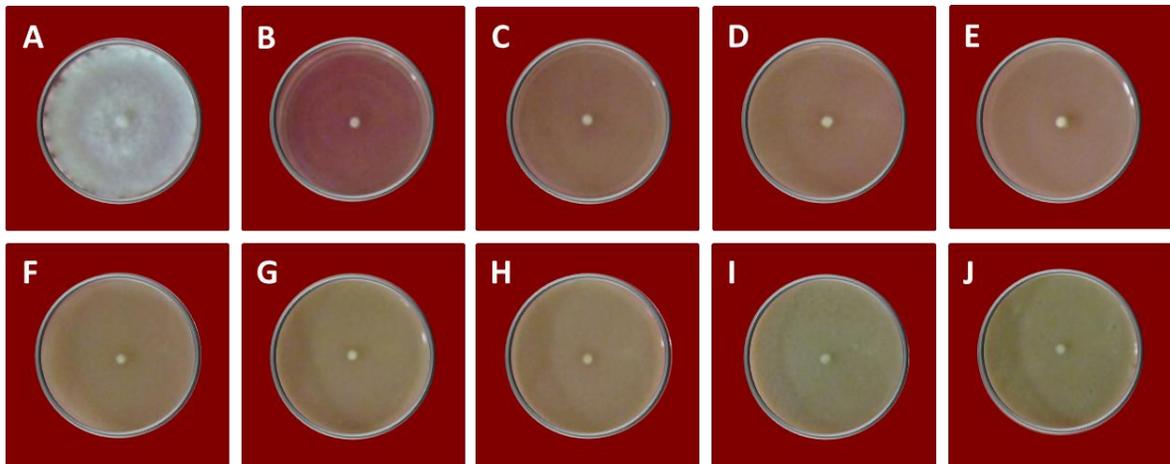


Figura 5.4. Efecto tóxico del fungicida iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en seis días de crecimiento. A) Testigo, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 6 mM, E) 8 mM, F) 10 mM, G) 25 mM, H) 30 mM, I) 35 mM y J) 40 mM.

5.3.2. Efecto de iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, y sobre la germinación de esclerocios.

Con base en los resultados del experimento anterior, se eligieron concentraciones menores a 2 mM de iprodione (0.25, 0.37, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mM) para evaluar nuevamente el crecimiento

de ambos hongos ante el fungicida. A pesar de utilizar concentraciones más bajas, el crecimiento de ambos hongos fue significativamente inhibido. *Trichoderma* únicamente creció en las concentraciones de 0.25 y 0.37 mM, en las que mostró formación de anillos o bien, crecimiento irregular. A partir de 0.5 mM el crecimiento y la esporulación del hongo fueron inhibidas; más aún, el poco crecimiento micelial obtenido se concentró sobre el disco de PDA que se sembró sobre el medio (Figura 5.5A). En el caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, el efecto del iprodione fue similar que en las concentraciones mayores a 2 mM, pues solo ante 0.25, 0.37 y 0.5 mM se observó crecimiento del patógeno. Sin embargo, en la primera concentración fue poco el micelio que creció sobre el medio, y al igual que *Trichoderma* en las concentraciones 0.37 y 0.5 mM, su crecimiento se concentró sobre el disco de PDA. En las tres siguientes concentraciones mayores no hubo crecimiento del hongo (Figura 5.5B).

El fungicida también tuvo efecto inhibitorio sobre la germinación de los esclerocios de *S. sclerotiorum*; a medida que aumentó la concentración de iprodione la germinación disminuyó. En el Testigo (0 mM), el micelio derivado de la germinación de los esclerocios alcanzó a cubrir toda la superficie del medio de cultivo y se formaron esclerocios secundarios. La formación de esclerocios secundarios tiene importancia ecológica, debido a que asegura la persistencia del inóculo en el suelo (Mónaco *et al.*, 1998). En contraste, en todas las demás concentraciones del fungicida, el micelio creció sobre el esclerocio, y sólo en la concentración de 0.25 mM se observó mayor crecimiento de micelio sobre el medio de cultivo, mientras que en la concentración más alta (1.5 mM), el micelio fue muy limitado (Figura 5.5C).

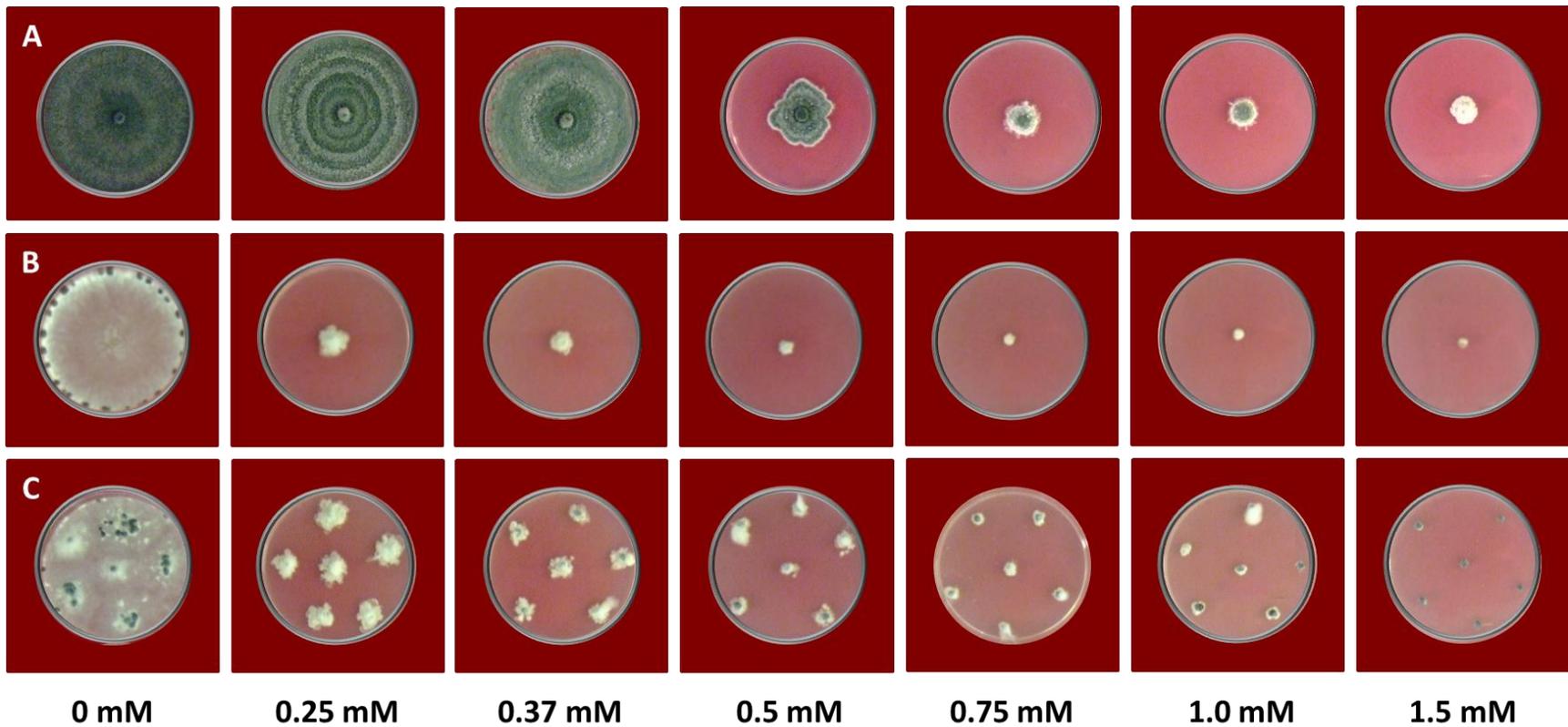


Figura 5.5. Efecto del fungicida iprodione aplicado en bajas concentraciones, en el crecimiento de *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*, y en la germinación de esclerocios de *Sclerotinia*, después de siete días. Serie A) Efecto en el crecimiento de *T. viride*. El tratamiento testigo (0 mM) completó su crecimiento y formó esclerocios a diferencia de los tratamientos con el fungicida (0.25 a 1.5 mM). Serie B) efecto en el crecimiento de *S. sclerotiorum*, mostrando crecimiento arrosetado (0.5 mM) y sobre el disco de PDA inoculado (1.5 mM). Serie C) Efecto inhibitorio de la germinación de esclerocios de *S. sclerotiorum*. Únicamente en el testigo (0 mM) se observó formación de esclerocios secundarios.

5.3.3 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, solos o en interacción

En el tratamiento testigo, *T. viride* alcanzó 100% de su crecimiento a las 120 h mientras que *S. sclerotiorum* a las 96 h (Figura 5.6). En el cultivo dual a las 72 h los hongos estuvieron en contacto, y para el séptimo día (última evaluación) *T. viride* creció sobre el micelio de *S. sclerotiorum*, cubriéndolo en 70% (Figura 5.7). El KHCO_3 (10 mM) tuvo menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial en comparación con el iprodione, aunque al principio retardó el crecimiento de ambos hongos. Al final de la evaluación, el antagonista alcanzó 80% del crecimiento total y el patógeno el 100% con respecto al testigo. La adición de bicarbonato al medio de cultivo en el que estaba sembrado *S. sclerotiorum* (solo o confrontado con el antagonista) inhibió la formación de los esclerocios.

En presencia de iprodione (0.25 mM) se observó 100% de inhibición del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* y 86.5% de *T. viride*, efecto que también se observó cuando ambos hongos estuvieron confrontados (Figura 5.7C). Cabe señalar que cuando el iprodione y el bicarbonato se aplicaron de manera combinada en el medio, se produjo estimulación del crecimiento en ambos hongos, incluso en el cultivo dual (confrontación). En todos los tratamientos, a excepción en los tratamientos donde sólo se aplicó iprodione, se observó el efecto antagónico de *T. viride* sobre *S. sclerotiorum* (Figura 5.7C).

Tanto el KHCO_3 como el fungicida iprodione, ejercieron un efecto inhibitorio sobre el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* y su antagonista *Trichoderma viride*; no obstante, el efecto del fungicida fue más fuerte, ocasionando cambios notorios en el crecimiento de la colonia fúngica.

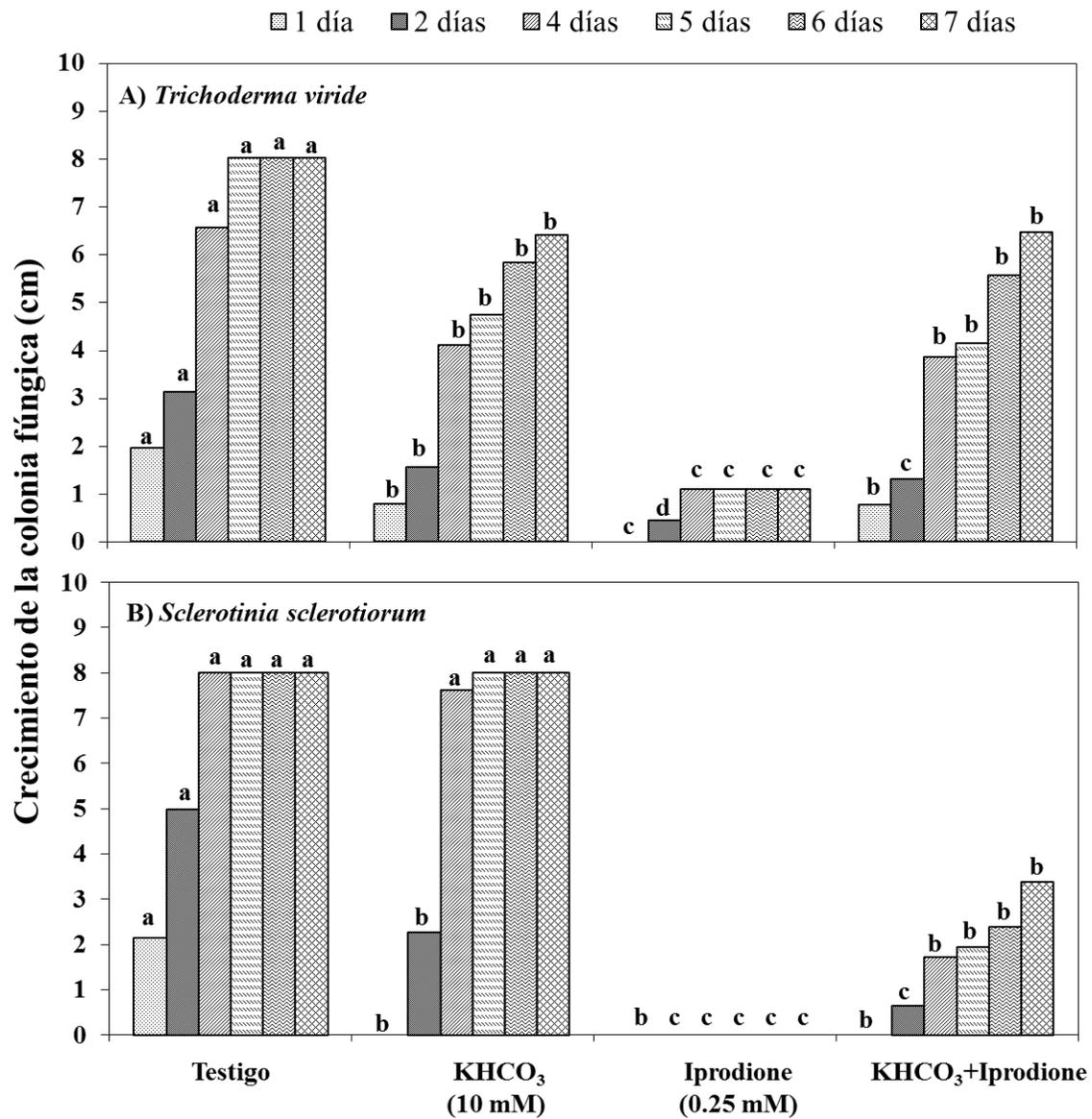


Figura 5.6. Crecimiento de la colonia de *Trichoderma viride* (A) y de *Sclerotinia sclerotiorum* (B) en presencia de bicarbonato de potasio (KHCO₃) y del fungicida iprodione durante siete días de evaluación. Letras idénticas sobre las barras indica que no hay diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$) y entre los días de exposición con KHCO₃ y el iprodione. n=4.

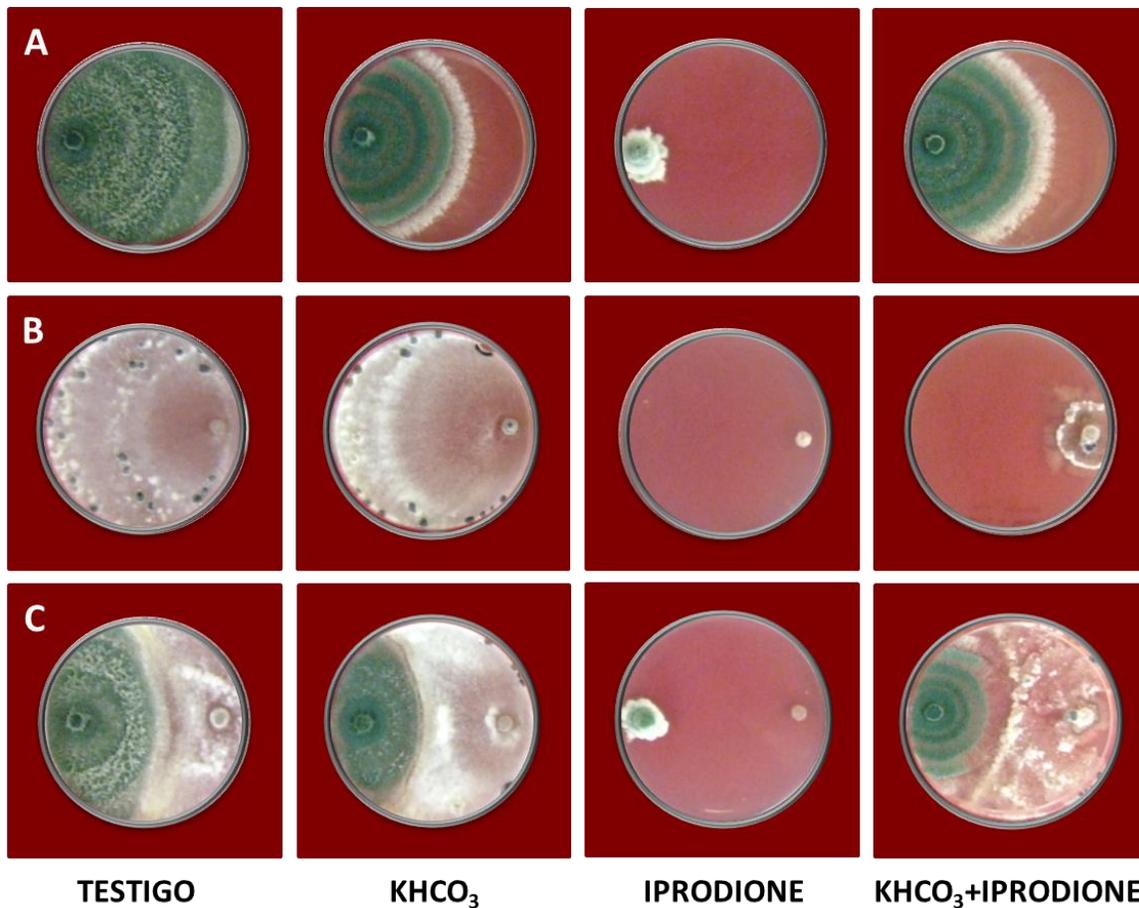


Figura 5.7. Efecto del bicarbonato de potasio (KHCO_3) y del fungicida iprodione en el crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*, durante siete días de evaluación. Serie A) Efecto en el crecimiento de *T. viride*; Serie B) Efecto en el crecimiento de *S. sclerotiorum*; Serie C) Confrontación *T. viride* y *S. sclerotiorum* en los diferentes tratamientos, donde se puede observar la zona de contacto entre ambos hongos, caracterizada por una barrera.

La inducción de la alcalinidad del medio de cultivo (pH 7.3) debido a la aplicación del bicarbonato, con respecto al testigo (pH 6.4), inhibió al principio el crecimiento de los hongos, pero al final de la evaluación esto no afectó la efectividad de *Trichoderma viride* para antagonizar a *Sclerotinia sclerotiorum*. Aunque las especies del género *Trichoderma* son más eficientes para inhibir hongos fitopatógenos en ambientes ácidos que en alcalinos, también son capaces de inducir acidificación a su alrededor y adaptar su metabolismo a las condiciones de

crecimiento circundantes, de esta manera adquieren ventajas sobre el fitopatógeno (Benítez *et al.*, 2004).

En el caso de *S. sclerotiorum* se comprueba el efecto inhibitorio del bicarbonato sobre su crecimiento y producción de esclerocios, pues el pH afecta múltiples procesos de *S. sclerotiorum* incluyendo la formación de esclerocios especialmente en valores de pH neutro o alcalino (Rollins y Dickman, 1998). Por ejemplo, *B. cinerea* requiere un ambiente ácido para crecer, gasta más energía en la producción de ácido que en la extensión de sus hifas, por lo tanto, el crecimiento se ve inhibido (Palmer *et al.*, 1997). Con respecto a la formación de esclerocios, cuando *S. sclerotiorum* se expuso en concentraciones de 8 y 10 mM de KHCO_3 , éstos retardaron su formación, pero en 25 y 50 mM no alcanzan a formarse (Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009).

Generalmente, el modo de acción por el cual los bicarbonatos afectan a los hongos se relaciona con la alteración de la permeabilidad de la membrana fúngica, e inhibición de las reacciones de fosforilación oxidativa (Olivier *et al.*, 1998).

En lo que respecta al iprodione, en todas las concentraciones evaluadas hubo efecto negativo hacia el crecimiento de ambos hongos; sin embargo, de acuerdo a las especificaciones del proveedor éste es incompatible con compuestos alcalinos, es por ello que al combinarlo con el KHCO_3 perdió su efectividad. Al respecto falta información que especifique el por qué de este comportamiento.

Este estudio preliminar muestra que tanto KHCO_3 como *T. viride* podrían ser utilizados como agentes de control de hongos fitopatógenos. Sin embargo, su eficacia debe ser previamente investigada considerando diferentes tipos de suelo, y bajo las condiciones de manejo agronómico.

5.3.4 Efecto de bicarbonato de potasio e iprodione sobre el contenido de ácidos grasos de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.

En el tratamiento testigo de *Sclerotinia sclerotiorum* se registró 14.8% de ácidos grasos saturados (AGS), 16.6% de monoinsaturados (AGM) y 68.6% de poliinsaturados (AGP). En los tratamientos con iprodione y KHCO_3 los valores de AGS aumentaron, para AGM disminuyeron, y en el caso de AGP se registraron variaciones con respecto al testigo (Cuadro 6.1). Para *Trichoderma viride* el grado de saturación incrementó (42.2%), en comparación con *S. sclerotiorum*, los tratamientos con fungicida y KHCO_3 disminuyeron el porcentaje de AGS y AGM en comparación con el testigo, pero los AGP aumentaron en ambos tratamientos.

Cuadro 6.1. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.

	Saturados (%)	Insaturados	
		Monoinsaturados	Poliinsaturados (%)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			
Testigo	14.8	16.6	68.6
Iprodione	19.5	9.1	71.5
KHCO_3	19.6	15	65.4
<i>Trichoderma viride</i>			
Testigo	42.2	19.8	38
Iprodione	38	17.8	44.2
KHCO_3	37	17.1	45.9

La membrana fúngica es responsable de muchas funciones celulares esenciales y su integridad es de suma importancia para la sobrevivencia del hongo (Deacon, 2006). Los ácidos grasos insaturados, componentes de las membranas biológicas, son esenciales para la determinación de su estructura y funciones, mantienen una correcta viscosidad del núcleo hidrófobo de la bicapa, y son responsables de la movilidad y función de las proteínas integrales para proporcionar

flexibilidad y permeabilidad selectiva de las membranas celulares. Además, sirven como precursores para una serie de moléculas biológicamente activas (Uttaro, 2006). Los ácidos grasos insaturados son los principales constituyentes de los lípidos en *T. harzianum* y *T. viride* (Serrano-Carreón *et al.*, 1992a).

La composición de los ácidos grasos de los lípidos totales de los hongos *S. sclerotiorum* y *T. viride* se resume en el Cuadro 6.2. Los datos muestran que los ácidos grasos de estos hongos abarcan cadenas de 12 a 20 carbonos, siendo C16:0 (palmítico), C18:0 (esteárico), C18:1 *cis* (oleico) y C18:2 (linoleico) los más abundantes. Otros ácidos que se identificaron, aunque en menor proporción fueron láurico, mirístico, miristoleico, pentadecílico, palmitoleico, margárico, eláidico, α -linolénico, araquídico, eicosanoico y eicosadienoico.

El ácido esteárico solo se registró en mayor cantidad en *T. viride*, pero fue el de menor contenido en comparación con C16:0, C18:1 *cis* y C18:2. Estos datos concuerdan con lo reportado por Serrano-Carreón *et al.* (1992a) quienes indican a los ácidos oleico, linoleico, palmítico y esteárico como componentes principales de los lípidos de *T. harzianum* y *T. viride*, asociados con esteárico, linolénico y palmitoleico en cantidades menores (Serrano-Carreón *et al.*, 1992b). En el caso de *S. sclerotiorum* en los esclerocios, sólo se ha reportado la presencia de ácidos grasos insaturados como oleico y linoleico, los cuales utiliza para su crecimiento (Saharan y Mehta, 2008).

Cuadro 6.2. Contenido de ácidos grasos en micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*.

	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1 <i>cis</i>	C18:1 <i>trans</i>	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C20:2
(nmol mg ⁻¹ de micelio liofilizado)															
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>															
Testigo	ND	ND	ND	ND	1.61	ND	ND	0.16	1.37	0.22	7.55	0.22	ND	0.23	0.19
Iprodione	0.05	0.04	ND	0.03	1.27	0.02	0.03	0.16	0.45	0.13	4.31	0.47	ND	0.14	0.12
KHCO ₃	ND	0.01	ND	0.01	0.78	0.01	0.01	0.08	0.41	0.08	2.60	0.09	ND	0.12	0.08
<i>Trichoderma viride</i>															
Testigo	0.03	0.46	0.01	0.13	27.18	1.25	0.11	8.95	14.88	0.25	30.68	0.51	0.18	ND	ND
Iprodione	0.02	0.26	0.01	0.08	16.03	0.68	0.06	4.35	8.30	0.13	22.26	0.40	0.10	ND	ND
KHCO ₃	0.03	0.14	0.01	0.07	9.35	0.36	0.05	2.58	4.88	0.07	14.07	0.25	0.06	ND	ND

Simbología: No determinado (ND), C12:0 (Ácido láurico), C14:0 (Ácido mirístico), C14:1 (Ácido miristoleico), C15:0 (Ácido pentadecílico), C16:0 (Ácido palmítico), C16:1 (Ácido palmitoleico), C17:0 (Ácido margárico), C18:0 (Ácido esteárico), C18:1 *cis* (Ácido oleico), C18:1 *trans* (Ácido eláidico), C18:2 (Ácido linoleico), C18:3 (Ácido α -linolénico), C20:0 (Ácido araquídico), C20:1 (Ácido eicosanoico), C20:2 (Ácido eicosadienoico)

La composición del medio de cultivo juega un papel importante en la acumulación de lípidos, al respecto Serrano-Carreón *et al.* (1992b) reportaron que la acumulación de lípidos en *T. viride* fue estimulada en cultivos que contenían xilosa o sacarosa.

Varios estudios de hongos filamentosos han sugerido un papel para ácidos grasos poliinsaturados en el desarrollo de hongos, especialmente con respecto a la formación de esporas. En *Aspergillus nidulans*, moléculas señal derivadas del ácido linoleico, llamadas factores psi, gobiernan el desarrollo de cleistotecios (órganos sexuales que contienen las esporas sexuales denominadas ascosporas) y conidióforos (órganos asexuales que producen las esporas asexuales llamadas conidios) (Calvo *et al.*, 2001).

El contenido de ácidos grasos se vio afectado por la adición del fungicida y la sal de bicarbonato al medio de cultivo, en ambos hongos, pues se observó disminución en la mayoría de los ácidos registrados, incluso en los más abundantes. El bicarbonato fue el que mayor efecto causó.

Los ácidos grasos son componentes importantes en las membranas celulares y son en parte responsables de su fluidez, organización e integridad, las variaciones en los contenidos de dichos ácidos que se observan por la adición del fungicida y la sal de bicarbonato, son indicadores de las modificaciones que está sufriendo la membrana de *S. sclerotiorum* y *T. viride*. Cuando el orden de la membrana fúngica es interrumpido otras funciones asociadas a esta, por ejemplo la conformación y actividad de proteínas de membrana y enzimas, son modificadas o perdidas. Pero en casos más extremos, puede sobrevenir la pérdida en la permeabilidad de la membrana (integridad) causando la liberación de los componentes y eventualmente la muerte celular (Avis, 2007).

Las sales inorgánicas han mostrado actividad antimicrobiana contra varios hongos fitopatógenos, a través de la pérdida de la integridad de la membrana de los microorganismos afectados (Avis *et al.*, 2007). Al igual que las sales inorgánicas, varios fungicidas fueron reportados que atacan las membranas fúngicas y causan la salida del contenido celular, los fungicidas que pertenecen a la clase de las dicarboximidias, como el iprodione, son considerados que afectan algunas funciones de membrana (Yoshida y Yurimoto, 1993). Estos fungicidas ejercen su efecto fúngico causando colapso o explosión de la hifa del hongo tratado y es sabido que tienen más efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial que sobre la germinación de esporas, además de desintegrar rápidamente la membrana interna de la mitocondria de los hongos tratados (Griffiths *et al.*, 2003). Avis (2007) reportó que la sensibilidad a cloruro de aluminio y metasulfito de sodio se ha relacionado con elevados niveles de peroxidación lipídica, por otro lado se observó la inhibición del crecimiento radial y de la síntesis de lípidos de *Botrytis cinerea* a partir de una concentración de 5 μM de iprodione (Griffiths *et al.*, 2003). Lee *et al.* (1998) también reportaron que la peroxidación de lípidos de membrana en *B. cinerea* se genera por el efecto fungitóxico de los fungicidas pertenecientes a las dicarboximidias.

La peroxidación de lípidos de membrana es un proceso complejo que involucra ácidos grasos insaturados, en particular poliinsaturados, que contienen uno o más grupos metileno situados entre dobles enlaces *cis*. Hongos que son más tolerantes a los efectos antimicrobianos de las sales pueden tener mayor actividad antioxidante que podrían reducir o anular el efecto de la peroxidación por interrumpir el ciclo de propagación (Avis *et al.*, 2007).

Muchos factores ambientales pueden afectar el contenido lipídico en organismos vivos incluyendo los hongos. De hecho, la composición de ácidos grasos del micelio varía notablemente dependiendo de las condiciones bajo las cuales crecen los microorganismos; factores nutricionales, composición del medio de crecimiento, disponibilidad de oxígeno,

temperatura, pH y edad del cultivo pueden afectar la distribución de los ácidos grasos (Suutari 1995; Moat *et al.*, 2002). Dentro del perfil de ácidos grasos de los hongos los ácidos palmítico, esteárico, palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico son los más predominantes (Suutari, 1995).

5.4 CONCLUSIONES

- El bicarbonato de potasio ejerce un efecto inhibitorio sobre *Sclerotinia sclerotiorum* y su antagonista *Trichoderma viride*, en concentraciones mayores a 10 mM; aunque el efecto del fungicida fue más fuerte en la mínima concentración (0.25 mM) evaluada.
- El uso de bicarbonato de potasio puede ser un tratamiento válido en el control de hongos patógenos del suelo; sin embargo, no debe ser aplicado en conjunto con el fungicida iprodione, ya que se inhibe su efecto. No obstante sí se puede aplicar en conjunto con *Trichoderma viride*.
- Este trabajo proporciona información sobre el contenido lipídico de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma viride*, destacando a los ácidos linoleico, palmítico y oleico como los que predominaron.
- El iprodione y el bicarbonato de potasio afectaron la composición de ácidos grasos de ambos hongos.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES GENERALES

- *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo que causa grandes pérdidas de los cultivos a nivel mundial, es por ello que se están buscando alternativas que permitan controlar al hongo pero sin causar daños al ambiente y al hombre. En el presente estudio mediante la interacción de agentes biológicos y químicos se pudo constatar que ambos agentes pueden ser empleados para el control del fitopatógeno, pues afecta el crecimiento y desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum*.
- *Trichoderma viride* al ser un hongo de rápido crecimiento, con respecto a los demás hongos evaluados, se considera candidato para realizar estudios sobre control del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Se observó la degradación de la médula de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* mediante microscopía electrónica de barrido, así también se pudo observar que *T. viride* no solo ataca el micelio sino también a las estructuras de resistencia (esclerocios) de *S. sclerotiorum*.
- El fungicida iprodione inhibe el crecimiento del patógeno, pero lo que se busca es reemplazar el uso de estos productos por otros que no generen daños, por lo que el KHCO_3 puede ser aplicado en lugar de los fungicidas, ya que su efecto es claro sobre el crecimiento y composición de los ácidos grasos.
- La combinación KHCO_3 -*Trichoderma viride* tiene potencial para ser aplicado para el control de *S. sclerotiorum*, sin embargo aún hacen falta estudios realizados en ambientes naturales.

LITERATURA CITADA

- Abawi, G.S. and Grogan R. 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 899-903.
- Abdullah M.T., N.Y. Ali and P. Suleman. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 27: 354-1359.
- Aharoni Y., E. Fallik, A. Copel, M. Gil, S. Grinberg and J.D. Klein. 1997. Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons. *Postharvest Biology and Technology* 10: 201-206.
- Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, México.
- Agrios, G.N. 1970. Plant pathology. Academic Press. United States of America.
- Arias L.A., L.A. Tautiva, W. Piedrahíta y B. Chaves. 2007. Evaluación de tres métodos de control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía Colombiana* 25: 131-141.
- Arseniuk E. and J. Macewicz. 1994. Scanning electron microscopy of sclerotia of *Sclerotinia trifoliorum* and related species. *Journal of Phytopathology* 141: 275-284.
- Arslan U., K. Ilhan and O.A. Karabulut. 2006. Evaluation of food additives and low-toxicity compounds for the control of bean rust and wheat leaf rust. *Journal of Phytopathology* 154: 534-541.
- Avis T.J. 2007. Antifungal compounds that target fungal membranes: applications in plant disease control. *Canadian Journal Plant of Pathology*. 29: 323-329.
- Avis T.J., M. Michaud and R.J. Tweddell. 2007. Role of lipid composition and lipid peroxidation in the sensitivity of fungal plant pathogens to aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2820-2824.
- Bae Y.S. and G.R. Knudsen. 2007. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Applied Soil Ecology* 35: 21-24.
- Bailey B.A. and R.D. Lumsden. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman, G.E. and C.P. Kubicek (eds.). *Trichoderma and Gliocladium, enzymes: biological control and commercial applications*. Vol. 2. Taylor and Francis. London. pp. 185-203.
- Baker K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25: 67-85.
- Bardin S.D. and H.C. Huang. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 88-98.
- Barrios-González J., C. Martínez, A. Aguilera and M. Raimbault. 1989. Germination on concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 11: 551- 554.

- Benítez T., A.M. Rincón, M.C. Limón and A.C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Boland G.J. and R. Hall. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 93-108.
- Bolton M.D., B.P.H.J. Thomma and B.D. Nelson. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7: 1-16.
- Bombelli E.C. y E.R. Wright. 2006. Efecto del bicarbonato de potasio sobre la calidad del tomate y acción sobre *Botrytis cinerea* en poscosecha. *Ciencia e Investigación Agraria* 33: 197-203.
- Boosalis M.G. 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology* 2: 263-276.
- Brennan P.J., P.F.S. Griffin, D.M. Lösel and D. Tyrrell. 1975. The lipids of fungi. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* 14: 49-89.
- Brimmer T.A. and G.J. Boland. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 100: 3-16.
- Buchenauer H. and F. Walker. 2007. Fungicides acting on amino acids and protein synthesis. In: Krämer W. and U. Schirmer (eds.). *Modern Crop Protection Compounds*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 539-560.
- Calvo A.M., H.W. Gardner and N.P. Keller. 2001. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 25766-25774.
- Chet I. and Y. Henis. 1967. Chemical composition on hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* sacc. *Canadian Journal of Microbiology* 13: 137-141.
- Clarkson J. and J. Whipps. 2002. Control of sclerotial pathogens in horticulture. *Pesticide Outlook* 13: 97-101.
- Corlay L. 1997. Cinética microbiana del proceso de producción de vermicomposta. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.
- Coley-Smith J.R. and R.C. Cooke. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9: 65-92.
- Colotelo N. 1974. A scanning electron microscope study of developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 52: 1127-1130.
- Cooke R. C. 1970. Physiological aspects of sclerotium growth in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions of the British Mycological Society* 54: 361-365.
- Corrêa S., M. Mello, Z.R. Ávila, L.M. Braúna, R.R. Pádua y D. Gomes. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotinia rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11: 3-9.
- Cundom M.A., S.M. Mazza de Gaiad, M.A. Mazzati de Castañon, S.A. Gutiérrez de Arriola y M. Coutinho. 2002. Actividad antagónica *in vitro* de hongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. En: <http://www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-037.pdf>; consultado: abril de 2013.

- Deacon J.W. 2006. Fungal biology. 4th ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Deliopoulos T., P.S. Kettlewell and M.C. Hare. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection* 29: 1059-1075.
- Diez M.C. 2010. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10: 244-267.
- Dos Santos A.F. and O.D. Dhingra. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 60: 472-475.
- Egan H., R. Kirk and R. Sawyer. 1981. Pearson's Chemical Analysis of Food. Churchill Livingstone 8a Ed. Edinburgh London Melbourne N.Y.
- Elad Y, R.R. Bélanger and J. Kohl. 1999. Biological control of diseases in the phyllosphere. In: R. Albajes *et al.* (eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Erental, A.; M. B. Dickman and O. Yarden. 2008. Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a "Dormant" structure. *Fungal Biology Review* 22: 6-16.
- Erper I., M. Turkan, G.H. Karaca and G. Kılıc. 2011. Evaluation of *in vitro* antifungal activity of potassium bicarbonate on *Rhizoctonia solani* AG 4 HG-I, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Trichoderma* sp. *African Journal of Biotechnology* 10: 8605-8612.
- Eslaminejad T., M. Ansaria and T. Elaminejad. 2012. Evaluation of the potential of *Trichoderma viride* in the control of fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. *Microbial Pathogenesis* 52: 201-205.
- Ezziyyani M., C. Pérez Sánchez, A.S. Ahmed, M.E. Requena y M.E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Fallik E., O. Ziv, S. Grinberg, S. Alkalai and J.D. Klein. 1997. Bicarbonate solutions control powdery mildew (*Leveillula taurica*) on sweet red pepper and reduce the development of postharvest fruit rotting. *Phytoparasitica* 25: 41-43.
- Fernando W.G.D., S. Nakkeeran and Y. Zhang. 2004. Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Recent Research in Developmental and Environmental Biology* 1: 329-347.
- Ferrera-Cerrato R. 1977. Estudio del hiperparasitismo de algunos basidiomicetos *in vitro*. Tesis doctoral. ENCB-IPN, México.
- Fraga M.E., D.M.N. Santana, M.J. Gatti, G.M. Direito, L.R. Cavaglieri and C.A.R. Rosa. 2008. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103:540-544.

- Frostegård Å., A. Tunlid and E. Bååth. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* 14: 156-163.
- García P.C., R.M. Rivero, J.M. Ruiz and L. Romero. 2003. The Role of fungicides in the physiology of higher plants: implications for defense responses. *The Botanical Review* 69: 162-172.
- Garg H., H. Li, K. Sivasithamparam, J. Kuo and M.J. Barbetti. 2010. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and susceptible genotype of *Brassica napus*. *Annals of Botany* 106: 897-908.
- Gisi U. and H. Sierotzki. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* 122: 157-167.
- Griffiths R.G., J. Dancer, E. O'Neill and J.L. Harwood. 2003. Lipid Composition of *Botrytis cinerea* and Inhibition of its radiolabelling by the Fungicide Iprodione. *New Phytologist* 160: 99-207.
- Hankin, L., M. Zucker and D.C. Sands. 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied Microbiology* 22: 205-209.
- Harman G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology* 2: 43-56.
- Hegedus D.D. and S.R. Rimmer. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or no to be” a pathogen?. *FEMS Microbiology Letters* 251: 177-184.
- Henis Y., P.B. Adams, J.A. Lewis and G.C. Papavizas. 1983. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 73: 1043-1046.
- Heydari A. and M. Pessarakli. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10: 273-290.
- Hjeljord L. and A. Tronsmo. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman G.E. and C.P. Kubicek (eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. pp. 131–151
- Howell C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Hoyos-Carvajal L., G. Duque y S. Orduz P. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2:76-86.
- Ibarra-Medina V. A. 2008. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Ibarra-Medina V.A., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, M.E. Lara-Hernández and J.M. Váldez-Carrasco. 2010. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revista Mexicana de Micología* 31: 53-63.

- Jensen D.F. and R.D. Lumsden. 1999. Biological control of soilborne pathogens. In: R. Albajes *et al.* (eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, Kluwer Academic Publishers. Netherlands pp. 319-337.
- Jones D. 1970. Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions British Mycological Society* 54: 351-360.
- Karabulut O.A., J.L. Smilanick, F.M. Gabler, M. Mansour and S. Droby. 2003. Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol and sodium bicarbonate to control postharvest disease of grape in central California. *Plant Disease* 87: 1384-1389.
- Kim T.G. and G.R. Knudsen. 2011. Comparison of real-time PCR and microscopy to evaluate sclerotial colonization by a biocontrol fungus. *Fungal Biology* 115: 317-325.
- Lara H.M.E. y R. Ferrera-Cerrato. 2007a. Mecanismos microbianos en el control biológico. In: Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón (eds.). *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Trillas, México.
- Lara H.M.E. y R. Ferrera-Cerrato. 2007b. Micoparasitismo. In: Fuentes-Dávila Guillermo y R. Ferrera-Cerrato (eds.). *Ecología de la raíz*. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. México.
- Larsen J., P.A. Olsson and I. Jacobsen. 1998. The use of fatty acid signatures to study mycelial interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the saprotrophic fungus *Fusarium culmorum* in root-free soil. *Mycological Research* 102: 1491-1496.
- Le Tourneau D. 1979. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* 69: 887-890.
- Lee H.J.; G.J. Choi and K.Y. Cho. 1998. Correlation of Lipid Peroxidation in *Botrytis cinerea* Caused by Dicarboximide Fungicides with Their Fungicidal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 737-741.
- Liu X.; Y. Yin, L. Yan, T.J. Michailides and Z. Ma. 2009. Sensitivity to iprodione and boscalid of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected from rapeseed in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 106-112.
- Lopera M.M., G.A. Peñuela, M.C. Domínguez y G.M. Mejía. 2005. Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Revista Facultad de Ingeniería* 33: 58-69.
- Lu G. 2003. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. *African Journal of Biotechnology* 2: 509-516.
- Ma Z. and T.J. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.

- Markovich N.A. and G.L. Kononova. 2002. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39: 341–351.
- Moat A.G., J.W. Foster and M.P. Spector. 2002. Microbial Physiology. In: Cap. 13. Lipids and sterols. Wiley-Liss, Inc. United States of America. pp. 450-474.
- Mónaco C.I., M.C. Rollán y A.I. Nico. 1998. Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 81-84.
- Moore-Landecker E. 1996. Fundamentals of the fungi. Prentice Hall. United States of America.
- Morales J., J.A. Mansoa, A. Cid and J.C. Mejuto. 2013. Stability study of Iprodione in alkaline media in the presence of humic acids. *Chemosphere* 92: 1536-1541.
- Muiño B.G., J. Almádoz y E. Martín. 2010. Efecto *in vitro* del fungicida iprodione sobre *Alternaria* spp. y prospección para su inclusión en estrategias de manejo en papa, tomate, ajo y cebolla. *Fitosanidad* 14: 171-176.
- Nombela-Cano C. and J.F. Peberdy. 1971. The lipid composition of *Fusarium culmorum* mycelium. *Transactions British Mycological Society* 57: 342-344.
- Olivier C., E.D. Halseth, E.S.G. Mizubuti and R. Loria. 1998. Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. *Plant Disease* 82: 213-217.
- Ordóñez-Valencia C., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, L.V. Hernández-Cuevas. 2009. *In vitro* antifungal effects of potassium bicarbonate to *Trichoderma* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycoscience* 50: 380-387
- Orth A.B., A. Sfarra, E.J. Pell and M. Tien. 1992. An investigation into the role of lipid peroxidation in the mode of action of aromatic hydrocarbon and dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 44: 91-100.
- Ordentlich A., A. Nachmias and I. Che. 1990. Integrated control of *Verticillium dahliae* in potato by *Trichoderma harzianum* and captan. *Crop Prot* 9, 363-366.
- Palmer C.L., R.K. Horst and R.W. Langhans. 1997. Use of bicarbonates to inhibit *in vitro* colony growth of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 1432-1438.
- Palou L., J.L. Smilanick, J. Usall and I. Viñas. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium bicarbonate. *Plant Disease* 85: 371-376.
- Petit A.N., F. Fontaine, P. Vatsa, C. Clément and N. Vaillant-Gaveau. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynthesis Research* DOI 10.1007/s11120-012-97198
- Pommer E.-H. and G. Lorenz. 1982. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides-A literature review. *Crop Protection* 1: 221-230.
- Riddell R.W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42: 265-270.

- Rollins J.A. and M.B. Dickman. 1998. Increase in endogenous and exogenous cyclic AMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2539–2544.
- Saharan G.S and Mehta, N. 2008. *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. Springer, India.
- Sarrocco S., L. Mikkelsen, M. Vergara, D.F. Jensen, M. Lübeck and G. Vannacci. 2006. Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *Mycological Research* 110: 179 – 187.
- SAS Institute Inc. 2002. The SAS system for windows ver. 9.0. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. United States of America.
- Serrano-Carreón L., Y. Hathout, M. Bensoussan and J.M. Belin. 1992a. Quantitative separation of *Trichoderma* lipid classes on bonded phase column. *Journal of Chromatography* 584: 129-133.
- Serrano-Carreón L., Y. Hathout, M. Bensoussan and J.M. Belin. 1992b. Lipid accumulation in *Trichoderma* species. *FEMS Microbiology Letters* 93: 181–188.
- Serrano L. y E. Galindo. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia Enero-Marzo*: 77-88.
- Siegel M. R. 1981. Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease* 65: 986-9.
- Sierra G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on the influence on the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 23: 15-22.
- Smilanick J.L., D.A. Margosan, F. Mlikota, J. Usall and I. F. Michael. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83: 139-145.
- Stahl P.D. and M.J. Klug. 1996. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4136-4146.
- Society of American Bacteriologist. 1951. *Manual of methods for pure culture study of bacteria*. McGraw-Hill, New York.
- Subbarao K.V. 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. *Plant Disease* 82: 1069-1078.
- Subramaniam R., S. Dufreche, M. Zappi and R. Bajpai. 2010. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37:1271–1287.
- Suutari M. 1995. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology* 164: 212–216.

- Tortora G.J., B.R. Funke y C.L. Case. 2007. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Townsend B.B. and H.J. Willetts. 1954. The development of sclerotia of certain fungi. *Transaction British Mycological Society* 37: 213-221.
- Treichel H., D. de Oliveira, M.A. Mazutti, M. Di Luccio and J.V. Oliveira. 2010. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology* 3: 182–196.
- Tu J.C. 1997. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38: 73-76.
- Uttaro A. D. 2006. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes. *IUBMB Life* 58: 563-571.
- Verma M., S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli and J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, - *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.
- Viterbo A., J. Inbar, Y. Hadar and I. Chet. 2007. Plant Disease Biocontrol and Induced Resistance via Fungal Mycoparasites. In: Kubicek C.P. and I. S. Druzhinina (eds.). *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Springer. Heidelberg, Germany. pp. 127-146.
- Willetts H.J. and A.L. Wong. 1971. Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *Transaction British Mycological Society* 57: 515-524.
- Willetts H.J. and A.L. Wong. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. Trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review* 46: 101-165.
- Willetts H.J. and S. Bullock. 1992. Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research* 96: 801-816.
- Witkowska D. and A. Maj. 2002. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica* 47: 279–82.
- Yang C., C. Hamel, V. Vujanovic and Y. Gan. 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *International Scholarly Research Networ.* DOI:10.5402/2011/130289
- Yoshida M. and M. Yukimoto. 1993. Effects of Fungicides on Channels in the Fungal Membrane. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 47: 171-177.
- Zago, E. L.; C. Zago y A. C. Ferreira. 2001. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural* 31:885-887.
- Zavaleta-Mejía E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra* 17: 201-207.
- Ziv O. and T.A. Zitter. 1992. Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. *Plant Disease* 76: 513-517.

ANEXO I

Actividad enzimática

a) Proteolítica

Para detectar la actividad proteolítica se usó el medio de agar nutritivo adicionado con 0.4% de gelatina a pH 6. Una solución acuosa de gelatina al 8% se esterilizó separadamente y se agregaron 5 mL de esta solución por 100 mL de medio base, se distribuyó el medio en cajas de Petri y se inocularon con los hongos a probar y se incubaron por 4 a 6 días. La actividad proteolítica se reveló adicionando una solución saturada de sulfato de amonio o una solución de dicloruro de mercurio al 0.1%, se consideraron positivas aquellas colonias que presentaron halos claros.

b) Lipolítica

Para detectar la actividad lipolítica se empleó la metodología usada por Sierra (1957) que consiste en usar un medio base con los siguientes componentes por litro: Peptona (10 g), NaCl (5 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), Agar (20 g), pH 6; el sustrato empleado para detectar la actividad lipolítica fue Tween 20 (Monolaurato de sorbitan). Medio y sustrato fueron esterilizados separadamente en autoclave a 121 °C durante 18 min. A 100 mL de medio base a 48 °C se añadió y homogeneizó 1 mL de Tween y se distribuyeron volúmenes de 20 mL en cajas de Petri; la inoculación se hizo con porciones de agar de 2 mm de diámetro, conteniendo crecimiento activo de los hongos a probar, se incubaron durante 10 días y se consideraron positivas aquellas colonias que presentaron un halo de cristales precipitados.

c) Amilolítica

Para demostrar la producción de amilasa se usó agar nutritivo adicionado de 0.2% de almidón soluble, pH 6; se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 18 min y se distribuyeron 20 mL por cada caja de Petri, las cuales una vez solidificadas se inocularon en la parte central con una porción de agar conteniendo crecimiento activo de los hongos por probar y se incubaron a 28 °C de 3 a 5 días. Para poner de manifiesto la actividad amilolítica se adicionó a las cajas una solución de yodo (lugol), la aparición de un halo alrededor de las colonias se consideró como prueba positiva.

d) Pectinolítica. El medio empleado fue el de Hankin *et al.* (1971) que se preparó en dos partes:

Parte A. Extracto de levadura (2 g), pectina de naranja o manzana (10 g), Agar (30 g) y agua destilada (1000 mL).

Parte B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2g), KH_2PO_4 (4 g), Na_2HPO_4 (6 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg), CaCl_2 (1 mg), H_3BO_3 (10 μg), MnSO_4 (70 μg), CuSO_4 (50 μg), MoO_3 (10 μg), agua destilada (1000 mL), pH 7 o 5.

Se mezclaron volúmenes iguales de ambas partes, y se esterilizó a 121 °C durante 18 min y distribuyéndose en cajas de Petri; la inoculación se hizo con porciones de agar conteniendo crecimiento activo del hongo a probar, se incubaron a 28 °C durante 5 días. La actividad pectinolítica se reveló usando una solución al 1% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, la reacción se consideró positiva por la presencia de un halo claro alrededor de la colonia. En este medio se detectaron dos tipos de actividad pectinolítica: a pH 7 se detectó la actividad pectato liasa (pectato transeliminasa E.C.4.2.2.2) y a pH 5 la actividad poligalacturonasa (Pectin despolimerasa pectinasa E.C. 3.2.1.15).

e) Celulolítica. La actividad celulolítica se evaluó con el medio de cultivo cuya composición es: solución salina estándar de Winogradski (5 mL), NH_4NO_3 (1.0 g), extracto de suelo (20 mL), solución de micronutrientes (1 mL), agua destilada (1 L) y carboximetilcelulosa (10 g). Todos los componentes del medio de cultivo se disolvieron en 500 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6.5, por separado se preparó una suspensión con carboximetilcelulosa, con ayuda de una licuadora. Ambas soluciones se mezclaron antes de esterilizarse en autoclave (121 °C, 18 min). El medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 18 min, y fue distribuido en cajas de Petri, las cuales fueron inoculadas en la parte central con los hongos a probar e incubadas durante 10 días. La zona de hidrólisis de celulosa se puso de manifiesto al inundar las cajas con solución Rojo Congo (1%) durante 15 min, y posterior inundación con solución 1 M de NaCl durante 15 min, una vez decantada la solución de Rojo Congo.

ANEXO II

MEDIO LÍQUIDO DE JOHAM (Chet y Henis, 1967)

Glucosa	40 g
NH ₄ NO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0.69 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2 g
KCl	0.14 g
FeSO ₄	0.002 g
ZnCl ₂	0.002 g
MnCl ₂	0.002 g
Cloruro de tiamina	0.0001 g

Todo se disuelve en 1000 mL de agua destilada.