



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

CAMPUS MONTECILLO  
POSGRADO DE EDAFOLOGIA

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma*  
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Sclerotinia*  
*sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger**

VERÓNICA AZUCENA IBARRA MEDINA

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: **AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma***  
**PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y**  
***Sclerotinia minor* Jagger**, Realizada por la alumna: Verónica Azucena Ibarra Medina, Bajo la  
dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como  
requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

Consejero



---

Dr. Ronald Ferrera Cerrato

Asesor (a)



---

M.C. Maria Encarnación Lara Hernández

Asesor (a)



---

Dra. Dora Frejo Aguilar

Asesor (a)



---

Dr. Alejandro Alarcón

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2008

## AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger.

Verónica Azucena Ibarra Medina

Colegio de Postgraduados, 2008.

Los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* afectan raíces, tallos y tubérculos de más de 400 especies de plantas, reduciendo los rendimientos del cultivo hasta en 50%. Con el propósito de obtener microorganismos dirigidos al control de los patógenos mencionados, se realizaron aislamientos del género *Trichoderma*, a partir de muestras de suelo con diferente uso agropecuario y forestal, de los cuales se obtuvieron 71 aislamientos por la técnica de cebo. Mediante la técnica de cultivos duales se evaluó la colonización y el micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma* sobre el micelio de ambos patógenos, además del daño hacia los esclerocios. El porcentaje de colonización sobre el micelio de *S. sclerotiorum* y *S. minor*, fue mayor en los aislamientos IBA-3, IBA-4, IBA-38 e IBA-54. Las cepas de *Trichoderma* IBA-3, IBA-4, IBA- 23, IBA-38, IBA-46, IBA-54, e IBA-56 parasitaron agresivamente los esclerocios. Para la prueba de producción de inóculo, la mayor esporulación correspondió a las cepas IBA-4 ( $4.0 \times 10^{14}$  UFC g<sup>-1</sup>), IBA-56 ( $2.0 \times 10^{13}$  UFC g<sup>-1</sup>) y la cepa IBA-38 ( $2.5 \times 10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup>). Sin embargo, en los ensayos realizados en cultivo de lechuga en condiciones controladas, los aislados de *Trichoderma* no mostraron la misma capacidad de controlar a las especies de *Sclerotinia*. Lo anterior sugiere la existencia de factores ambientales que determinan la efectividad de las cepas de *Trichoderma* para controlar o atenuar los daños de los patógenos en las plantas.

**Palabras clave:** micoparasitismo, *Sclerotinia*, degradación de esclerocios, inoculantes.

ISOLATION AND SCREENING OF *Trichoderma* STRAINS TOWARDS THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary AND *Sclerotinia minor* Jagger.

Verónica Azucena Ibarra Medina

Colegio de Postgraduados, 2008.

The pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* affect roots, stems and tubers of more than 400 plant species, and may reduce crop yields in 50%. To obtain antagonist microorganisms for both pathogens, the isolation of 71 *Trichoderma* fungal strains from several soil samples with different agricultural and forestry management was performed via trap cultures. In addition, the colonization and the mycoparasitic ability of the *Trichoderma* strains on mycelium and sclerotia of both pathogens were evaluated by dual culture confrontations. The colonization percentage of *Trichoderma* on the mycelium of *S. sclerotiorum* and *S. minor* was greater for the isolates IBA-3, IBA-4, IBA-38 and IBA-54. The *Trichoderma* isolates IBA-3, IBA-4, IBA-23, IBA-38, IBA-46, IBA-54, and IBA-156 were aggressive to parasite sclerotia. For the inoculum production, the higher sporulation was obtained for the strains IBA-4 ( $4.0 \times 10^{14}$  CFU g<sup>-1</sup>), IBA-56 ( $2.0 \times 10^{13}$  CFU g<sup>-1</sup>) and IBA-38, ( $2.5 \times 10^{12}$  CFU g<sup>-1</sup>). Nevertheless, the *Trichoderma* isolates did not control the infectivity and severity of both *Sclerotinia* species on lettuce plants under environmental controlled conditions. This suggests that environmental conditions influence on the effectiveness of the *Trichoderma* strains to control or to attenuate the pathogen damages on plants.

**Key words:** mycoparasitism, *Sclerotinia*, sclerotia degradation, inoculants.

## DEDICATORIA

### **A mis padres Ana Rosa Medina Ramírez y Javier Ibarra Ortiz**

*Por su cariño, comprensión y apoyo, sin condiciones ni medida. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación y la honestidad y muchas cosas más que no terminaría de mencionar. En todo momento los llevo con migo.*

### **A mis hermanos Alberto, Jacobo y Francisco**

*Por sus comentarios, sugerencias y opiniones. Además de ser buenos amigos, son la mejor compañía para compartir la vida.*

### **A mi amor Javier Piloni Martini**

*Por tu apoyo, comprensión y amor que me permite sentir poder lograr lo que me proponga. Gracias por escucharme y por tus consejos. Gracias por ser parte de mi vida; eres lo mejor que me ha pasado.*

### **A mis cuñadas y sobrinos**

*Melina, Nadia y Roció, Jonathan, Roberto y Héctor. Por tener una participación en mi vida y ser luz en nuestra familia.*

### **A mis Tíos Susana Sánchez y Rubén Ibarra**

*Por su disposición y ayuda brindada. Y por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante. Yo se que sus oraciones fueron escuchadas.*

### **Gracias a todos mis amigos**

*Fernando, Lilia, Vero, Lidia, Nicolasa, Chuy, Ernesto, Jasiel, Gustavo, Dulce, Simon, y a todos aquellos que no menciono pero que estuvieron conmigo y compartimos tantas aventuras, experiencias, desveladas y triunfos. Gracias a cada uno por hacer que mi estancia en el CP fuera súper divertida.*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible obtener el grado de Maestra en Ciencias. Número de becario: 202387.

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda a CONACyT por el financiamiento en el proyecto SEP-CONACYT 58594 Hongos micorrízicos arbusculares en el metabolismo secundario de plantas hortícolas inoculadas con microorganismos antagonistas a hongos fitopatógenos.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Gracias a Dios**

Por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida logrando otra meta más en mi carrera. Así como, llenar mi vida de dicha y bendiciones.

### **A mi Consejero Dr. Ronald Ferrera Cerrato**

Gracias por permitirme ser parte del grupo de trabajo. Por sus consejos, paciencia y opiniones sirvieron para que me sienta satisfecha en mi participación dentro del proyecto de investigación.

### **Dr. Alejandro Alarcón**

Por ayudarme a lo largo de la tesis y brindarme su amistad e inspirar en mi mucha admiración.

### **Dra. Dora Trejo Aguilar y M. C. Ma. Encarnación Lara Hernández**

Por asesorarme a lo largo de la tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente proyecto, y por compartir su conocimiento conmigo.

### **A cada uno de los maestros**

Que participaron en mi desarrollo profesional durante el postgrado, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

### **A mis amigos y compañeros del área de Microbiología de Suelos**

Rosario, Alicia, Gaby, Manuel, Lorenzo, Fernando, Mundo y Susana, por hacer que cada pedacito de tiempo fuera ameno. No voy a olvidar sus consejos, enseñanzas y ayuda durante el lapso de mi tesis.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Producción de lechuga en México.....	4
2.2. Cultivo de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	5
2.2.1. Origen.....	5
2.2.2. Ciclo fisiológico del cultivo.....	5
2.2.3. Tipos de Lechuga.....	7
2.2.4. Valor nutricional.....	7
2.2.5. Requerimientos ambientales.....	9
2.3. Epidemiología de la pudrición de lechuga causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	12
2.4. Importancia de los esclerocios como estructuras de supervivencia.....	13
2.5. Control biológico.....	14
2.6. Microorganismos antagonistas en el control biológico.....	15
2.7. Generalidades del género <i>Trichoderma</i> .....	16
2.7.1. Factores que inciden en el crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	17
2.8. Mecanismos de acción.....	18
2.8.1. Competencia.....	18
2.8.2. Antibiosis.....	19
2.8.3. Parasitismo.....	19
2.9. Micoparasitismo.....	20
2.9.1. Micoparasitismo biotrófico.....	21
2.9.2. Micoparasitismo necrotrófico.....	25
3. OBJETIVO GENERAL.....	25
3.1. Objetivos particulares.....	26
4. HIPÓTESIS GENERAL.....	26
4.1. Hipótesis particulares.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Localización.....	27
5.2. Patógeno.....	27
5.3. Aislamiento de microorganismos antagonicos.....	28
5.3.1. Dilución en placa.....	29
5.3.2. Técnica de cebo.....	29
5.3.3. Técnica de pastelitos de suelo.....	30
5.4. Interacción macroscópica de micoparasitismo.....	31
5.5. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sobre esclerocios.....	31
5.6. Interacción microscópica del micoparasitismo.....	32
5.6.1. Observación microscópica del micoparasitismo.....	32
5.7. Preparación de inoculante biológico.....	33
5.7.1. Preparación de esporada.....	33
5.7.2. Impregnación de inoculante con carbón vegetal como acarreador.....	33
5.8. Evaluación del antagonismo hacia <i>S. sclerotiorum</i> y <i>S. minor</i> en lechuga.....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1. Aislamiento de microorganismos antagonicos.....	36
6.1.1. Técnica de diluciones.....	37
6.1.2. Técnica de cebo.....	37
6.1.3. Técnica de pastelitos de suelo.....	38



6.2. Interacción macroscópica de micoparasitismo. ....	42
6.3. Preparación de esclerocios micoparasitados de cultivos duales. ....	49
6.4. Interacción microscópica del micoparasitismo. ....	58
6.5 Preparación de Inoculante biológico. ....	63
6.6. Evaluación del antagonismo hacia <i>S. sclerotiorum</i> y <i>S. minor</i> en lechuga. ....	64
7. CONCLUSIONES. ....	73
8. BIBLIOGRAFÍA. ....	74
APÉNDICE 1. ....	86
APÉNDICE 2. ....	87
ANEXO. ....	88

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Producción agrícola de lechuga en México periodo 2000-2005 (Anuario agrícola SIAP, 2005) .....	4
<b>Cuadro 2.</b> Composición nutritiva de 100g de parte comestible de tres variedades de lechuga. ....	8
<b>Cuadro 3.</b> Relación y origen de 14 muestras de suelos de diferentes localidades de uso agropecuario, forestal y selvático de México. ....	28
<b>Cuadro 4.</b> Combinación de tratamientos para la evaluación antagónica de tres cepas de <i>Trichoderma</i> hacia dos patógenos fúngicos, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Sclerotinia minor</i> . ....	34
<b>Cuadro 5.</b> Efecto <i>in vitro</i> contra <i>Sclerotinia minor</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> de los aislamientos de hongos obtenidos por dilución en placa, a partir de suelo de Jalisco (MJ2). ....	36
<b>Cuadro 6.</b> Efecto <i>in vitro</i> contra <i>Sclerotinia minor</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> de los aislamientos de hongos obtenidos por dilución en placa, a partir de suelo de Veracruz (11 2 <sup>a</sup> ). ....	37
<b>Cuadro 7.</b> Hongos del grupo <i>Trichoderma</i> obtenidos por técnica de cebo, a partir de esclerocios de <i>Sclerotinia minor</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . ....	38
<b>Cuadro 8.</b> Agrupación de cepas de antagónicas del género <i>Trichoderma</i> de acuerdo a la descripción visual de grado de parasitismo en ambos aislados de <i>Sclerotinia</i> , y origen del aislamiento. ....	47
<b>Cuadro 9.</b> Grado de parasitismo de cepas de <i>Trichoderma</i> observado sobre esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> y <i>S. minor</i> , conforme a la posición de los esclerocios en los cultivos duales. ....	50
<b>Cuadro 10.</b> Evaluación de calidad de inóculo medida con base en la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de inculante, a los diez días de inoculación en carbón como acarreador. ....	64
<b>Cuadro 11.</b> Evaluación de efectividad antagónica de cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Sclerotinia minor</i> en plantas de lechuga. ....	66
<b>Cuadro 12.</b> Pruebas de viabilidad inóculo, con respecto al tiempo de inoculación y finalización de ensayo con plantas de lechuga, promedio de UFC g <sup>-1</sup> . ....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desarrollo y síntomas de las enfermedades en hortalizas y en flores, producidas por el hongo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Agris, 2005). .....	11
<b>Figura 2.</b> Técnica de pastelitos de suelo, a partir de cuatro suelos inoculados sobre micelio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Ss) donde: a) Testigo de Ss (izquierda), crecimiento de <i>Trichoderma</i> a partir de muestra de suelo pitayo sobre el micelio de Ss (derecha), b) escaso crecimiento de <i>Trichoderma</i> de suelo MJ <sub>2</sub> sobre micelio de Ss, c) nulo crecimiento de <i>Trichoderma</i> de suelo 12 2 <sup>a</sup> sobre micelio de Ss. d) crecimiento bacteriano sobre micelio de <i>Trichoderma</i> y Ss inoculado por suelo de Chinampa. Tri= <i>Trichoderma</i> , Ps= pastelito de suelo, Ss= <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	40
<b>Figura 3.</b> Observación macroscópica de la interacción de las cepas IBA-4, IBA-38 e IBA-56, se muestra el crecimiento micelial sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>S. minor</i> . Donde: Tri, <i>Trichoderma</i> ; Sm, <i>Sclerotinia minor</i> , y Ss, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Series 1a-c= Testigos de las cepas de <i>Trichoderma</i> , Series 2a-c= interacción <i>Trichoderma</i> -Sm, Series 3a-c) Testigo de Sm, Series 4a-c) Interacción <i>Trichoderma</i> -Ss, y Series 5a-c) Testigo de Ss. ....	45
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de colonización en el proceso de micoparasitismo <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i> : IBA-1, IBA-3, IBA-4, IBA-22, IBA-23, IBA-37, IBA-38, IBA-46, IBA-54, y la IBA-56, sobre micelio patógeno. Donde: a) <i>Sclerotinia minor</i> , y b) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . n=2. ....	48
<b>Figura 5.</b> Micoparasitismo de esclerocios de <i>Sclerotinia minor</i> Jagger (Sm) por cepas de <i>Trichoderma</i> donde: a) Testigo, b) IBA-1, c) IBA-3, d) IBA-4, e) IBA-22 y f) IBA-23. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de <i>Sclerotinia minor</i> . Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro micelial. ....	53
<b>Figura 6.</b> Micoparasitismo de esclerocios de <i>Sclerotinia minor</i> Jagger (Sm) por cepas de <i>Trichoderma</i> donde: a) Testigo, b) IBA-37, c) IBA-38, d) IBA-46, e) IBA-54 y f) IBA-56. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de <i>Sclerotinia minor</i> . Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro micelial. ....	54
<b>Figura 7.</b> Micoparasitismo de esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary (Ss) por cepas de <i>Trichoderma</i> donde: a) Testigo, b) IBA-1, c) IBA-3, d) IBA-4, e) IBA-22 y f) IBA-23. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro micelial. ....	55

<b>Figura 11.</b> Micoparasitismo de esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary (Ss) por cepas de <i>Trichoderma</i> donde: a) Testigo, b) IBA-37, c) IBA-38, d) IBA-46, e) IBA-54 y f) IBA-56. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro micelial. ....	56
<b>Figura 9.</b> Micoparasitismo <i>Trichoderma</i> IBA-4 ( <i>Tri</i> ), sobre hifas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ( <i>Ss</i> ) y <i>Sclerotinia minor</i> ( <i>Sm</i> ) donde: a) se observa adosamiento de hifas y un ligero enrollamiento, b) adosamiento, c) adosamiento y un ligero enrollamiento, d) adosamiento y la formación estructuras parecidos a los apresorios.. Fotos tomadas en microscopio de contraste de fases OLYMPUS BX51, (40X). ....	61
<b>Figura 10.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> IBA-38 ( <i>Tri</i> ) con las hifas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ( <i>Ss</i> ) y <i>Sclerotinia minor</i> ( <i>Sm</i> ) donde: a) granulación, b) adosamiento de hifas, c) adosamiento y la formación estructuras parecidos a los apresorios, d) adosamiento. Fotos tomadas en microscopio de contraste de fases OLYMPUS BX51, (40X). ....	62
<b>Figura 11.</b> Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> IBA-56 ( <i>Tri</i> ) con las hifas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ( <i>Ss</i> ) y <i>Sclerotinia minor</i> ( <i>Sm</i> ) donde: a) enrollamiento de hifas, b) penetración de hifas, c) granulación y adosamiento, 5) adosamiento y vacuolación de hifas. Fotos tomadas en microscopio de contraste de fases OLYMPUS BX51, (40X). ....	63
<b>Figura 12.</b> Esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> extraídos de macetas tratadas con inoculante de las cepas de <i>Trichoderma</i> . a) esclerocio testigo, b) daño en la capa superficial del esclerocio, c) esclerocio parasitado por <i>Trichoderma</i> . ....	68

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el control biológico de enfermedades en las plantas ha tomado una trascendental importancia. Lo anterior debido a problemáticas del control químico, el cual tiene efectos sobre la salud del personal que aplica los productos y el consumidor, la contaminación de agua, suelo y atmósfera, la generación de poblaciones de patógenos resistentes a los diversos principios activos de los productos utilizados, y la falta de un control eficiente. Aunado a lo anterior, existen fuertes presiones sociales exigiendo la racionalización en el uso del control químico. En respuesta, se ha limitado el uso de plaguicidas, por lo que se han desarrollado programas de manejo integrado de las enfermedades en los que se da prioridad al uso de métodos de control no contaminantes (Zavaleta, 1999; Olalde y Aguilera, 1998).

En este contexto el control biológico ha demostrado ser una herramienta útil y necesaria, por lo que ha tenido un desarrollo sostenido en las últimas décadas. El control biológico ocupa un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas por los patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, entre otros (Gao *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2004; Chaube *et al.*, 2003; Koutecká y DusKová, 1998).

La importancia del cultivo de las hortalizas en México, se fundamenta por la superficie que se destina a su cultivo, por la fuente de empleo que esta actividad representa y las divisas que se obtienen. El cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa*), se cultiva en todas las zonas templadas de México, a lo largo de todo el año. México en cuestión de producción mundial ocupa el noveno lugar como productor y los estados con mayor superficie de cultivo son Guanajuato y Sonora con una superficie de 1,611 ha y 757 ha, respectivamente (SIAP, 2005). Este cultivo se ve afectado por varias enfermedades causadas por hongos como *Rhizoctonia*, *Cercospora*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, y por bacterias como *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Agrobacterium*,

solo por mencionar algunas. Estos microorganismos causan pérdidas significativas en la producción (Subbarao, 2001). El control de estos fitopatógenos se basa principalmente en la utilización de fungicidas de síntesis química como benomil, proclonazolo, tiofanatometil, vincozolin y tebuconazol, mismos que a pesar de emplearse en dosis cada vez más elevadas no ofrecen un control total. Por el contrario, su continua aplicación puede provocar resistencia en los patógenos, así como generar contaminación ambiental, y afectar tanto organismos benéficos de la planta como al hombre mismo (Mueller *et al.*, 2002).

Una de las enfermedades más graves en el cultivo de la lechuga es la producida por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (ascomiceto), que provoca la podredumbre húmeda conocida como apogamio o caída de la lechuga. Su alto grado de incidencia y la falta de tratamientos químicos efectivos (Gomar *et al.*, 1993; Scannavini *et al.*, 1993), han convertido esta enfermedad en la principal causante de pérdidas del cultivo durante la primavera y el otoño con lluvias, o bien en épocas con humedad relativa elevada (Mueller *et al.*, 2002; Hung-Chang *et al.*, 2002).

La utilización de microorganismos antagonistas tales como bacterias, hongos filamentosos y micorrízicos ha resultado exitosa para el control de enfermedades con origen en el suelo en diversos cultivos (Werner y Zadworny, 2003). Entre los microorganismos más utilizados como agentes de control biológico se encuentran, las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Bacillus* y los hongos *Fusarium*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pythium*, *Sporidesmium* y *Trichoderma*. Este último género fúngico es el más utilizado para el control de un grupo numeroso de patógenos de suelo (Harman *et al.*, 2004; Orientta, 2001; Mohammed *et al.*, 1999; Ciampi *et al.*, 1994; Adams y Ayers, 1983), además de que puede favorecer la promoción del crecimiento, desarrollo y calidad de los cultivos donde se ha inoculado (Mukerji y Garg, 2000). Sin embargo, el aspecto biotecnológico del sector agrícola mexicano requiere mayor estudio e investigación, ya que a pesar de que el empleo de los microorganismos cobra mayor

auge, la mayoría de los productos biotecnológicos empleados por los agricultores provienen de otros países. Esto último además de generar dependencia tecnológica, influye en los resultados obtenidos por los productores ya que por haberse seleccionado en condiciones diferentes a las del país y específicamente al área donde serán utilizados, la efectividad de estos microorganismos no siempre es la esperada.

Con base en lo anterior, el presente trabajo consistió en evaluar el efecto de aislamientos del género *Trichoderma* de origen mexicano en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger en el cultivo de lechuga.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Producción de lechuga en México

La lechuga es una hortaliza que se cultiva en 21 estados de México, de los cuales, Guanajuato y Sonora presentan la mayor producción. En el 2004, tan solo en el estado de Guanajuato se sembraron 3,610 Ha generando una producción de 52, 929 Ton, con un rendimiento promedio de 14.8 Ton/Ha. Para el 2005, la siembra de lechuga disminuyó un 55.47% con respecto a la superficie sembrada en el 2004 (SIAP, 2005). No obstante, las notables variaciones en el rendimiento y superficie destinadas a este cultivo, muestran la inestabilidad en la producción nacional misma que se refleja con el valor de producción (Cuadro 1) (SIAP, 2005; FAO, 1998). En los últimos años en varios países, la lechuga se cultiva en invernadero y en sistemas hidropónicos para su exportación, abriendo opciones de mercados para la lechuga orgánica, con potencial en las épocas de ventana comercial, donde las producciones de lechuga a campo abierto no se encuentran en cosecha.

**Cuadro 1.** Producción agrícola de lechuga en México periodo 2000-2005 (Anuario agrícola SIAP, 2005).

Año	Superficie sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton)	Valor de la producción (\$/Ton)	Valor de la producción (miles de \$)
2000	9,645.86	9,349.86	191,542.26	20.486	1,963.24	376,042.80
2001	10,312.64	10,045.00	212,719.33	21.17	1,945.15	413,770.91
2002	10,928.67	10,580.67	228,265.54	21.574	1,838.08	419,570.32
2003	11,525.27	11,261.22	245,434.87	21.795	1,818.47	446,315.47
2004	13,020.08	12,349.58	247,385.34	20.032	1,866.10	461,645.97
2005	4,653.21	4,409.71	87,963.11	19.948	2,701.53	237,634.97



## **2.2. Cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.)**

### **2.2.1. Origen**

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) pertenece a la familia Compositae, originaria de Europa, Asia Occidental, Medio Oriente y norte de África. Su distribución se localiza a 60° latitud Norte y 55° latitud Sur. Esta especie se adapta a regiones templadas y subtropicales como cultivo de invierno. Su ciclo de cultivo puede variar de 40 a 60 días después del trasplante, dependiendo de la variedad o cultivar (Ruiz *et al.*, 1999).

La lechuga se encuentra íntimamente relacionada con la lechuga silvestre común o lechuga espinosa (*L. serriola* L.) y menos relacionada con otras lechugas silvestres. La lechuga es diploide con  $2n = 18$  cromosomas (Ruiz *et al.*, 1999; Ryder, 2001).

### **2.2.2. Ciclo fisiológico del cultivo**

La lechuga cuyo nombre botánico es *Lactuca sativa* L. es una planta anual y autógama. Su raíz no llega a sobrepasar los 25 cm de profundidad, es pivotante, corta y con ramificaciones. Sus hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio; en unos casos siguen así durante todo su desarrollo (variedades romanas), y en otros se acogollan más tarde. El borde de los limbos puede ser liso, ondulado o aserrado, el tallo es cilíndrico y ramificado. Cuenta con una inflorescencia con capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o corimbos. Las semillas se encuentran provistas de un vilano plumoso (Cota-López, 2006).

### **2.2.3 Tipos de lechuga**

La lechuga presenta una alta diversidad dada principalmente por diferentes tipos de hojas y hábitos de crecimiento de las plantas. Esto ha llevado a diferentes botánicos a distinguir variedades botánicas en la especie, existiendo varias consideradas importantes como cultivo hortícola en distintas regiones del mundo. Las variedades botánicas cultivadas más importantes son (Ryder, 2001; FAO, 1998; Ruiz *et al.*, 1999):

a) ***Lactuca sativa* L. var. *capitata* (L.)**; corresponden a las lechugas conocidas como amarra, mantecosas o españolas. Presentan hojas lisas, orbiculares, anchas, sinuosas y de textura suave o mantecosa. Las hojas más internas forman un cogollo amarillento al ser envueltas por las hojas nuevas. En general, son cultivares de menor tamaño y ciclo corto (55 a 70 días), y son los más utilizados, en algunos países, para la producción en invernadero.

b) ***Lactuca sativa* L. var. *crispa* L.**: Corresponde a lechugas de cabeza, este tipo forma numerosas hojas de borde irregularmente recortado (crespo). Las hojas externas se disponen abiertamente y las más nuevas e internas forman un cogollo o grupo central compacto, llamado cabeza. Son de periodo largo y de tamaño moderado logrando alcanzar un peso de más de 1 kg. Este tipo de variedad por su utilización tiene una creciente aceptación en muchos países, existiendo una amplia disponibilidad de cultivares.

c) ***Lactuca sativa* L. var. *longifolia* (Lam.)**: corresponde a las lechugas llamadas romanas o cós. La planta desarrolla hojas grandes, erguidas, oblongas y ovovadas, de 20 a 30 cm de largo y 6 a 10 cm de ancho, con nervadura prominente, superficie ligeramente ondulada, y borde irregularmente denticulado. El tallo se presenta de mayor longitud y permanece protegido por el conjunto de hojas, que se forman de una manera cónica o cilíndrica, por su disposición erecta.

d) ***Lactuca sativa* L. var. *acephala* Dill.** Corresponde a la lechuga de corte o de hojas sueltas (loose leaf), este tipo no forma cogollo, sino que sus hojas se presentan sueltas, no envolventes.

e) ***Lactuca sativa* L. var. *augustuana* All.** Lechuga espárrago o de tallo cuyo tallo y hojas carnosas pueden presentarse de color verde o rojizo. Presentan un hábito más alto que otras variedades, con hojas dispuestas libremente, sin formar cogollo o grumo. Sus hojas son angostas (4 a 6 cm), lanceoladas y largas. Esta variedad tiene amplia distribución en Oriente y especialmente en China.

#### **2.2.4. Valor nutricional**

La importancia del cultivo radica no solo en su producción sino también por su alto valor nutricional, es un cultivo de consumo en fresco, de alto contenido en agua y bajo valor energético, que lo hace un importante alimento para las dietas hipocalóricas o para disminuir de peso (Cuadro 2a – 2b). La lechuga en su composición nutritiva, es un alimento que aporta muy pocas calorías, minerales como calcio, fósforo, potasio, entre otras; además de un alto porcentaje de agua (90-95%), vitaminas como folatos, provitamina A, cantidades apreciables de vitamina C y beta-caroteno, éstas dos últimas con acción antioxidante, relacionadas con la prevención de enfermedades cardiovasculares e incluso ciertos tipos de cáncer (Cuadro 2a, b). Además contiene minerales como el potasio y el magnesio, así como fibra necesaria para el buen funcionamiento intestinal (Quintero *et al.*, 2000; EROSKI, 2005; USDA, 2008).

También se utiliza en la medicina tradicional popular de Italia como tranquilizante, ya que el látex que contienen sus hojas es un suave somnífero (EROSKI, 2005). Aparte de sus atractivos organolépticos, la lechuga también puede presentar peligros para la salud al ser potencial transmisora de algunas enfermedades como el cólera, fiebre tifoidea y hepatitis, que se pueden transmitir a través del riego con agua negras (Camargo-Castillo, 2006).

#### **2.2.5. Requerimientos ambientales**

La lechuga es una hortaliza que prefiere climas templados, por lo que sus requerimientos de humedad son del 50% de la capacidad de campo, entre 1000 a 1200 mm, preferentemente bajo riego. Así mismo, la temperatura juega un factor importante en el desarrollo del cultivo. Las temperaturas óptimas diurnas son: 10-12 °C y las nocturnas de 3-5 °C (Ruiz *et al.*, 1999); mientras que para la germinación se requiere entre 15-20°C. Para el desarrollo de cabeza firme y sólida se requieren temperaturas nocturnas de 7.2 a 10 °C y de 12.8 a 26.7 °C durante el día; mientras que su crecimiento óptimo ocurre de 5 a 18 °C. La FAO menciona al cultivo de la

lechuga ligeramente tolerante a la salinidad; sin embargo, Ruiz *et al* (1999) mencionan que es un cultivo susceptible a la salinidad. El cultivo es considerado susceptible a la acidez, teniendo un pH óptimo de 6 a 7.4 (Ruiz *et al.*, 1999; Guzmán 2004).

**Cuadro 2.** Composición nutritiva de 100 g de parte comestible de cinco variedades de lechuga.

Amino ácidos	Butterhead ó Mantequilla					Hoja roja
	Romana o cos	Green leaf ó scarola	Iceberg y crisphead	Hoja roja	Hoja roja	
Agua (g)	95.63	95.07	95.64	95.64	95.64	
Energía (kcal)	13.00	15.00	14.00	14.00	16.00	
Proteínas (g)	1.35	1.36	0.90	0.90	1.33	
Lípidos Totales (g)	0.22	0.15	0.14	0.14	0.22	
Cenizas (g)	0.57	0.62	0.36	0.36	0.55	
Carbohidratos totales (g)	2.23	2.79	2.97	2.97	2.26	
Fibra dietética total (g)	1.10	1.30	1.20	1.20	0.90	
Azúcares totales (g)	0.94	0.78	1.97	1.97	0.48	
<b>Minerales</b>						
Calcio (mg)	35.00	36.00	18.00	18.00	33.00	
Hierro (mg)	1.20	0.86	0.41	0.41	1.20	
Magnesio (mg)	13.00	13.00	7.00	7.00	12.00	
Fosforo (mg)	33.00	29.00	20.00	20.00	28.00	
Potasio (mg)	238.00	194.00	141.00	141.00	187.00	
Sodio (mg)	5.00	28.00	10.00	10.00	25.00	
Zinc (mg)	0.20	0.18	0.15	0.15	0.20	
Cobre (mg)	0.02	0.029	0.025	0.025	0.028	
Manganeso (mg)	0.18	0.25	0.125	0.125	0.203	
Selenio (mcg*)	0.60	0.60	0.10	0.10	1.50	
<b>Vitaminas</b>						
Ácido ascórbico (mg)	3.70	18.00	2.800	2.800	3.70	
Tiamina (mg)	0.057	0.07	0.041	0.041	0.064	
Riboflavina (mg)	0.062	0.08	0.025	0.025	0.077	
Niacina (mg)	0.357	0.375	0.123	0.123	0.321	
Ácido Pantoténico (mg)	0.15	0.134	0.091	0.091	0.144	
Vitamina B-6 (mg)	0.082	0.09	0.042	0.042	0.10	
Colina, total (mg)	8.40	13.40	6.70	6.70	11.80	
Betaina (mg)	0.10	0.20	0.10	0.10	0.20	
Vitamina A, IU**	3312	7405	502	502	7492	
Vitamina E (mcg)	0.18	0.29	0.18	0.18	0.15	
Vitamina K (mcg)	102.3	173.60	24.10	24.10	140.30	

Fuente: USDA, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

\* mcg o µg: microgramo.

\*\* UI: Unidad Internacional.

### 2.3. Epidemiología de la pudrición de lechuga causada por *Sclerotinia sclerotiorum*

La pudrición de la lechuga, puede ser originada por los hongos del género *Sclerotinia*, en particular *S. sclerotiorum* y *S. minor*. Sin embargo, varias especies de *Sclerotinia* pueden encontrarse al mismo tiempo en una pudrición, pero *S. minor* usualmente es la especie predominante.

El género *Sclerotinia* se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y afecta a las plantas en particular hortalizas y florales, en cualquier etapa de su desarrollo al producir enfermedades devastadoras (Agris, 2005).

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es un hongo habitante del suelo, de extensa distribución en climas templados y subtropicales. Como hospedantes de este patógeno se encuentran 408 especies de plantas de 278 géneros, y 75 familias, Con la excepción de la especie *Rumohra adiantiformis* (Pteridophyta), todos los hospederos de *S. sclerotiorum* ocurren en las clases Gymnospermae y Angiospermae de la división Spermatophyta (Boland y Hall, 1994; Bolton *et al.*, 2006).

*Sclerotinia minor* Jagger, puede infectar una amplia gama de plantas, a nivel mundial, sobre todo en regiones húmedas y frescas, y puede parasitar por lo menos 94 especies de plantas que pertenecen a 21 familias y 66 géneros (Melzer *et al.*, 1997). Las especies de cultivos en las que causa daños importantes son el girasol, el frijol, la lechuga, el cacahuate, lenteja, entre otros. En las áreas de producción de lechuga, las pérdidas de la cosecha pueden ser del 10% al 50% y en algunos casos pueden ascender a más del 70% (Melzer *et al.*, 1997), sin embargo, las pérdidas anuales en Estados Unidos de América han excedido hasta \$100 millones de dólares, en cultivo de girasol en 1999 (Bolton *et al.*, 2006).

Los síntomas que produce *Sclerotinia* varían de acuerdo a su hospedante o la parte afectada (Boland y Hall, 1994; Bolton *et al.*, 2006). Las plantas no aparecen afectadas en el desarrollo

temprano de la enfermedad, el primer síntoma visible es la aparición de un micelio veloso y blanco sobre la planta infectada, que al poco tiempo desarrolla grandes estructuras compactas de resistencia (esclerocios) cuyo diámetro puede variar drásticamente de acuerdo al hospedante, en el cultivo de lechuga puede presentar tamaños de 0.5 a 1 mm, en *S. minor*, de 2 a 10 mm, y en *S. sclerotiorum* y pueden ser planos y largos (Figura 1) (Agris, 2005, Bolton *et al.*, 2006).

En los tallos de las plantas que han sido infectadas, aparecen en primer término, varias lesiones que se cubren con gran rapidez, zonas algodonosas blancas constituidas por el micelio del hongo, en las primeras etapas del desarrollo de la lesión en el tallo. El follaje muestra muy pocos signos del ataque por el hongo hasta que éste se desarrolla totalmente sobre el tallo y lo pudre. Debido a esto, el follaje localizado en la parte superior de la lesión se marchita y muere con rapidez. Los esclerocios pueden formarse en la parte interna del tejido vegetal sin que se note su presencia, en condiciones de humedad alta, los esclerocios se forman en la superficie del tejido donde son bastante conspicuos (Gomar *et al.*, 1993; Subbarao, 2001; Agris, 2005; Bolton *et al.*, 2006).

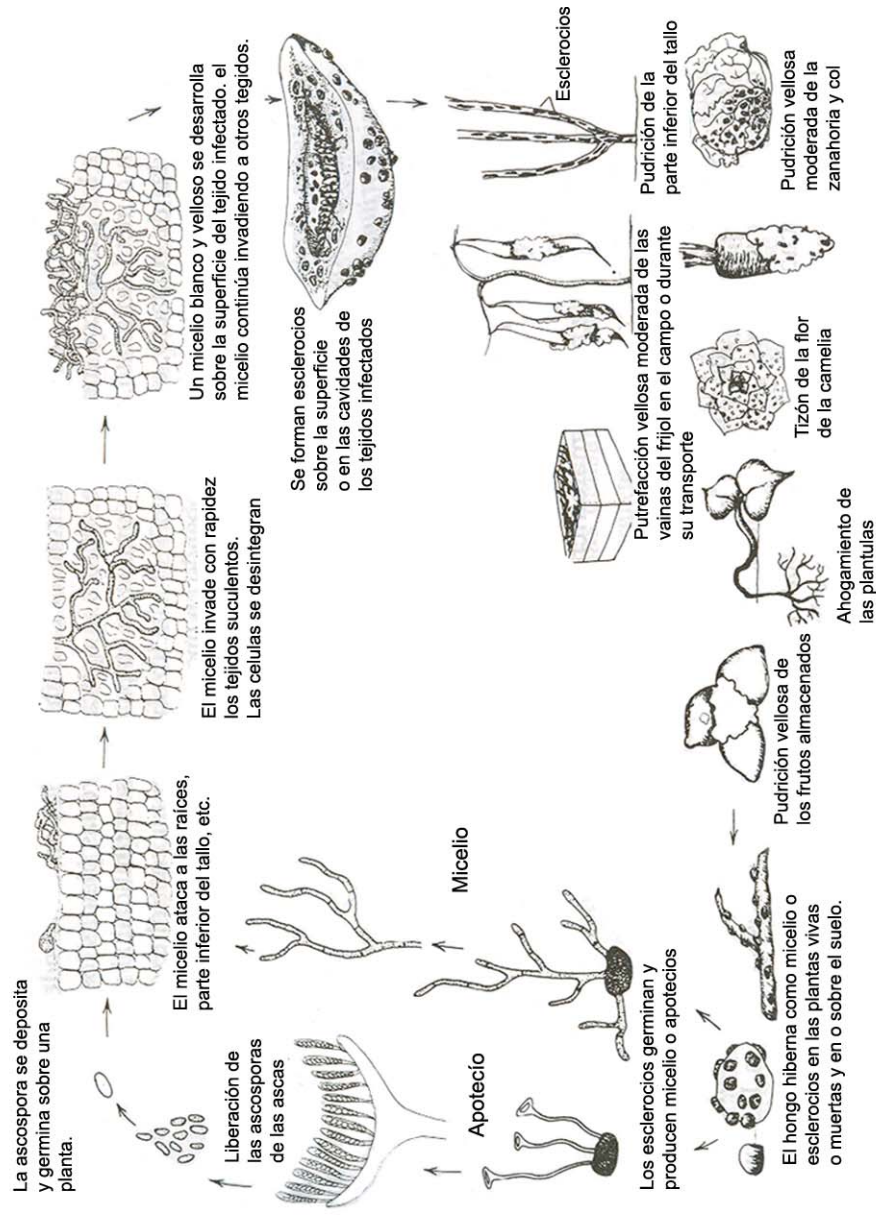


Figura 1. Desarrollo y síntomas de las enfermedades en hortalizas y en flores, producidas por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Agris, 2005).

Se ha demostrado que la acción patógena de *Sclerotinia* sobre la lechuga depende, en gran medida, de la materia orgánica (Dillard y Grogan, 1985) y de la flora edáfica (Mercier y Reeleder, 1987). Por su parte, la acción micoparásita, así como el efecto supresor de microorganismos presentes en el suelo hacia el patógeno, es un prometedor agente de control biológico de la podredumbre húmeda de la lechuga. El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* y algunas especies emparentadas invernan en forma de micelio en plantas vivas o muertas y en forma de esclerocios. Durante la primavera o a principio de verano, los esclerocios germinan y producen de uno o varios tallos delgados que terminan en un pequeño apotecio que tiene un diámetro de 5 a

15 mm y tiene forma de copa o de disco, en el cual forman las ascas y las ascosporas. Estos apotecios liberan numerosas ascosporas al aire al cabo de 2 a 3 semanas, por lo que son diseminadas y depositadas sobre órganos vegetales senescentes (Gomar *et al.*, 1993; Subbarao, 2001; Agrios, 2005).

#### **2.4. Importancia de los esclerocios como estructuras de supervivencia**

Aunque los esclerocios son estructuras importantes de supervivencia de *Sclerotinia* sp., raramente reciben la atención sobre su importancia. Los esclerocios presentan características estructurales y de comportamiento que los distinguen de otros propágulos fúngicos. Los esclerocios, permiten mantener un estado quiescente viable en muchos hongos cuando está ausente un hospedante adecuado o durante condiciones que desfavorecen el crecimiento activo (Willettts y Wong, 1980). Se ha demostrado que *S. sclerotiorum* es capaz de formar esclerocios secundarios en el suelo, es decir, que germina y aumenta la cantidad de inóculo. Dichos cuerpos de resistencia, bajo condiciones de sequía pueden permanecer viables de 8 a 10 años (Cundom *et al.*, s/f; Ayers y Adams, 1979, Bolton *et al.*, 2006)

Múltiples factores influyen en la supervivencia del esclerocio en la naturaleza. Algunos de estos factores involucran la estructura y función del esclerocio por sí mismo, mientras que otros se relacionan con las condiciones ambientales como humedad y temperatura. Además del medio de cultivo como el pH han tenido una influencia significativa en el desarrollo del esclerocio, donde el pH neutro o alcalino, la formación de esclerocios es inhibida (Bolton *et al.*, 2006), lo que también influye la existencia de microorganismos habitantes del suelo que pueden hiperparasitar a los esclerocios (Mónaco *et al.*, 1998).

En hongos como *Sclerotinia*, la integridad de los esclerocios que presentan una corteza puede influir en la supervivencia. Sin embargo, no parece haber una relación definitiva entre longevidad y la presencia de una corteza, ya que se han reportado periodos largos de



supervivencia para esclerocios sin corteza. No se conoce con exactitud el tiempo de supervivencia de los esclerocios, ya que no se han realizado ensayos que demuestren el tiempo de vida de un esclerocio. La principal dificultad para lo anterior, se relaciona en que en el suelo, los esclerocios del género *Sclerotinia* pueden germinar de dos maneras, produciendo apotecios o formar micelio (Mónaco *et al.*, 1998), provocando la producción de esclerocios. Así, los esclerocios recuperados no necesariamente son los que fueron enterrados originalmente, sino que son producto de la germinación micelial del esclerocio enterrado.

## **2.5. Control biológico**

El control biológico se define como la acción de parásitos, predadores o patógenos que reducen la densidad de los propágulos de agentes causales de enfermedades, en su estado activo o quiescente. Sin embargo Cook y Baker (1983) citados por García (2007) ha definido el control biológico como la reducción de la cantidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno. Este control se logra de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar (García-Espinosa, 2007; Agrios, 2005; De Bach, 1964; Baquer y Cook, 1974).

El primer intento de control biológico fue llevado a cabo por Hartley (1921) al controlar una enfermedad de hábito radical por medio de microorganismos introducidos al suelo. Este investigador realizó experimentos en los que inoculó suelo esterilizado con 12 cepas de hongos saprofitos y una de bacterias, obteniendo un control significativo de la pudrición de raíz de plántulas de pino causada por *Pythium debaryanum*. Adicionalmente, obtuvo mayor supervivencia y crecimiento inicial de las plántulas. Sin embargo, el potencial de especies de *Trichoderma* como agente de control biológico fue reconocido en los años de 1930's (Howell, 2003). Además de controlar a los fitopatógenos, estos bioantagonistas, producen efectos positivos sobre el rendimiento y calidad de los frutos, así como en aumento de la acumulación de la

materia seca de la parte aérea y radical de las plantas. Weindling (1932) demostró que algunas especies de *Trichoderma* eran capaces de controlar una enfermedad provocada por hongos fitopatógenos, cuando son inoculadas en el suelo del cultivo.

## 2.6. Microorganismos antagonistas en el control biológico

Existen diversos trabajos relacionados con el control biológico de fitopatógenos, utilizando microorganismos antagonistas, seleccionados de diferentes nichos ecológicos. Sin embargo, la investigación sobre la utilización de estructuras de resistencia (esclerocios), como agente de selección de microorganismos supresores, ha logrado ser eficaz en el control biológico (Mohammed *et al.*, 1999).

El componente más significativo del suelo que afecta la supervivencia de los esclerocios, parece ser biológico. Más de 30 especies de hongos y bacterias han sido señalados como antagonistas de *Sclerotinia* spp (Chaube *et al.*, 2003; Fernández, 2002; Mohammed *et al.*, 1999; Adams y Ayers, 1983; Ayers y Adams, 1979). Entre los hongos utilizados para el biocontrol de patógenos fúngicos de suelo, las especies de *Trichoderma* han sido mercedoras de mayor atención, su actividad resulta en una combinación de micoparasitismo y producción de metabolitos. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004; Howell, 2002; Mónaco *et al.*, 1998; Villegas y Castaño, 1999; Brozová, 2005, García-Breijo *et al.*, 2005) y *Gliocadium* (Harman *et al.*, 2004; Howell, 2003; Mónaco *et al.*, 1998). Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos entre los que destaca un papel importante el parasitismo (Ortiz y Orduz, 2000). Los hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos (Vero y Mondito, 1999).

Los esclerocios de especies fúngicas patógenas en lechuga, como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, son susceptibles de ser parasitados e hidrolizados por las enzimas líticas, en especial las glucanasas, producidas por *T. harzianum* (Invar *et al.*, 1996; Whipps, 1991). La presencia de plantas de lechuga afectadas por *Sclerotinia* va ligada a la climatología presente durante el ciclo del cultivo. No obstante la aplicación de *Trichoderma* ha mostrado ser efectiva al competir con *Sclerotinia* y reducir con ello el número de plantas afectadas (Campos *et al.*, 1998).

### **2.7. Generalidades del género *Trichoderma***

Las cepas fúngicas del género *Trichoderma* se encuentran ampliamente distribuidas, prácticamente en todos los climas del mundo, contando con capacidades de crecimiento en diferentes substratos como restos vegetativos y madera degradada, pero, se localiza con mayor frecuencia en suelo (García-Breijo *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2000).

*Trichoderma* pertenece a la clase Deuteromycotina, Subclase Hyphomycetidae, Orden Moniliales, Familia, Moniliaceas (Domsch *et al.*, 1980a). Los miembros del género *Trichoderma* spp. poseen conidióforos rectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos; al final del conidióforo las conidias se agrupan en forma de pelota. Las conidias son de distinto tamaño y forma. Pueden ser subglobosas y ovoides. Comúnmente forma clamidosporas intercaladas o raramente terminales, las cuales pueden ser azules a verdes (Cook y Baker, 1989; Domsch *et al.*, 1980b, Gams y Anderson, 1980). El género *Trichoderma* está compuesto por hongos que se encuentran presentes en forma natural en casi todos los suelos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Algunas cepas son componentes importantes de la rizosfera, mismas que presentan facilidad para colonizar las raíces de las plantas. *Trichoderma* spp. ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional

adicional. De esta manera, ha sido posible desechar varios mecanismos con los cuales este hongo actúa como biocontrolador (García-Breijo *et al.*, 2005; Harman, 2000).

En el caso de *Trichoderma viride*, sus colonias alcanzan hasta 9 cm de diámetro al cabo de 5 días a 20 °C. Sus conidias son subglobosas a ovales-cortas, las cuales miden 2.8–3.2 x 2.5–2.8 µm. Aunque 21 especies han sido reportadas, *T. viride* es una de las más comunes especies del género. En todo el mundo se le ha encontrado en los más variados sustratos (Domsch *et al.*, 1980a; Gams y Anderson, 1980).

### **2.7.1. Factores que inciden en el crecimiento de *Trichoderma harzianum***

Sus conidias germinan entre 100 a 70 bares de saturación de vapor, óptimamente con condiciones de 30 % de humedad relativa. Su germinación requiere además de fuentes externas de recursos nutritivos y CO<sub>2</sub> bajo, y pobres condiciones nutrimentales. Además posee un amplio rango de temperaturas óptimas de crecimiento (15–35 °C), presentando un óptimo para su aislamiento a los 30 °C, y como máximo entre los 30 y 36 °C. El pH óptimo se sitúa entre 3,7 y 4,7; mientras que su tolerancia a condiciones de salinidad se encuentra alrededor de los 40 bares (5 % NaCl) (Harman *et al.*, 2004; Domsch *et al.*, 1980b).

Mediante pruebas de cinética de crecimiento, las especies de *Trichoderma* se han dividido en tres clases: de rápido crecimiento (*T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. atroviride*), de velocidad media de crecimiento (*T. koningii*, *T. asperellum*, *T. citrinoviride*), y de lento crecimiento (*T. oblongisporum*, *T. spirale*) (Cabrera *et al.*, 2000).

Muchos hongos antagonicos, inducen a las plantas a producir fitoalexinas, a las cuales algunos hongos patógenos son sensibles. Las fitoalexinas son producidas en forma natural como respuesta a las heridas. Otros productos como el orquinoI (producto de orquídeas), la trifolirizina o la isocumarina, son formados cuando se produce la invasión de los hongos en las raíces y otros órganos, que hipotéticamente actúan en forma comparable a los anticuerpos en los animales. En

el caso de *Trichoderma harzianum*, éste induce altos niveles de fitoalexinas de tal forma que el nivel tóxico alcanzado evita que otros hongos patógenos se puedan establecer (MAG, 1994).

### **2.8. Mecanismos de acción**

En un sistema de control biológico existen dos estrategias que pueden aplicarse para contrarrestar a un fitopatógeno: directas o indirectas. Dentro las estrategias indirectas se encuentran el uso de suelo orgánico que favorece la actividad antagonista contra un patógeno específico. Otra estrategia indirecta es la protección cruzada la cual involucra la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta contra un patógeno, como es el caso de la pre-inoculación de las plantas con un patógeno no virulento (Brozová, 2004; Howell, 2003; Chaube *et al.*, 2003).

En una interacción combativa directa, pueden distinguirse varios mecanismos antagonistas tales como la producción de antibióticos, la secreción de enzimas líticas, la interacción entre hifas, y la penetración directa. Las estrategias directas involucran la introducción de antagonistas específicos en el suelo. Estos organismos tienen que proliferar y establecerse en un nicho ecológico apropiado, para poder ser activos contra el patógeno al interferir en su desarrollo y su supervivencia (Chaube *et al.*, 2003; Howell, 2003).

Los mecanismos por los que los microorganismos antagonistas afectan a las poblaciones de patógenos en general, se atribuyen a uno de cuatro efectos (Brozová, 2004; Chaube *et al.*, 2003, Howell, 2003):

1. Competencia con el patógeno por alimento y por espacio.
2. Efecto tóxico directo sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista (penicilina, producidas por *Penicillium* spp.; trichodermin, suzukacilina, alamecicina, dermadina, trichotecenosa, tricolorianinos, gliotoxina, producidas por *Trichoderma* spp.).

3. Efecto tóxico indirecto sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.
4. Parasitismo directo y muerte del patógeno (parasitismo necrotrófico y biotrófico).

### **2.8.1. Competencia**

Se puede definir como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista la competencia es que se presente escasez de recursos, si hay exceso no hay competencia. Lo más común es competir por nutrientes, oxígeno o espacio. Se destaca la producción de materiales extracelulares (en especial polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos (Eziannini, 2004; Mohamed *et al.*, 2004).

### **2.8.2. Antibiosis**

Este proceso se refiere a la producción de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menos de 10 ppm) (Agris, 2005; Madigan, 2004; Mohammed *et al.*, 2004).

Las secreciones antibióticas de los hongos biocontroladores, permiten la formación de canales iónicos en la membrana plasmática de los fitopatógenos como consecuencia de la interacción de péptidos antibióticos, denominados peptaiboles (Whitmore y Wallace, 2004). La formación de estos canales permite el vaciamiento celular (Chungh y Wallace, 2001). Por su parte, la secreción de enzimas como endoquininas,  $\beta$ -1, 3 glucanasa, (Migheli *et al.*, 1998) proteasas (Elad y Kapat, 1999; De Marco y Felix, 2002) permite la degradación de los componentes de la pared celular del fitopatógeno, considerándose así uno de los mecanismos importantes en el control biológico (Howell, 2003; Barnett y Binder, 1973; Chaube *et al.*, 2003). A través de ensayos se demostró el filtrado extracelular de cepas de *T. harzianum* inhibió el crecimiento lineal de *Pythium aphanidermatum* en 83%, comparados con 8% de inhibición por

un filtrado de otro cultivo de *T. hamatum*. Recíprocamente, las substancias excretadas por *P. aphanidermatum* de un medio de cultivo reforzaron el crecimiento lineal de *T. harzianum* en 34%, pero no el de *T. hamatum* (Sivan *et al.*, 1984).

### **2.8.3. Parasitismo**

El parasitismo puede definirse como simbiosis antagónica entre organismos heterotróficos que involucra una relación nutricional (como alimento de su antagonista) que es favorable para el parasito y usualmente desfavorable para el hospedante (Barnett, 1964). Un claro ejemplo de este proceso es el micoparasitismo, en el que generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos (Mohammed *et al.*, 2004b; Ulhoa, 1996; Melgarejo *et al.*, 1989). Al respecto, El género *Trichoderma* difiere en su habilidad de parasitar diferentes cepas de hongos fitopatógenos.

### **2.9. Micoparasitismo**

El micoparasitismo se basa en la relación donde un hongo obtiene directa o indirectamente todos o algunos de sus nutrientes al invadir a otro hongo (Gao *et al.*, 2005). La capacidad de un hongo para micoparasitar, está determinada parcialmente por su estado fisiológico, que puede ser alterado por cambio en las condiciones físicas y químicas o nutricionales asociadas con la utilización de recursos, y repercute en su capacidad combativa frente al hongo hospedante. En una interacción hongo-hongo pueden distinguirse varios mecanismos antagónicos tales como producción de antibióticos, la secreción de enzimas líticas, la inferencia entre hifas, y la penetración directa del hospedante. Algunas acciones frecuentes que se consideran en el micoparasitismo son: el enrollamiento de hifas, formación de haustorios y apresorios, así como aposiciones en la pared celular, por la secreción enzimática que promueven cambios en le micelio y la estructuras, provocando lisis, arrugamiento, explosión y colapso del micelio del hospedante (Lara y Ferrera-Cerrato, 2007; Ferrera-Cerrato, 1977).

Los hongos parasíticos han sido clasificados por Gäumann (1946) y Barnett y Binder (1973) en parásitos biotróficos y parásitos necrotroóficos, así clasificaron el micoparasitismo en dos tipos: a) micoparasitismo biotrófico, en el que el desarrollo del parásito es favorecido por el contacto persistente con células vivas del hospedante, y b) micoparasitismo necrotroífico o destructivo, en el cual la relación micoparasítica resulta en la muerte del hongo hospedante, además de utilizar los nutrientes resultado de la degradación.

### **2.9.1. Micoparasitismo biotrófico**

Los hongos con micoparasitismo biotrófico no son capaces de sintetizar ciertos nutrientes los cuales obtienen de las células vivas del organismo parasitado. Esta relación parasitaria se ha hecho estrecha, se debe a que el parásito carece de la capacidad de sintetizar ciertos factores nutrimentales, que el hospedante le proporciona continuamente durante la relación parasitaria. Los micoparásitos biotróficos se presente en tres distintos tipos (Barnett, 1964; Ferrera-Cerrato, 1977; Lara y Ferrera-Cerrato, 2007):

**a) Micoparásitos internos:** Estos tienen la capacidad de desarrollarse dentro de la célula hospedante de otros hongos llegando a cumplir su ciclo reproductivo en el interior del hospedante. Estos causan poco daño al hospedante en la primera fase de su desarrollo, mismo que se incrementa conforme se acerca el momento de la esporulación. Karling (1942), describe algunas etapas de micoparasitismo biotrófico de *Rozella cladochytrii*. La tipo de hospedante de este parásito incluye tres especies de *Nowakowskiella* y tres de *Cladochytrium*. La infección es abundante, donde la zoospora del parásito rodea el exterior de la célula del hospedante, donde un tubo corto de germinación penetra la pared celular, el contenido citoplasmático fluye al hospedante sin combinarse, cuando el parásito entra en *N. profusum Karling*, estimula la formación de protuberancias locales en los cuales el parásito se desarrolla. En algunos casos las protuberancias locales ocurren a una distancia del punto de la penetración. El contenido entonces



fluye en el anfitrión y pronto se hace casi indistinguible del protoplasma del anfitrión, pero se cree que el parásito retiene su identidad separada. Cuando el parásito desarrolla y aumenta de tamaño, utiliza los nutrientes y finalmente destruye el protoplasma. Coker (1923) describe *Aphanomyces parasiticum* Coker como un parásito de *Achyla* spp. este parásito crece dentro de la hifa del hospedante.

**b) Micoparasitismo por contacto:** Este se realiza por el extremo de la hifa donde se encuentra una célula especializada llamada reguladora, que hace contacto con la superficie de la pared del hospedante y que al parecer tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana y permite mayor aporte de sustancias para el parásito. El daño que produce este tipo de micoparasitismo es leve, a esto se debe que esta relación parasitaria pueda ser prolongada.

**c) Micoparasitismo haustorial:** Este tipo de micoparasitismo se inicia por los exudados del hospedante que estimula la germinación de las esporas del parásito. La infección inicia con el contacto de las hifas del parásito y del hospedante, formando una apresoria, seguida de una invasión por una pequeña prolongación de una hifa digitiforme que penetra a la célula hospedante, aquí se ramifica para dar lugar a una estructura absorbente llamado haustorio. Un ejemplo es en los mucorales que producen haustorias, que penetran la hifa del hospedante, y usualmente parasitan a otros mucorales (Barnett, 1964) las especies de *Piptocephalis* forman apresorios al momento de contacto con el hospedante, la penetración es por una delgada clavija de infección.

### **2.9.2. Micoparasitismo necrotrófico**

Este mecanismo se caracteriza por crecer sobre una gran variedad de sustratos; este tipo de parásitos está considerado como facultativo u oportunista, ya que no requieren nutrientes provenientes de otros organismos para su desarrollo. Sin embargo tienen la capacidad de crecer sobre las colonias de hongos susceptibles que se encuentran cercanos (Barnett y Binder, 1973,

Ferrera-Cerrato, 1977; Lara y Ferrera-Cerrato, 2007). Los micoparásitos necrotróficos tienden a ser más agresivos, ya que tienen un amplio espectro de hospedantes. La actividad antagónica de un micoparásito necrotrófico está dada por la producción de antibióticos, toxinas o enzimas hidrolíticas que causan la muerte y destrucción del hospedante.

La degradación de las paredes celulares es un paso clave en el micoparasitismo. La pared celular de los hongos es una estructura bastante compleja constituida por diferentes polímeros. En general, la pared celular está conformada por una capa interna de microfibrillas cristalinas embebidas en una matriz amorfa, junto con una o más capas externas. Los componentes más abundantes de la pared celular de la mayoría de los hongos son la quitina,  $\beta$ -1,3-glucana y glicoproteínas. Sin embargo, lo que le da a la pared celular sus características especiales es la forma en la que estos polímeros interactúan entre sí. Existen evidencias de que algunas nanoproteínas se encuentran ensambladas con fibras de  $\beta$ -1,3-glucanasa y de quitina, formando una red resistente (Mohammed *et al.*, 2004b).

La respuesta antagónica primaria entre *Trichoderma* y el fitopatógeno involucra el crecimiento dirigido hacia la hifa susceptible, probablemente por quimiotropismo positivo. *Trichoderma* detecta a su hospedante a distancia y comienza a ramificarse en forma atípica, creciendo hacia su presa. Cuando el micoparásito alcanza al hongo susceptible, sus hifas a menudo se enrollan alrededor de él o crecen a lo largo del hongo. El fenómeno de enrollamiento y formación de apresorios ha sido registrado para otros micoparásitos (Dwivedi y Shukla, 2002). Como ejemplo, *Trichoderma harzianum* enrolla sus hifas alrededor de su hospedante *Rhizoctonia solani*. Entre los dos hongos se observó una fina matriz extracelular que origina de las células de *Rhizoctonia solani*, rica en residuos de galactosa como resultado de la degradación de quitina mediante la producción continua de quitinasas por el antagonista (Benhamou y Chet, 1993). En otro ejemplo, en las interacciones entre *T. harzianum* y *Fusarium culmorum* agente causal de

fusariosis del trigo invernal, se determinaron dos maneras de control: 1) la penetración de hifas del antagonista a través de la formación de apresorios, provocando cambios morfológicos del hospedante y antagonista, y 2) la producción del antibiótico probablemente se localiza en las puntas de las hifas, el cual es excretado a los puntos de contacto con el patógeno, por lo que es componente responsable para el antagonismo (Michalková y Michina, 1997).

La unión y el reconocimiento entre el micoparásito y su hospedante podría ser esencial para el éxito de los eventos que le continúan. Las lectinas son proteínas unidas a carbohidratos, o glicoproteínas, que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados, y que fueron descubiertas en plantas y más tarde en microorganismos. Además, se ha visto que las lectinas están involucradas en las interacciones entre la superficie celular y su ambiente extracelular. En algunos hongos fitopatógenos, tales como *R. solani* y *S. rolfssii* se ha determinado la presencia de lectinas sobre su hifa, las cuales son producidas como componentes del polisacárido extracelular (Mohammed *et al.*, 2004b).

La capacidad de diferentes aislados de *Trichoderma* para reconocer y atacar *R. solani* y *S. rolfssii*, correlaciona directamente con la aglutinación de conidias de *Trichoderma* por las lectinas presentes en el patógeno. Las lectinas estimulan en *T. harzianum* el enrollamiento de la hifa y la formación de estructuras similares a apresorios alrededor de superficies inertes que mimetizan al hongo hospedante. Cuando el micoparásito crece sobre fibras de nylon, cubiertas con concanavalina A o una lectina de *S. rolfssii*, la incidencia en el enrollamiento y la formación de estructuras fue significativamente más alta que cuando crece en presencia de fibras no tratadas, sugiriendo un papel importante de las lectinas en la interacción primaria hospedante-micoparásito (Mohammed *et al.*, 2004b; Dwivedi y Shukla, 2002).

En el mundo biológico existe una interacción continua y un equilibrio dinámico entre los patógenos y los antagonistas. Por lo anterior, la utilización de microorganismos antagonistas o el

uso de enmiendas orgánicas es una alternativa para disminuir la incidencia de enfermedades. En el caso de antagonistas, existe un grupo importante de hongos, bacterias y actinomicetos, que presentan efectos inhibición hacia otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de fitopatógenos. Colateralmente, los antagonistas parecen tener un efecto en el mejoramiento de la nutrición y resistencia hacia otros organismos patógenos.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Aislar, seleccionar y evaluar la capacidad antagonista de *Trichoderma* de origen mexicano hacia *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger.

#### 3.1. Objetivos particulares

- Aislar hongos del género *Trichoderma* a partir de diferentes muestras de suelos de uso agropecuario y forestal que inhiban *in vitro* el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.
- Evaluar la capacidad micoparasitismo *in vitro* de los hongos aislados contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.
- Producción y evaluación de inoculantes a partir de hongos de *Trichoderma* para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.
- Evaluar la efectividad de las mejores cepas de *Trichoderma* para controlar *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en cultivo de lechuga, bajo condiciones controladas.

#### 4. HIPÓTESIS GENERAL

Los hongos del género *Trichoderma* aislados y seleccionados a partir de diferentes muestras de suelos de uso agropecuario y forestal, muestran capacidad antagónica a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger.

##### 4.1. Hipótesis particulares

- Se pueden aislar hongos del género *Trichoderma* spp. con capacidad micoparasítica, a partir de diferentes muestras de suelos de uso agropecuario y forestal que inhiban *in vitro* el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.
- Mediante la aplicación de técnicas *in vitro* y microscopia se puede identificar y evaluar la capacidad de micoparasitismo de los hongos aislados contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.
- Se puede obtener inoculante de calidad a partir de hongos de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.
- El inoculante elaborado con cepas de *Trichoderma* spp. puede utilizarse para controlar *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en cultivo de lechuga, bajo condiciones controladas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de microbiología del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

### 5.2. Patógeno

Los patógenos utilizados en este ensayo, fueron proporcionados por Ing. Alexis Morales Reyes (2007), procedentes de la colección Microbiana del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

La reactivación se realizó a partir de esclerocios que fueron desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% (i.a) durante 5 minutos y lavados tres veces con agua destilada estéril. Los esclerocios desinfectados, se les retiro la capa de melanina, sembrando la parte interna del esclerocio, estos se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar); en condiciones de obscuridad y temperatura ambiente para favorecer el crecimiento micelial y la formación masiva de esclerocios.

### 5.3. Aislamiento de microorganismos antagonicos

Los microorganismos con potencial antagonicos, a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* fueron obtenidos de 14 suelos provenientes de seis estados de México con diferente vocación de uso: hortícola, ganadero y forestal (Cuadro 3). Cada una de las muestras de suelo fue tamizada y posteriormente, secada a la sombra.

Los aislamientos de los antagonistas se emplearon tres técnicas: 1) dilución en placa, 2) técnica de cebo y 3) técnica pastelitos de suelo. Los microorganismos aislados se conservaron en medio de papa-dextrosa-agar (PDA) para ser utilizados en la confrontación con los patógenos.

**Cuadro 3.** Relación y origen de 14 muestras de suelos de diferentes localidades de uso agropecuario, forestal y selvático de México.

Clave de muestra	Origen	Utilización de suelo
3-PRI	Oaxaca	Frutícolas (litchi)
5 B <sub>2</sub>	Oaxaca	Frutícolas (litchi)
9 B <sub>2</sub>	Oaxaca	Frutícolas (litchi)
9 NTB <sub>1</sub>	Oaxaca	Frutícolas (litchi)
Chapingo	Estado de México	Agrícola (granos básicos)
Chinampa	Estado de México	Hortícola y ornamental
Loma 3	Guanajuato	Horticultura
MJ <sub>2</sub>	Jalisco	Ganadería
Pitayo	Guanajuato	Horticultura
Pue-1	Puebla	Forestal
Pue-2	Puebla	Forestal
11 2 <sup>a</sup>	Veracruz	Selva
12 2 <sup>a</sup>	Veracruz	Frutícolas (litchi)
13 2 <sup>a</sup>	Veracruz	Frutícolas (litchi)

### 5.3.1. Dilución en placa

Para el aislamiento de antagonistas se preparó, un tamizado de cada una de las muestras de suelo, esto con un tamiz (malla 250  $\mu\text{m}$ ) y secado a la sombra. De cada suelo se tomaron 10 g que fueron colocados en frascos de dilución con 90 mL de agua destilada estéril (dilución  $10^{-1}$ ). Las muestras fueron agitadas vigorosamente con un vortex durante 18 minutos. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL que fue transferida a un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril (dilución  $10^{-2}$ ) que se agitó en un vortex durante 20 segundos. Este proceso se repitió nuevamente hasta obtener las diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  para la obtención de hongos.

La siembra en placa se efectuó tomando una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la dilución respectiva colocándola por triplicado en el centro de la placa con PDA procediendo a su rastrilleo hasta secar la gota en la superficie del medio de cultivo. Las placas fueron incubadas a temperatura de 28°C durante 3 a 4 días, y posteriormente se seleccionaron colonias de hongos para purificarlos y conservarlos.



### 5.3.2. Técnica de cebo (esclerocios Ss y Sm)

La obtención de hongos antagonistas, se prepararon pequeños sacos de tela nylon de 1 cm<sup>2</sup> en los que se colocaron 20 esclerocios por separado, de cada una de las cepas patógenas, *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) y *Sclerotinia minor* (Sm) (Granados y Wang, 2005). Los esclerocios fueron previamente desinfectados con hipoclorito al 2% durante cinco minutos y lavados tres veces con agua destilada estéril, para evitar contaminación externa.

En frascos conserveros de cristal llenos en sus tres cuartas partes de su capacidad, por duplicado, los sacos preparados fueron colocados a una profundidad de 2 cm en las respectivas muestras de suelo. Cada una de estas unidades, se incubaron a temperatura ambiente, y a humedad de capacidad de campo (CC).

La obtención y aislamiento de los antagonistas se realizó al extraer dos esclerocios cada 48 h. Los esclerocios se lavaron con agua destilada estéril, para eliminar el exceso de suelo adherido a las estructuras. Posteriormente, fueron sembrados en placas con PDA, e incubados a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad (Menéndez y Godeas, 1995; Mónaco, 1990).

La selección de hongos antagonistas se realizó con aquellos microorganismos que inhibieron la germinación de los esclerocios y que se expresaron creciendo a partir de los esclerocios. Se seleccionaron principalmente hongos que la literatura reporta con potencial antagonista, la mayoría del género *Trichoderma*.

### 5.3.3. Técnica de pastelitos de suelo

Se realizaron cultivos puros de *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*, los cuales se incubaron hasta que cubrieron totalmente el medio PDA. Sobre el crecimiento del patógeno se colocaron varias gotas de suspensión de suelo, en la periferia de la caja Petri. Las gotas fueron lo suficientemente pequeñas para evitar que la suspensión bajara hasta el medio de cultivo, se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad hasta observar crecimiento

micelilar sobre el micelio de *Sclerotinia*. Esta metodología pretendió seleccionar únicamente los hongos capaces de alimentarse del patógeno y por lo tanto, asegurar su actividad como hiperparásito. La selección de los antagonistas se realizó con todos aquellos microorganismos que crecieron sobre el micelio del patógeno, y que causaran lisis del mismo.

#### **5.4. Interacción macroscópica de micoparasitismo**

Una vez obtenidos tanto el patógeno como los hongos antagonistas, se procedió a realizar las pruebas de antagonismo por cultivos duales (Rollan *et al.*, 1999). Para ello, las cepas se activaron en el medio PDA, mediante un disco de medio de cultivo de 0.5 cm conteniendo ya sea al patógeno o al antagonista. El disco del micelio del patógeno se colocó sobre el borde de la caja de cultivo y el disco conteniendo al potencial antagonista se colocó sobre el borde opuesto. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

Como testigos se utilizaron placas sembradas solo con los antagonistas, y *Sclerotinia sclerotiorum* o con *Sclerotinia minor*. La comprobación de los distintos mecanismos antagonistas se verificó de dos maneras: medición diaria del crecimiento de las colonias testigo y observación directa de la placa.

La descripción y agrupación de antagonistas se realizó conforme al grado de parasitismo categorizado mediante la descripción visual para ambos patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, en cultivos duales. Durante 10 días de interacción micelilar, del 0 al 4, donde:

0. Nulo, no presenta efecto antagonístico, en invasión o inhibición de crecimiento del micelio fitopatológico.
1. Bajo, presenta 1 a 37% de invasión micelilar, crecimiento lento y poco algodonosa sobre el micelio, poca esporulación sobre micelio.

2. Moderado, presenta 38 a 70% de invasión micelial, crecimiento lento y poco algodonoso sobre micelio y esclerocios de fitopatógeno, muestra formación de esclerocios como barrera, coloración de antagonista verde claro.

3. Bueno. 71-100% de invasión de micelio fitopatógeno en siete diez días, con crecimiento poco algodonoso, poca formación de montículo micelial sobre esclerocios, presenta ablandamiento de esclerocios, formación de un halo amarillo o café solo al encuentro de micelios. Coloración de antagonista verde intenso a verde olivo.

4. Excelente, presenta 100 % de invasión de micelio en menos de nueve días, con crecimiento excesivo sobre micelio y esclerocios del fitopatógeno, formando montículos, envolviendo y degradando los esclerocios con micelio algodonoso, el fitopatógeno presenta poca formación de esclerocios; coloración por esporulación verde intenso. Formación de un marcado halo amarillo o café al momento de encuentro e invasión de micelios.

#### **5.5. Micoparasitismo de *Trichoderma* sobre esclerocios**

Una vez culminado la evaluación de confrontación de cepas (antagonistas y patógenos), se seleccionaron placas al azar de cada uno de los ensayos, a las que se agregaran sobre el micelio, 10 mL de una solución de formaldehído al 10%, durante 4 h. Posteriormente, se extrajeron esclerocios, conforme fueron parasitados, esto es el momento de encuentro de micelio de *Trichoderma* con esclerocio. Se evaluó el daño a las estructuras de acuerdo al avance del micoparásito por las cepas antagonísticas, una prueba de dureza y observación de la degradación de esclerocios, mediante microscopio estereoscópico.

#### **5.6. Interacción microscópica del micoparasitismo**

Para observar las diferentes interacciones entre los antagonistas y sus hospederos, se utilizó la técnica de microcultivo de Riddell (modificado por Ferrera-Cerrato, 1977). Con un

sacabocados se cortaron pequeñas porciones de PDA de un centímetro de diámetro, cada disco fue puesto sobre un portaobjetos, inoculando el parásito y el hospedante en lados opuestos. Una vez inoculados se colocó un cubreobjetos sobre el disco de PDA inoculado, y se situaron sobre un tubo de vidrio en ángulo en el fondo de una caja petri estéril. Posteriormente, se agregaron 10 mL de una solución de glicerol al 10% para proveer humedad al sistema. Después de 4 a 5 días de incubación, a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, se retiró la solución de glicerol al 10%, y se agregó una solución de formaldehído al 10% durante dos horas. Las preparaciones se montaron en PVL+Melzer (ver Anexo), azul de algodón y lactofenol, lo que permitió conservar más tiempo las preparaciones para su evaluación y observación al microscopio. Se utilizaron tres microcultivos por cada antagonista elegido.

#### **5.6.1. Observación microscópica del micoparasitismo**

Las muestras se observaron en el microscopio de campo claro OLYMPUS BX51, tomando fotos digitales con una cámara Evolución VF, adaptada al microscopio.

#### **5.7. Preparación de inoculante biológico**

En forma natural los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutrimentales, estos, pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo, para lograr un máximo de crecimiento y esporulación. Tomando en cuenta que los requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelial o conidios, se utilizó la metodología desarrollada en el Área de Microbiología de suelos, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México (Lara y Ferrera-Cerrato, 2006. Comunicación personal).

Una vez seleccionados los microorganismos con mayor potencial antagonico a *S. sclerotiorum* y *S. minor*, se procedió a la elaboración de un inoculante, por cada cepa seleccionada.

### 5.7.1. Preparación de esporada

La preparación y obtención de la esporada se realizó a partir de granos de arroz. El cual se colocó en agua destilada por un lapso de 1 hora, al término de éste se escurrió durante 30 minutos. El arroz se colocó (50 g) en frascos conserveros, utilizando cuatro frascos por cepa seleccionada, los cuales fueron esterilizados a 18 lb durante 30 minutos. Una vez estériles y fríos, se inocularon con 2 mL de una suspensión de esporas que contenían  $5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> y se incubaron durante 20 días a temperatura ambiente (Lara y Ferrera-Cerrato, 2006, Comunicación personal).

### 5.7.2. Impregnación de inoculante con carbón vegetal como acarreador

Para la obtención del inoculante, se impregnó la esporada del antagonista, en frascos que contienen 50 g de carbón vegetal, realizando cuatro repeticiones por cepa. La esterilización del acarreador se realizó en seco a 180 C° durante 3 h, por 2 días. Una vez estéril, el acarreador, fue inoculado con 5 g de esporada con arroz por frasco, incubándose por 10 días a temperatura ambiente. Para la evaluación de la población obtenida en el inoculante, se empleo la técnica de dilución decimal mencionada por Ramírez-Gama (2000).

### 5.8. Evaluación del antagonismo hacia *S. sclerotiorum* y *S. minor* en lechuga

Se utilizo, fue *Lactuca sativa* L. var. Sun Devil, variedad de lechuga que es susceptible al ataque de *Sclerotinia sclerotiorum*. La siembra se realizó con semillas desinfectadas en una solución comercial de hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos y tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en charolas de 200 cavidades conteniendo en una mezcla de arena esterilizada, a 18 libras durante tres horas, en dos días consecutivos. Las charolas se instalaron en una cámara bioclimática, transplantando 30 días después, las plántulas en macetas de 250 g de capacidad, con un sustrato estéril constituido por arena y perlita (2:1.5 v/v).

La evaluación del efecto de los organismos antagonísticos sobre el control de *S. sclerotiorum* y *S. minor*, se instaló un experimento completamente al azar con 12 tratamientos y cinco repeticiones cada uno. Los cuales consistieron en dos patógenos *S. sclerotiorum* y *S. minor*, tres cepas antagonísticas de *Trichoderma* (IBA-4, IBA-38, IBA-56; ver nomenclatura de las claves en Apéndice 2). Como testigos se utilizaron por separado cada uno de los antagonistas, patógenos y un testigo absoluto (sin inocular), con las combinaciones mostradas en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Combinación de tratamientos para la evaluación antagonística de tres cepas de *Trichoderma* hacia dos patógenos fúngicos *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* en planta.

Tratamiento	Combinación de tratamiento	Tratamiento	Combinación de tratamiento
Tra-1	IBA-4 + Sm*	Tra-7	IBA-56 + Sm
Tra-2	IBA-4 + Ss	Tra-8	IBA-56 + Ss
Tra-3	IBA-4	Tra-9	IBA-56
Tra-4	IBA-38 + Sm	Tra-10	Testigo Sm
Tra-5	IBA-38 + Ss	Tra-11	Testigo Ss
Tra-6	IBA-38	Tra-12	Testigo absoluto

\*Ss: *Sclerotinia sclerotiorum*, Sm: *Sclerotinia minor*.

Se utilizaron plántulas de lechuga de 30 días de edad, que se trasplantaron en macetas de 250 g de capacidad conteniendo un sustrato de arena y perlita (2:1.5 v/v). El sustrato se esterilizó en calor húmedo durante tres horas por dos días. La inoculación, tanto de los patógenos como de los antagonistas, se realizó al momento del trasplante. En la inoculación respectiva de cada patógeno, se colocaron 10 esclerocios y cinco discos de 5 mm de diámetro cortados del margen de micelio de cuatro días de incubación a temperatura ambiente y transferida a la base y con el micelio posicionado contra el tallo de la planta. En el caso de *Trichoderma* se colocó 1 g de inóculo por unidad experimental según el tratamiento. Cada una de las plantas inoculadas, fueron cubiertas con bolsas de plástico durante el experimento (Garrabrandt *et al.*, 1983). Las plantas se

mantuvieron en cámara bioclimática con 12 h luz y 12 h oscuridad a una temperatura de  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , las cuales se regaron, cada dos a tres días. Semanalmente se fertilizaron con una solución nutritiva de NPK (Bayfolan<sup>(R)</sup>).

La evaluación se realizó diariamente de manera visual y su registro de manera porcentual en las plantas de lechuga, considerando la efectividad de control de las cepas de *Trichoderma*, con base en la escala subjetiva del 1 al 5, donde: 1) planta sana y/o trazas de la enfermedad (0-7% de daño); 2) planta levemente enferma con daño en hojas basales o lesiones superficiales de color café, redondas o irregulares (8-25% de daño); 3) planta enferma, hojas medias cloróticas, infección establecida, micelio superficial, abundante o escaso, tallo verde, turgente; el resto de las hojas verdes o cafés flácidas (26-40% de daño); 4) planta severamente enferma, toda la planta marchita, hojas color café o con algunas partes verdes, pero flácidas, micelio o esclerocios abundantes (41-70% de daño); y 5) planta muerta o con daños severos, hojas de color café con tallo colapsado (71-100% de daño).

El análisis estadístico, se empleó un diseño completamente al azar con 12 tratamientos y cinco repeticiones. Donde el modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau + E_{ij} \quad \begin{array}{l} i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 \\ j= 1, 2, 3, 4, 5 \end{array}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable respuesta en el  $i$ ésimo tratamiento de la  $j$ ésima repetición.

$\mu$  = media general

$\tau$  = efecto del  $i$ ésimo tratamiento

$E_{ij}$  = error aleatorio.

Los datos se analizaron mediante PROC GLM (SAS, 1998). La comparación de medias se hizo con el procedimiento de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento de microorganismos antagonísticos

#### 6.1.1. Técnica de diluciones

De las diferentes muestras de suelo se obtuvieron un total de 101 hongos utilizando el medio de cultivo PDA. De estas cepas, solamente el 6.9% mostraron inhibición, competencia y capacidad micoparásitica hacia a *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) y *S. minor* (Sm). Esta técnica fue eficiente para obtener bacterias en lugar de hongos, dado que favorece al crecimiento de cualquier organismo oportunista de rápido crecimiento. Esta técnica no proporcionó abundante cantidad de hongos antagonistas, ya que de las 14 muestras de suelo probadas, solamente se realizaron aislamientos efectivos en suelo de Jalisco (muestra MJ<sub>2</sub>) con un aislamiento (Cuadro 5), y suelo de Veracruz (muestra 11 2<sup>a</sup>) con seis aislamientos efectivos (Cuadro 6); de los cuales en pruebas preliminares ninguno fue capaz de competir contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.

**Cuadro 5.** Efecto *in vitro* contra *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum* de los aislamientos de hongos obtenidos por dilución en placa, a partir de suelo de Jalisco (MJ<sub>2</sub>).

Hongos	Velocidad de crecimiento	Sm	Antagonismo*	Ss
H1	Rápido	+		+
H2	Moderado	-		-
H3	Lento	-		-
H4	Rápido	-		-
H5	Rápido	-		-
H6	Rápido	-		-
H7	Moderado	-		-
H8	Moderado	-		-
H9	Rápido	-		-
H10	Rápido	-		-
H11	Rápido	-		-

\* Corresponde al nivel de antagonismo del patógeno. Rápido (3 días), Moderado (4 a 7 días), Lento (más de 8 días). Sm=*Sclerotinia minor* y Ss=*Sclerotinia sclerotiorum*. Interacción, positivo +, negativo -.



**Cuadro 6.** Efecto *in vitro* contra *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum* de los aislamientos de hongos obtenidos por dilución en placa, a partir de suelo de Veracruz (11 2<sup>a</sup>).

Hongo	Velocidad de crecimiento	Antagonismo*	
		Sm	Ss
H1	Rápido	+	+
H2	Lento	-	-
H3	Rápido	+	+
H4	Moderado	+	+
H5	Lento	-	-
H6	Rápido	+	+
H7	Moderado	+	+
H8	Rápido	+	+
H9	Lento	-	-
H10	Lento	-	-

\* Corresponde al nivel de antagonismo del patógeno. Rápido (3 días), Moderado (4 a 7 días), Lento (más de 8 días). Sm=*Sclerotinia minor* y Ss=*Sclerotinia sclerotiorum*. Interacción, positivo +, negativo -.

### 6.1.2. Técnica de cebo (esclerocios)

Mediante esta técnica, sólo se seleccionaron hongos del género *Trichoderma* debido a su constante incidencia sobre los esclerocios. Así, el 75% de los aislados fúngicos correspondieron a este grupo fúngico. En total, se aislaron 47 hongos de los cuales, 40 mostraron alta capacidad de competencia e inhibición de la germinación de esclerocios de Ss y Sm. Las muestras de suelos que destacaron con mayor cantidad de antagonistas fueron de Jalisco (muestra MJ<sub>2</sub>) con once aislamientos, suelo de Oaxaca (muestra 3PRI y 5B<sub>2</sub>) con siete y seis aislamientos respectivamente (Cuadro 7). Lo anterior denota la variabilidad en la presencia de microorganismos antagonistas en las muestras de suelo colectados y analizadas en este estudio. Cabe señalar que más del 51% de los aislamientos fueron obtenidos a partir de esclerocios de *Sclerotinia minor*, observándose que a medida que los esclerocios son de menor tamaño, éstos son más fáciles de ser destruidos por los antagonistas del suelo, como fue indicado por Mónaco (1990).

Los suelos forestales (Puebla 1 y Puebla 2) demostraron ser los de mayor reservorio bacteriano, puesto que los microorganismos bacterianos obtenidos de este tipo de suelo, fueron eficientes en invadir e inhibiendo la germinación de esclerocios enterrados.

**Cuadro 7.** Hongos del grupo *Trichoderma* obtenidos por técnica de cebo, a partir de esclerocios de *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Clave de aislamiento	Muestra Suelo	Cebo	Velocidad de crecimiento	Clave de aislamiento	Muestra de Suelo	Cebo	Velocidad de crecimiento
F1-H1	11 2 <sup>a</sup> 12	Sm	M	F4-H1	Loma 3	Ss	R
F1-H2	MJ <sub>2</sub>	Sm	R	F4-H2	Puebla 1	Ss	R
F1-H3	12 2 <sup>a</sup>	Sm	R	F4-H3	Loma3	Ss	R
F1-H4	3PRI	Ss	M	F5-H1	Chinampa	Ss	L
F1-H5	5B <sub>2</sub>	Sm	M	F5-H2	9B <sub>2</sub>	Sm	R
F1-H6	13 2 <sup>a</sup>	Ss	M	F5-H3	9B <sub>2</sub>	Ss	L
F1-H7	Loma 3	Sm	M	F5-H4	Chapingo	Sm	R
F1-H8	12 2 <sup>a</sup>	Ss	R	F5-H5	MJ <sub>2</sub>	Ss	R
F1-H9	13 2 <sup>a</sup>	Sm	R	F5-H6	MJ <sub>2</sub>	Sm	R
F2-H1	3PRI	Sm	R	F5-H7	3PRI	Sm	R
F2-H2	3PRI	Ss	R	F5-H8	13 2 <sup>a</sup>	Sm	R
F2-H3	MJ <sub>2</sub>	Sm	R	F5-H9	13 2 <sup>a</sup>	Ss	R
F2-H4	MJ <sub>2</sub>	Ss	R	F5-H10	Chinampa	Ss	R
F2-H5	11 2 <sup>a</sup>	Sm	R	F6-H1	Puebla 2	Sm	R
F3-H1	3PRI	Sm	R	F6-H2	MJ <sub>2</sub>	Sm	R
F3-H2	5B <sub>2</sub>	Sm	R	F6-H3	MJ <sub>2</sub>	Ss	R
F3-H3	5B <sub>2</sub>	Sm	R	F6-H4	9NTB <sub>1</sub>	Sm	R
F3-H4	MJ <sub>2</sub>	Sm	R	F6-H5	Pitayo	Ss	R
F3-H5	MJ <sub>2</sub>	Ss	R	F6-H6	11 2 <sup>a</sup>	Ss	R
F3-H6	MJ <sub>2</sub>	Sm	R	F6-H7	Chinampa	Ss	R
F3-H7	5B <sub>2</sub>	Sm	R	F6-H8	3PRI	Sm	R
F3-H8	3PRI	Ss	R	F6-H9	13 2 <sup>a</sup>	Sm	R
F3-H9	MJ <sub>2</sub>	Sm	R	F6-H10	13 2 <sup>a</sup>	Ss	R
F3-H10	5B <sub>2</sub>	Sm	R				

R=Rápido (menos de 3días), M=Moderado (4 a 7 días), L=Lento (más de 8 días). *Sclerotinia minor* (Sm) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss).

### 6.1.3. Técnica de pastelitos de suelo

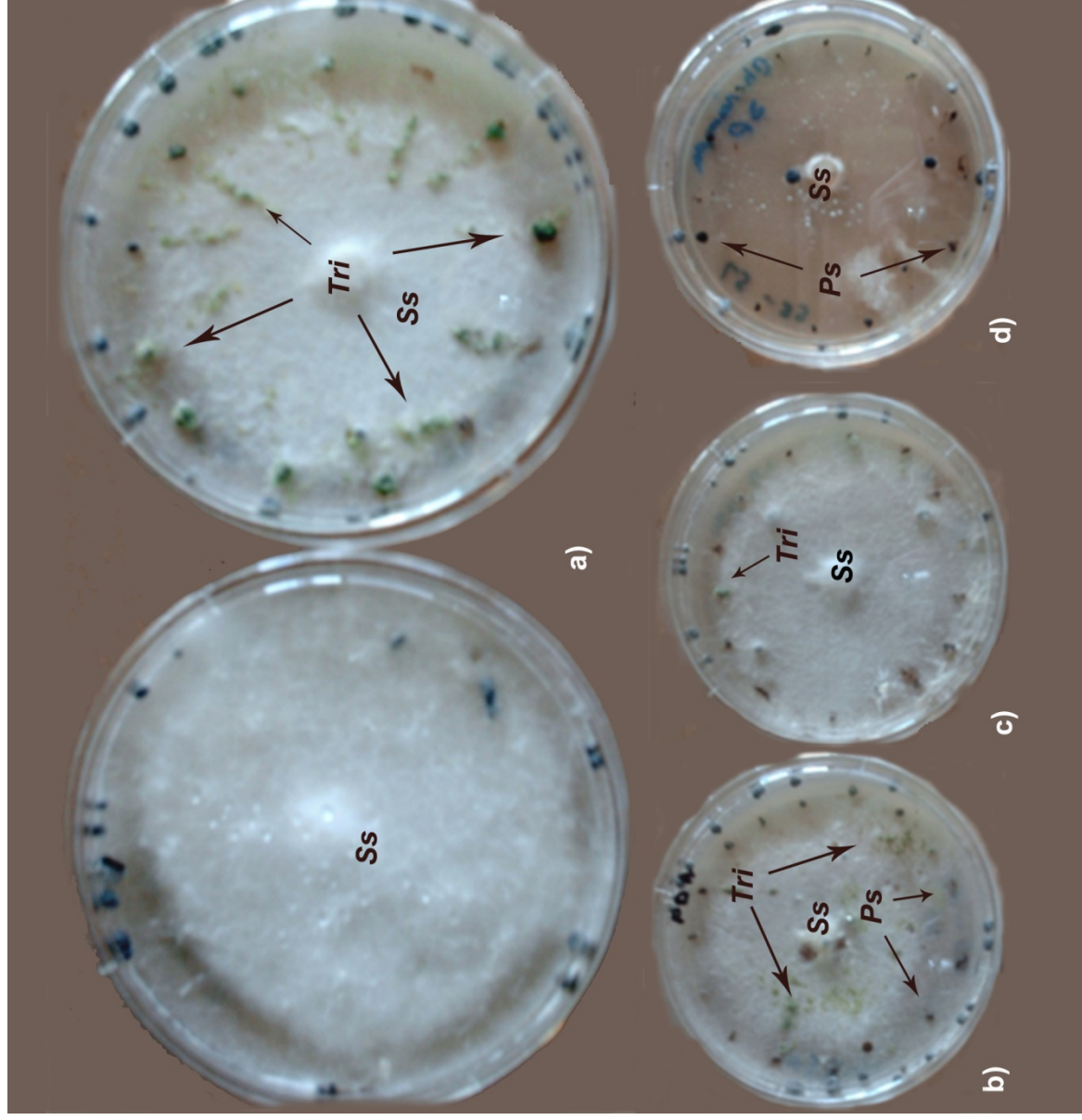
Esta técnica no mostró resultados en comparación con la cantidad aislados con la técnica de cebo, la presencia de micelio de *Sclerotinia* debería estimular el crecimiento de antagonistas especialmente del género *Trichoderma* para invadir micelio de ambos patógenos. Sin embargo, el

comportamiento mencionado solo fue observado en las muestras de suelo de Estado de México (Chinampa), Guanajuato (Pitayo), Jalisco (MJ<sub>2</sub>) y Veracruz (12 2<sup>a</sup>), y en las que únicamente fue posible realizar aislamientos sobre micelio de *Sclerotinia sclerotiorum*.

La figura 2, muestra el crecimiento de micelio antagonico sobre micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir de porciones de suelo inoculado. En la figura 2a se observa al testigo de *Sclerotinia sclerotiorum* (izquierda) y la inoculación con suelo de Guanajuato (muestra Pitayo derecha), en el cual se manifiesta el crecimiento de *Trichoderma* sobre el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum*. En la figura 2b, se aprecia la degradación de micelio por una bacteria micolítica para ambos micelios (*Sclerotinia* y *Trichoderma*). Sin embargo, en la figura 2c y 2d, el comportamiento de microorganismos fúngicos de *Trichoderma* sobre micelio de *Sclerotinia sclerotiorum*, es menor en comparación con la inoculación de la muestra de suelo Pitayo (Figura 2a). Mediante esta técnica se obtuvieron solamente cuatro aislados promisorios del género *Trichoderma*. Además se observó la presencia abundantes ácaros micofagos, lo que implico no continuar con esta metodología, ya que estos ácaros, representaron ser una fuente de contaminación para el resto de las técnicas que se realizaron simultáneamente. Por lo que se sugiere que para evitar la contaminación de ácaros y bacterias, realizar resiembras (ver Apéndice 1).

De los microorganismos aislados de suelo de chinampa, se aprecio un consorcio bacteriano con la propiedad de causar la lisis micelial, tanto para *Trichoderma* como para *Sclerotinia*. Este consorcio bacteriano se encontró asociado al hongo *Trichoderma*, a pesar de resiembras de micelio en medio PDA con dosis altas de antibiótico, sin embargo se aisló por separado bacterias de color amarillo traslucido, que presentaron morfología colonial con borde entero, forma circular, superficie lisa, elevación plana, sin embargo no se continuó debido que no se encuentra dentro de los objetivos planteados. Los antagonistas aislados de suelo de chinampa fueron los

más prometedores, por su crecimiento sobre el micelio; sin embargo, no fueron eficientes en parasitar esclerocios.



**Figura 2.** Técnica de pastelitos de suelo, a partir de cuatro suelos inoculados sobre micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) donde: a) Testigo de Ss (izquierda), crecimiento de *Trichoderma* a partir de muestra de suelo pitayo sobre el micelio de Ss (derecha), b) escaso crecimiento de *Trichoderma* de suelo MJ<sub>2</sub> sobre micelio de Ss, c) nulo crecimiento de *Trichoderma* de suelo 12<sup>a</sup> sobre micelio de Ss. d) crecimiento bacteriano sobre micelio de *Trichoderma* y Ss inoculado por suelo de Chinampa. *Tri*=*Trichoderma*, *Ps*= pastelito de suelo, *Ss*=*Sclerotinia sclerotiorum*.

Además se aislaron algunas cepas de *Fusarium* y *Penicillium* que mostraron antagonismo hacia ambas especies de *Sclerotinia*, como ha sido mencionado por Chaube *et al.* (2003). Sin embargo, estas cepas fueron eliminadas, debido a que estos hongos son potenciales patógenos para otros cultivos (Agrios, 2005). Algunas especies de *Penicillium* pueden ocasionar importantes problemas en postcosecha (Molina *et al.*, 2006).

De las 71 cepas de *Trichoderma* aisladas, independientemente de la técnica de aislamiento, se encontró que la muestra de suelo con mayor número de aislamientos fue de Jalisco (MJ<sub>2</sub>) donde la vegetación predominante es el mezquite (*Prosopis laevigata*). De esta muestra de suelo se obtuvieron 18 aislados de *Trichoderma*.

La aplicación de diversos métodos para la selección de antagonistas a *Sclerotinia* ha representado ser una confiable indicación de la actividad supresiva de los organismos en condiciones de campo (Molina *et al.*, 2006). La mejor técnica de aislamiento de antagonistas resultó ser la de cebo con esclerocios, ya que con ella se logró aislar más del 80% de los hongos del grupo *Trichoderma*, evaluados en este ensayo. Además, mediante esta técnica se obtuvieron antagonistas específicos para el tipo de patógeno a controlar.

El ambiente predominante influye en la interacción parasitaria, ya que rige la conducta tanto del hospedante como del parásito. Algunos aspectos importantes que se deben tomar en cuenta, es el metabolismo del carbono y del nitrógeno y el pH, los cuales tienen un papel importante en el micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004). El carbono y nitrógeno lo obtienen las cepas antagonistas, tras la hidrólisis de polímeros de alto peso molecular (como celulosa, hemicelulosa o pectina) presentes en las paredes celulares de restos vegetales, o de compuestos como quitina o glucano presentes en las paredes de los hongos atacados (Benítez *et al.*, 2006; Julca-Otiniano *et al.*, 2006; Benítez *et al.*, 2004). Con base en la capacidad de utilizar diversos

polisacáridos como glucosa, fructosa, celulosa, almidón o quitina, es posible aislar microorganismos específicos dirigidos al control de otros microorganismos fitopatógenos.

Las poblaciones fungosas predominan en suelos ricos en restos vegetales, donde la competencia por alimentos y energía no son demasiado agudas, y estas declinan rápidamente cuando disminuyen los materiales fácilmente degradables (Julca-Otiniano *et al.*, 2006). Sin embargo, una de sus cualidades del género *Trichoderma* es sobrevivir bajo condiciones extremas, debido a que resisten muchos compuestos tóxicos, incluyendo herbicidas, fungicidas, e insecticidas como el DDT, y compuestos fenólicos (Benítez *et al.*, 2004). Además, tienen excelente competitividad en sustratos muy pobres en nutrientes, ya que cuentan con una capacidad de tomarlos y movilizarlos en comparación con otros organismos (Benítez *et al.*, 2004; Brozová, 2004; Howell, 2003). Por otra parte, tiene la capacidad de generar ATP a través del metabolismo de diversos compuestos de carbono como polisacáridos, o de polímeros como celulosa, glucanas y quitina, entre otros, con el fin de generar glucosa (Benítez *et al.*, 2004; Benítez *et al.*, 2006).

## **6.2. Interacción macroscópica de micoparasitismo**

La selección de los hongos del género *Trichoderma* para la interacción micoparasítica, se realizó de acuerdo con su constante aislamiento, y por su velocidad de crecimiento micelial. De esta forma, se probaron 71 cepas de hongos *Trichoderma*, que se evaluaron simultáneamente.

La interacción macroscópica de la relación entre micoparasitos *Trichoderma* y sus hospedantes *Sclerotium* y *Sclerotinia minor*, se manifestó en principio, cuando el micelio de *Trichoderma* eran capaces de detener el de su hospedante, durante el cual se forma una zona de micelio en forma de barrera, que retarda el crecimiento del parásito. El tamaño de esclerocios y la formación de la barrera dependieron del ataque de cada *Trichoderma* confrontado y del hospedante parasitado. Posteriormente a la detención del crecimiento, se presento una banda

amarillenta o café que se difunde en el medio, proveniente de las hifas atacadas; este tipo de reacción y con ello competir eficientemente por espacio y nutriente. Ferrera-Cerrato (1977) describe este tipo de reacción es frecuente en la interacción de un basidiomiceto hiperparasito (clave BsUF) y *Trichoderma viride*. Así mismo Villegas y Castaño (1999) describieron que en cultivos duales de *Trichoderma* y *Phytophthora cactorum*, según su procedencia, la especie de *Trichoderma* puede presentar diferencias en el patrón de esporulación y coloración de micelio, así también, mostrar variación en la coloración del medio de cultivo. El crecimiento del antagonista continuó a pesar de las barreras físicas, hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno e incluso, esporulando sobre *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Finalmente se observó una reducción en la densidad de micelio de la colonia patógena.

*Sclerotinia minor* mostró menor resistencia, permitiendo que los micoparásitos *Trichoderma* crecieran sobre el micelio y esclerocios (Figura 3). La mayoría de los hongos probados presentaron una conducta similar al colonizar y esporular sobre ambas estructuras del patógeno.

En la figura 3 se muestra el ensayo de antagonismo macroscópico de la interacción de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, frente a las cepas de *Trichoderma*, IBA-4, IBA-38 e IBA-56. Se observa que las cepas de *Trichoderma* aumentan la actividad antifúngica por encima limitando el crecimiento del patógeno, así como parasitando a sus esclerocios. De este modo, *Trichoderma* inhibió la expansión de *Sclerotinia* al crecer sobre su micelio, en un tiempo de ocho a diez días. Este efecto se puede atribuir a la capacidad hiperparasítica y a la liberación de la enzima hidrolítica  $\beta$ -1,3-glucanasa esto debido a la composición interna de los esclerocios y o pared celular del micelio (Ezziyani *et al.*, 2004; Benítez *et al.*, 2004, Bolton *et al.*, 2006). Lo anterior permite inferir que la actividad enzimática en combinación con el micoparasitismo, juega

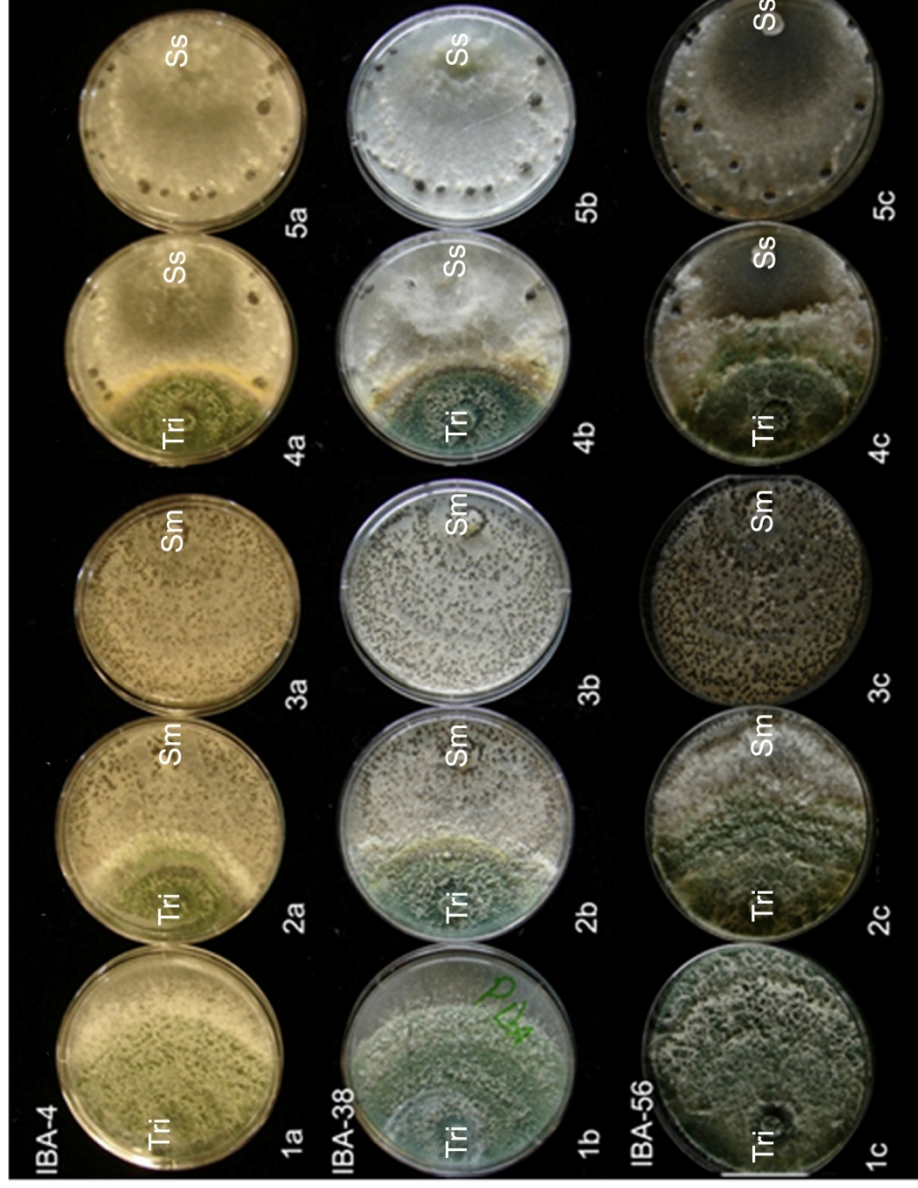
un papel importante en la inhibición y destrucción de la colonia de ambos patógenos, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*.

En los cultivos duales, el comportamiento de las cepas de *Trichoderma*, muestra en primer lugar una zona de inhibición progresiva, en parte por la mayor velocidad de crecimiento de *Trichoderma*. Después aparece un marcado efecto hiperparasítico, que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial del patógeno, no solo por competir por el mismo sustrato sino también por efecto de los antibióticos y enzimas que suelen producirse: ( $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) y cuya actividad se relaciona con la degradación de la pared celular del hospedante durante el micoparasitismo (Ezziyyani, 2004; Herrera *et al.*, 1999; Lorito *et al.*, 1993; Adams y Ayers, 1983; Papavizas y Lumsden, 1980).

De los 71 hongos parásitos probados, solo 59 fueron aptos para parasitar *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*, en diferentes grados evaluados de 0 a 4 (véase sección 5.4), exceptuando las cepas IBA-24, IBA-27, IBA-39, IBA-40, IBA-48, IBA-50, IBA-52, IBA-57, IBA 58, IBA-59, IBA-60, IBA-66, que no presentan efecto antagonico. Lo anterior se puede atribuir a que durante la etapa de aislamiento, ya que se observó que algunos esclerocios se encontraban colonizados por bacterias y *Trichoderma* al mismo tiempo lo que provocó el debilitamiento del esclerocio. Lo que pudo ser aprovechado por los *Trichoderma* antagonistas para colonizar los esclerocios, razón por la que no compiten en la interacción de cultivos duales y se descartaron para las fases subsecuentes (Granados y Wang, 2005).

La observación macroscópica de las colonias fúngicas antagonicas confrontadas, denotó un crecimiento lento sobre el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*, en la interacción con las cepas de *Trichoderma* en el nivel de parasitismo 1. Sin embargo, en el grado 1, ninguna de las cepas de *Trichoderma* colonizó a los patógenos al 100%.





**Figura 3** Observación macroscópica de la interacción de las cepas IBA-4, IBA-38 e IBA-56, se muestra el crecimiento micelial sobre *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*. Donde: Tri, *Trichoderma*; Sm, *Sclerotinia minor*, y Ss, *Sclerotinia sclerotiorum*. Series 1a-c= Testigos de las cepas de *Trichoderma*, Series 2a-c= interacción *Trichoderma*-Sm, Series 3a-c) Testigo de Sm, Series 4a-c) Interacción *Trichoderma*-Ss, y Series 5a-c) Testigo de Ss.

Así mismo, de las 71 cepas de *Trichoderma* confrontadas, solo se seleccionaron las diez mejores, y que presentaron grado 4 de micoparasitismo (Cuadro 8), según el grado de parasitismo antes descritos (véase sección 5.4) y por el porcentaje de invasión micelial del antagonista (Figura 7). El comportamiento de las cepas del grado 4 son consideradas las más agresivas, al tener un acelerado crecimiento y esporulación sobre los dos fitopatógenos evaluados. En la figura 7 se muestra el tiempo de colonización que tardan las cepas de *Trichoderma* grado 4 en crecer

sobre micelio y esclerocios de *Sclerotinia minor* (Figura 4a) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 4b).

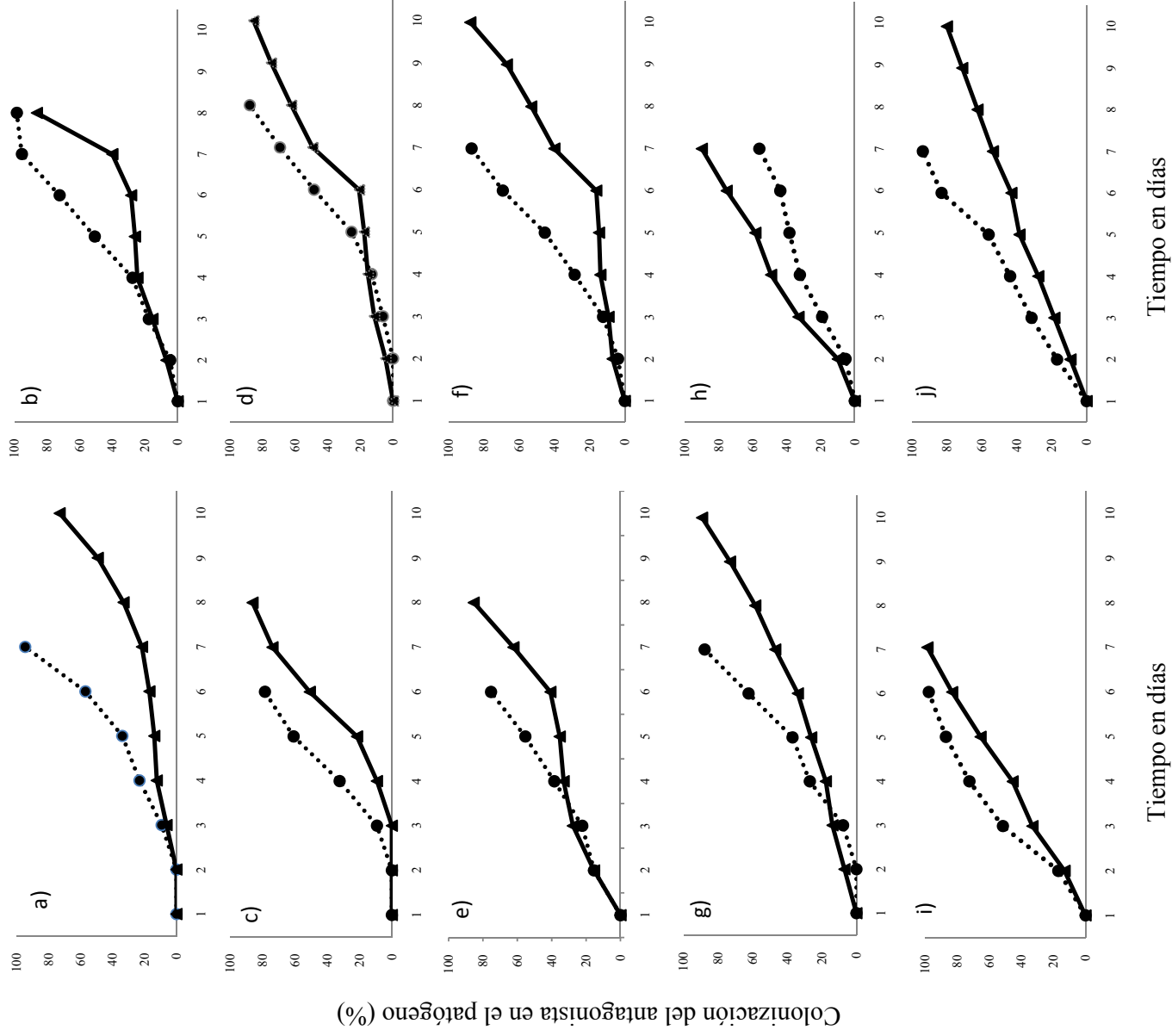
En relación a *Sclerotinia minor* la colonización de los hongos *Trichoderma* fue efectiva sobre los patógenos, observándose que la cepa IBA-54 colonizó a *S. minor* al séptimo día seguido de las cepas IBA-1, IBA-4, IBA-3, IBA-37, IBA-56 al octavo día, cepas IBA-38, IBA-23, IBA-22, en el noveno día y por ultimo al decimo día la cepa IBA-46. Sin embargo las cepas que alcanzaron el 100% de colonización en relación con *Sclerotinia sclerotiorum*, el orden fue el siguiente: IBA-46 e IBA-54 al séptimo día, IBA-4 e IBA-23 al decimo día y las cepas IBA-1, IBA-3, IBA-22, IBA-37, IBA-38, e IBA-56. El aislado que colonizó en menor tiempo a ambos patógenos fue IBA-54, seguido de IBA-4. Sin embargo, el aislamiento IBA-46 se comportó diferente ante ambos patógenos, ya que en *Sclerotinia sclerotiorum* fue más rápido en colonizar en comparación con *Sclerotinia minor*. Sin embargo, las diez cepas confrontadas parasitaron el 100% del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y de *Sclerotinia minor*. Por lo que se pueden utilizar las diez cepas evaluadas para la producción de inoculante.

El ensayo *in vitro*, ratificó la efectividad de los agentes antagonicos en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*. Los antagonistas al reducir la colonización y la producción de esclerocios en estas condiciones, permiten predecir que poseen rápida colonización y germinación e inician la actividad antagonica oportunamente (Molina *et al.*, 2006).

**Cuadro 8.** Agrupación de cepas antagonicas del género *Trichoderma* de acuerdo con la descripción visual de grado de parasitismo en ambos aislados de *Sclerotinia*, y origen del aislamiento (ver nomenclatura de las claves en Apéndice 2).

<b>Grado de micoparasitismo macroscópico</b>	<b>Cepa Estado de origen</b>
4	<b>IBA-1, IBA-4, IBA-23, IBA-38, IBA-56</b> (Jalisco); <b>IBA-46, IBA-54</b> (Guanajuato); <b>IBA-22</b> (Oaxaca); <b>IBA-3, IBA-37</b> (Veracruz).
3	IBA-55, IBA-63, IBA-67 (Estado de México); IBA-33 (Jalisco); IBA-35, IBA-47, IBA-53, IBA-69 (Guanajuato); IBA-65, IBA-61, IBA-41 (Oaxaca); IBA-5, IBA-17, IBA-30, IBA-32 (Veracruz).
2	IBA-28 (Estado de México); IBA-9; IBA-13, IBA-18, IBA-25, IBA-44 (Jalisco); IBA-7, IBA-10, IBA-14, IBA-15, IBA-21, IBA-26, IBA-36, IBA-42, IBA-43, IBA-70, IBA-71 (Oaxaca); IBA-2, IBA-6, IBA-29, IBA-34 (Veracruz).
1	IBA-12, (Jalisco); IBA-20, IBA-45 (Guanajuato); IBA-11, IBA-19, IBA-31, IBA-62, IBA-64, IBA-68 (Oaxaca); IBA-8, IBA-16, IBA-49, IBA-51, (Veracruz).
0	IBA-27, IBA-39 (Estado de México); IBA-24, IBA-57, IBA-58, IBA-59, IBA-60, IBA-66 (Jalisco); IBA-40, (Oaxaca); IBA-48, IBA-50, IBA-52, (Veracruz).

\*En negritas se indican las diez mejores cepas que fueron consideradas en la siguiente fase experimental de este estudio.



**Figura 4.** Porcentaje de colonización en el proceso de micoparasitismo *in vitro* de las cepas de *Trichoderma*: a) IBA-1, b) IBA-3, c) IBA-4, d) IBA-22, e) IBA-23, f) IBA37, g) IBA-8, h) IBA-46, i) IBA-54, y la j) IBA-56, Sobre micelio patógeno. *Sclerotinia sclerotiorum* (▲), *Sclerotinia minor* (●).

### 6.3. Preparación de esclerocios micoparasitados de cultivos duales

Al contacto de las hifas de la cepa antagonista, *Sclerotinia* nulificó su crecimiento, dando lugar a la formación de esclerocios en la periferia de su micelio. Así mismo, se observó un desarrollo irregular en algunos esclerocios, formando pocos, de gran tamaño y/o deformes. Aun cuando los esclerocios fueron parasitados al 100%, no todos mostraron un micoparasitismo necrotrófico. Con base en lo anterior, las estructuras de los esclerocios presentaron una estructura dura, hueca, blanda y/o desintegrada por efecto de los hongos antagonistas.

De las 10 mejores cepas, se analizó su capacidad de parasitar los esclerocios, la cual al igual que en el micelio, las cepas presentaron variaciones en su grado de parasitismo en estas estructuras. Los esclerocios presentaron desde daños superficiales hasta su desintegración total. En el cuadro 9 se muestra el grado de parasitismo de las cepas utilizadas, sobre los esclerocios conforme al avance del hiperparásito. Los resultados muestran la capacidad de degradación de esclerocios al momento del encuentro con respecto al tiempo (7 a 8 días) que tardó en invadir totalmente el micelio de la caja petri. Las mejores cepas para micoparasitar esclerocios fueron IBA-3, IBA-4, IBA-23 para *Sclerotinia minor*, y las cepas IBA-23, IBA-46, e IBA-54 para *Sclerotinia sclerotiorum*.

El análisis se realizó conforme los esclerocios fueron parasitados por las cepas de *Trichoderma*, existiendo diferencias significativas en la degradación al momento de la invasión por los antagonistas ( $P \leq 0.01$ ). Con base en la escala utilizada, la mejor degradación de los esclerocios correspondió al valor 4, en la que se observó la degradación total de estas estructuras. Las cepas de *Trichoderma* que degradaron con mayor eficiencia fueron IBA-4, IBA-3 para *Sclerotinia sclerotiorum*. Sin embargo, IBA-23 destacó al final, ya que el segundo y tercer esclerocio (con respecto a su posición frente al antagonista) presentaron estructuras muy degradadas, para ambos patógenos.

**Cuadro 9.** Grado de parasitismo de cepas de *Trichoderma* observado sobre esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor*, conforme a la posición de los esclerocios en los cultivos duales.

Clave	Esclerocios posición 1		Esclerocios posición 2		Esclerocios posición 3	
	Sm	Ss	Sm	Ss	Sm	Ss
IBA-1	3.0 b	2.0 c	3.0 b	1.0 d	3.0 abc	1.0 d
IBA-3	4.0 a	2.0 c	4.0 a	1.0 d	4.0 a	1.0 d
IBA-4	4.0 a	3.0 b	4.0 a	2.0 c	4.0 a	1.5 cd
IBA-22	4.0 a	2.0 c	3.0 b	1.0 d	3.0 abc	1.0 d
IBA-23	3.0 b	3.0 b	4.0 a	4.0 a	4.0 a	4.0 a
IBA-37	3.0 b	2.0 c	2.0 c	1.0 d	2.0 bcd	1.0 d
IBA-38	2.0 c	2.0 c	2.0 c	2.0 c	2.0 bcd	2.0 bcd
IBA-46	3.0 b	3.0 b	3.0 b	2.0 c	3.5 ab	1.0 d
IBA-54	3.0 b	3.0 b	3.0 b	3.0 b	3.0 abc	3.0 abc
IBA-56	4.0 a	2.0 c	3.0 b	1.0 d	2.0 bcd	1.0 d

La clave indica la cepa y el patógeno que fueron confrontados Ss=*Sclerotinia sclerotiorum*,

Sm=*Sclerotinia minor*. \*Nota: grado de parasitismo de los esclerocios donde: 1=duro, 2=blando, 3=hueco y 4=desintegrado. Medias con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). n=3.

De acuerdo a la descripción visual del daño y de la dureza de los esclerocios durante el micoparasitismo, se determinó que el efecto de los micoparasitos en *Sclerotinia minor* difiere drásticamente de aquel observado para *Sclerotinia sclerotiorum*, al inducir la deformación y la degradación de la estructura de los esclerocios. La mayor desintegración se observó en los esclerocios que estaban en la primera y en la segunda posición, con respecto al ataque del micoparásito. Esto es, que aquellos esclerocios que tuvieron mayor exposición al micoparásito, presentaron mayor daño. Las cepas que degradaron por completo los esclerocios fueron IBA-3, IBA-4, e IBA-23 (Figura 8). Las cepas que produjeron estructuras huecas en los esclerocios en sus tres posiciones fueron IBA-1 e IBA-46 (Figura 9). Sin embargo, las cepas IBA-38, IBA-37, provocaron el ablandamiento de las estructuras de los esclerocios (Figura 9). En contraste, los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Figuras 10 y 11), presentaron variaciones al ataque de los micoparásitos, los cuales produjeron malformaciones en su estructura típica redondeada. Las cepas IBA-1, IBA-22, e IBA-38 indujeron mayor crecimiento de los esclerocios respecto al testigo (Figura 10), sin producir la

degradación total de los esclerocios (Cuadro 9). En las cepas IBA-3, IBA-54 e IBA-56, el tamaño de los esclerocios fue menor en comparación al testigo (Figura 10 y figura 11). Los esclerocios que presentaron el mayor grado de degradación de *Sclerotinia sclerotiorum* correspondieron a estructuras huecas por efecto de las cepas IBA-23 e IBA-54 (Figura 10). La cepa IBA-38 produjo estructuras blandas en los esclerocios (Figura 11), observándose mayor daño en aquellos que estuvieron mayor tiempo en contacto con los micoparásitos, especialmente en las cepas IBA-4 e IBA-23 (Figura 10).

Es importante destacar que algunos esclerocios mostraron estrías en la superficie, lo cual es causado por el vaciamiento de la médula esclerocial, causando el colapso de la pared celular melanizada del esclerocio. Sin embargo, algunos esclerocios de *Sclerotinia minor*, perdieron totalmente su médula y capa melanizada, mostrando estructuras con poca elevación ante la cepa IBA-23 (Figura 8). La diferencia de grados de parasitismo, resultó de acuerdo a la virulencia del parásito y la susceptibilidad del hospedante.

Adams y Ayers (1983) describieron varias fases en la degradación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, por efecto de los micoparásitos *Sporidesmium sclerotivorum* y *Teratosperma oligocladium*. Las macroconidias de *S. sclerotivorum* y *T. oligocladium* germinaron sobre la superficie de los esclerocios en 3 a 5 días, reduciendo la pigmentación, dejando ver la médula del esclerocio de los patógenos. Una vez encontrada la superficie, las hifas de los antagonistas penetraron y formaron una abundante masa micelial negra (color característico de *Sporidesmium*). Sin embargo, durante la colonización intercelular, una hifa crece en la superficie externa formando brazos (apresorios) que penetran varios puntos de la superficie traspasando dos a tres células de la corteza. Esto explica los resultados observados con las cepas de *Trichoderma*, las cuales provocaron que los esclerocios presentaran estructuras huecas y con fisuras.

Mónaco (1990) y Adams y Ayers (1983) mencionan que los esclerocios pequeños son más fácilmente destruidos por los antagonistas que aquellos de mayor tamaño. Aun cuando el micelio de *Trichoderma* creció sobre y a través de la corteza de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, no parece haber un claro daño en su cubierta, la cual actúa como una barrera. Sin embargo, el interior de los esclerocios fue totalmente degradado.

Cuando el micelio de *T. harzianum*, crece en presencia de glucosa como única fuente del carbono, y se transfiere a un medio fresco que contiene paredes celulares de *Botrytis cinerea*, se forman las enzimas quitinasa,  $\beta$ -1,3,-glucanasa y proteasa. La formación paralela de enzimas hidrolíticas y antibióticos puede tener un papel importante en la acción antagonista de *T. harzianum* contra fitopatógenos fúngicos (Schirmböck *et al.*, 1994).

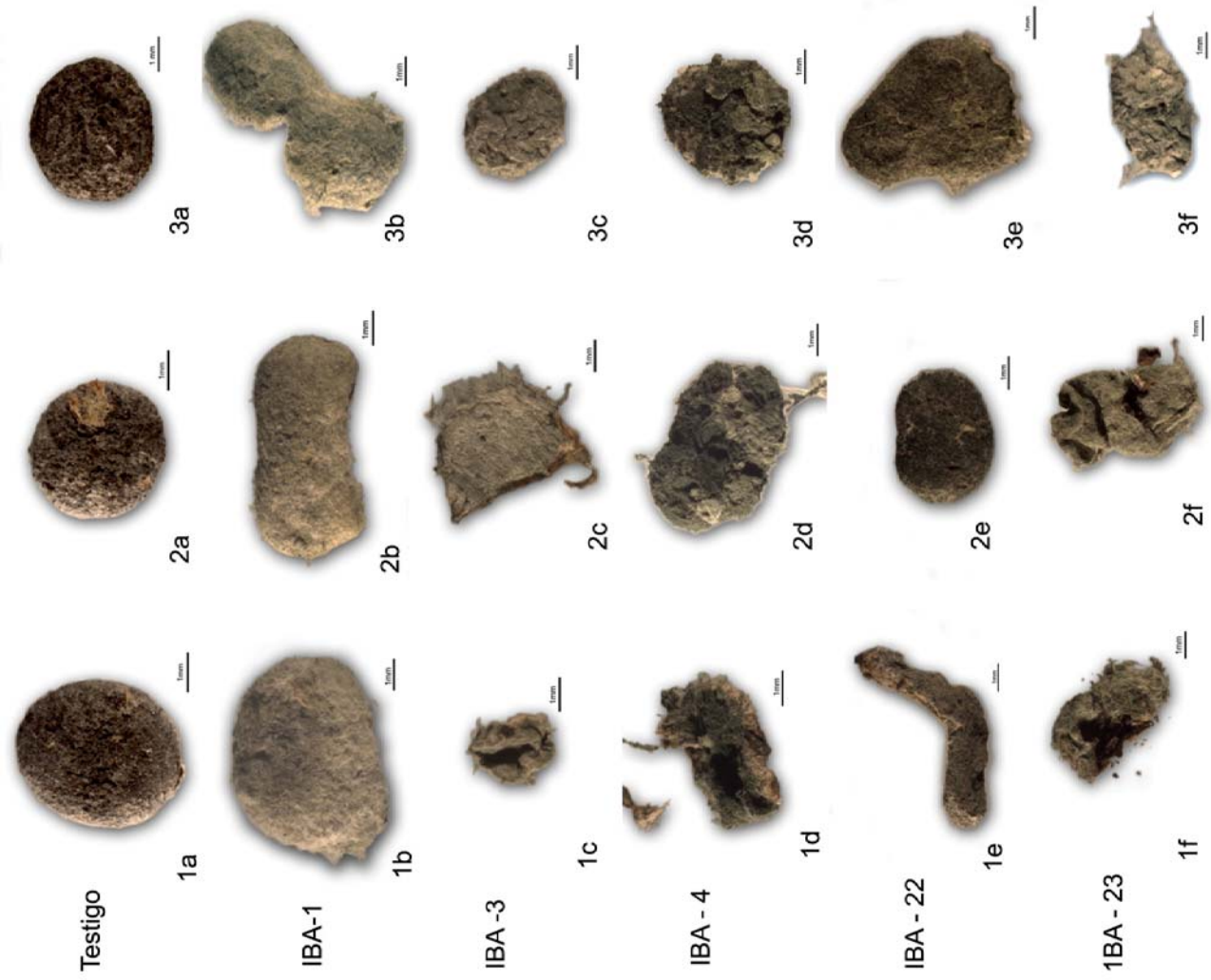




**Figura 5.** Micoparasitismo de esclerocios de *Sclerotinia minor* Jagger (Sm) por cepas de *Trichoderma* donde: a) Testigo, b) IBA-1, c) IBA-3, d) IBA-4, e) IBA-22 y f) IBA-23. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de *Sclerotinia minor*. Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro miceliar.



**Figura 6.** Micoparasitismo de esclerocios de *Sclerotinia minor* Jagger (Sm) por cepas de *Trichoderma* donde: a) Testigo, b) IBA-37, c) IBA-38, d) IBA-46, e) IBA-54 y f) IBA-56. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de *Sclerotinia minor*. Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro miceliar.



**Figura 7.** Micoparasitismo de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Ss) por cepas de *Trichoderma* donde: a) Testigo, b) IBA-1, c) IBA-3, d) IBA-4, e) IBA-22 y f) IBA-23. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de *Sclerotinia sclerotiorum*. Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro miceliar.



**Figura 8.** Micoparasitismo de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Ss) por cepas de *Trichoderma* donde: a) Testigo, b) IBA-37, c) IBA-38, d) IBA-46, e) IBA-54 y f) IBA-56. La numeración refiere a la posición de los esclerocios al momento de encuentro con el micelio del antagonista en cultivos duales, después de invadir la colonia de *Sclerotinia sclerotiorum*. Tiempo de invasión de ocho a diez días a partir del encuentro miceliar.

El micoparasitismo de *T. harzianum* es un proceso complejo, en el cual se ha observado un crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma* hacia su hospedante, formando un

enrollamiento de las hifas alrededor del mismo, y formando estructuras similares a los apresorios, para iniciar la penetración del micelio y finalmente lizarlo (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1976; Dwivedi y Shukla, 2002).

En respuesta a la invasión, el hongo hospedante produce una matriz, la cual encapsula la hifa que penetra, y las células del patógeno vacían su contenido citoplasmático. Después de la penetración, *T. harzianum* produce nuevas enzimas extracelulares como lipasas y proteasas. La hifa del hospedante micoparasitado muestra una rápida vacuolación, colapso y desintegración (Ocampo *et al.*, 2001).

Bolton *et al.* (2006) describen que la porción interna de los esclerocios es una matriz fibrilar y que está compuesto de hidratos de carbono, principalmente  $\beta$ -glucan y proteínas, por lo que la degradación interna de los esclerocios, puede ser en gran parte por la producción de  $\beta$ -glucanasas por parte de los antagonistas del género *Trichoderma*. Lo que responde el por qué primero ocurre la degradación interna de los esclerocios, causando el colapso, agrietamiento y huecos en las estructuras de los mismos.

Por consiguiente, la oportunidad de germinar del esclerocio, es anulada por el antagonista. Estos daños se muestran claramente en las figuras 5-8, donde se muestran tres esclerocios micoparasitados por las cepas de *Trichoderma* en comparación con la uniformidad y la consistencia de los esclerocios no parasitados (Testigo). Dos Santos y Dhingra (1980), mostraron que dos aislados de *Trichoderma koningii*, tk-2 y tk-5 eliminaron esclerocios en un 100%, al crecer dentro de ellos. Sin embargo, ellos relacionan la eficiencia de antagonismo a la concentración de inóculo, al antagonista utilizado y el tiempo en periodo de incubación. Así, mayor número de esclerocios pueden ser eliminados en menor tiempo, cuando se aplican altas concentraciones de conidias de los antagonistas.

En el caso de la actividad enzimática, se ha mostrado que la enzima  $\beta$ -1,3-gucanasa inhibe la germinación de esporas, en combinación sinérgica con quitinasas y liberación de

antibióticos (Benítez *et al.*, 2004). Las 1,3- $\beta$ -glucanasas procedentes de *Trichoderma viride*, tienen una fuerte actividad lítica sobre paredes celulares de *Sclerotinia sclerotiorum* (Jones *et al.*, 1974; Dos Santos y Dhingra, 1980). En otro estudio, las cepas de *Trichoderma*, fueron capaces de reducir la producción de esclerocios en los ensayos *in vitro*, indicando el potencial de estos antagonistas para reducir la enfermedad en condiciones controladas (Molina *et al.*, 2006).

Por su parte, Herrera (2005) constató que la presencia de enzimas líticas (carboximetilcelulasa, quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa), producidas por *Trichoderma harzianum*, causan a nivel celular, la vacuolación, la granulación, la coagulación, la desintegración y su lisis (Herrera, 2005). Las especies de *Trichoderma* también son caracterizadas por la producción de antibiótico peptídico. La actividad de la enzima glucana-sintetasa en las membranas plasmáticas de *Botrytis cinerea*, fue inhibida por los metabolitos trichorzianin A y B liberados por *T. harzianum* (Ritieni *et al.*, 1997).

#### **6.4. Interacción microscópica del micoparasitismo**

El ataque de los diez parásitos seleccionados, mostraron diferentes formas de micoparasitismo en el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Se consideró la observación microscópica cuando se formó una pequeña zona inhibitoria del crecimiento del parásito, así como la presencia de una banda oscura que proviene de las hifas atacadas. Inicialmente este antagonismo fue de pre-contacto o tropismo, y poco después se presentó una invasión rápida sobre el hospedante y con ello, estableciéndose el micoparasitismo. Este proceso se llevó a cabo durante cinco días, en los que se observó una etapa de invasión del micelio de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Lo anterior denotó que el primer mecanismo en este proceso fue el parasitismo y posteriormente, se expresó la secreción de metabolitos y enzimas líticas, en las diez cepas probadas.

El modo de parasitismo fue similar en todas las cepas antagonicas, aunque cada uno de los micoparásitos presentó algunas modalidades diferentes. En general, el modo de parasitismo fue de crecimiento hifal adosado sobre el hospedante y la reacción de éste en la mayoría de los casos, fue la vacuolación y la granulación citoplasmática.

El parásito IBA-4 presentó un mecanismo similar para *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, en el que las hifas de *Trichoderma* crecieron adosadas al micelio. En el caso de *S. minor* la cepa IBA-4 mostró enrollamiento en sus. En contraste, esta misma cepa provocó granulación, enrollamiento y vacuolación de la hifa de *S. sclerotiorum* (Figura 9).

El parasitismo por IBA-38 presentó un acoplamiento en la hifa de *S. sclerotiorum*, resultando en su granulación, posiblemente por una actividad micolítica. Con respecto al comportamiento sobre *S. minor* además de un crecimiento adosado a la hifa del hospedante, se observó la estimulación del crecimiento de la cepa antagonica, formando ramificaciones y creciendo paralelo a la hifa del hospedante sin penetrarla (Figura 10).

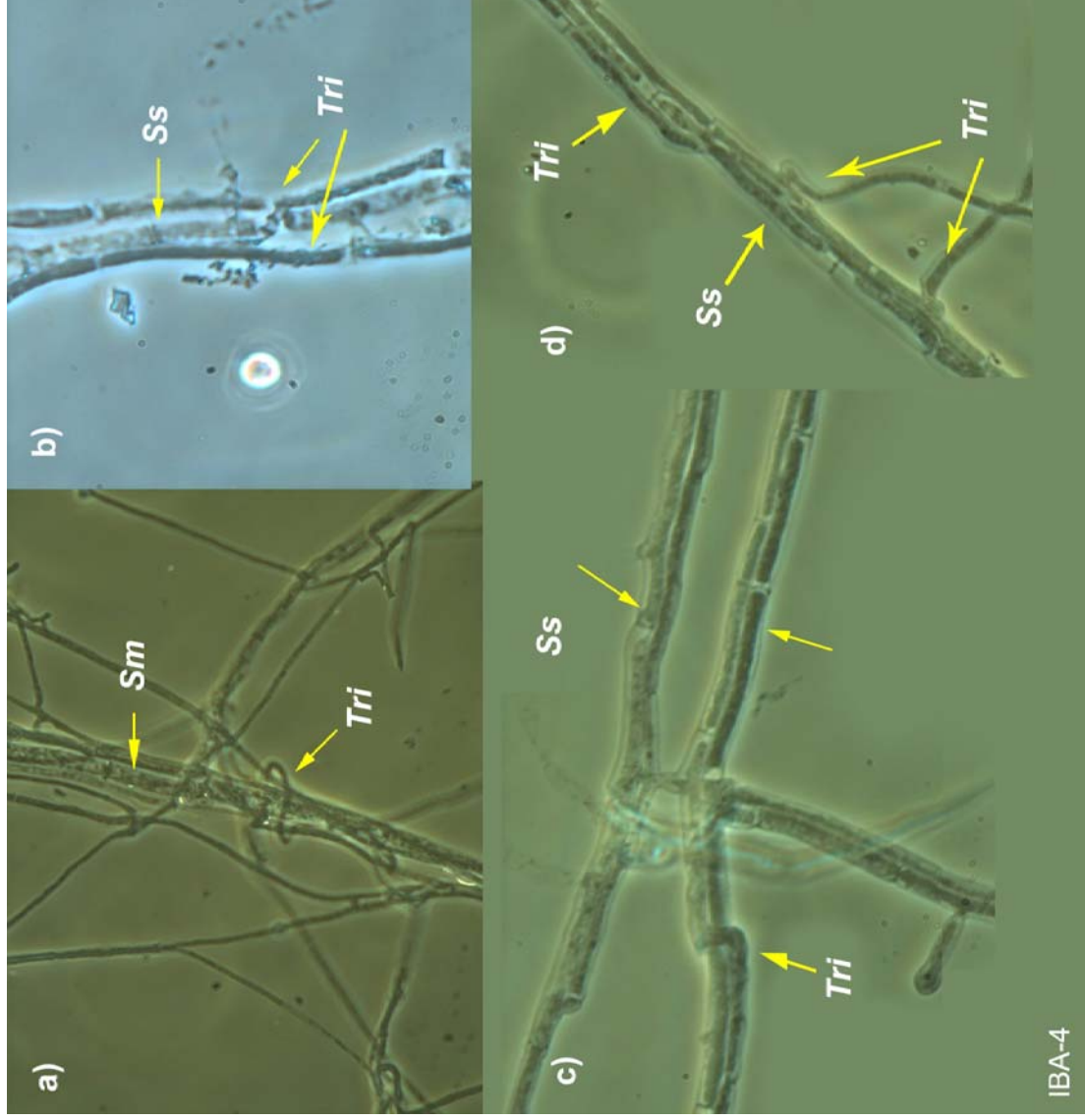
El crecimiento del micoparásito IBA-56 fue paralelo a la hifa, con posterior enrollamiento en las hifas de *Sclerotinia minor*. Sin embargo, en presencia de *Sclerotinia sclerotiorum* no se observó dicho enrollamiento ya que el micoparásito creció adosado a la hifa del hospedante provocando su granulación, vacuolización, además de presentar penetración a lo largo de la hifa (Figura 11).

El modo de parasitismo observado en la mayoría de los aislados de *Trichoderma*, sugiere que el ataque principal es por actividad micolítica de los micoparásitos. Ferrera-Cerrato (1977) menciona que para que se lleve a cabo la invasión o infección de un micoparásito en su hospedante, se requiere de la presencia de enzimas. Así, concluye que en el hiperparasitismo se pone en juego la interacción física (interfase de superficies) y la interacción bioquímica (enzimática). Laing y Deacon (1991) relacionaron la inhibición del crecimiento de *Pythium* spp. por efecto de la producción de compuestos volátiles procedentes

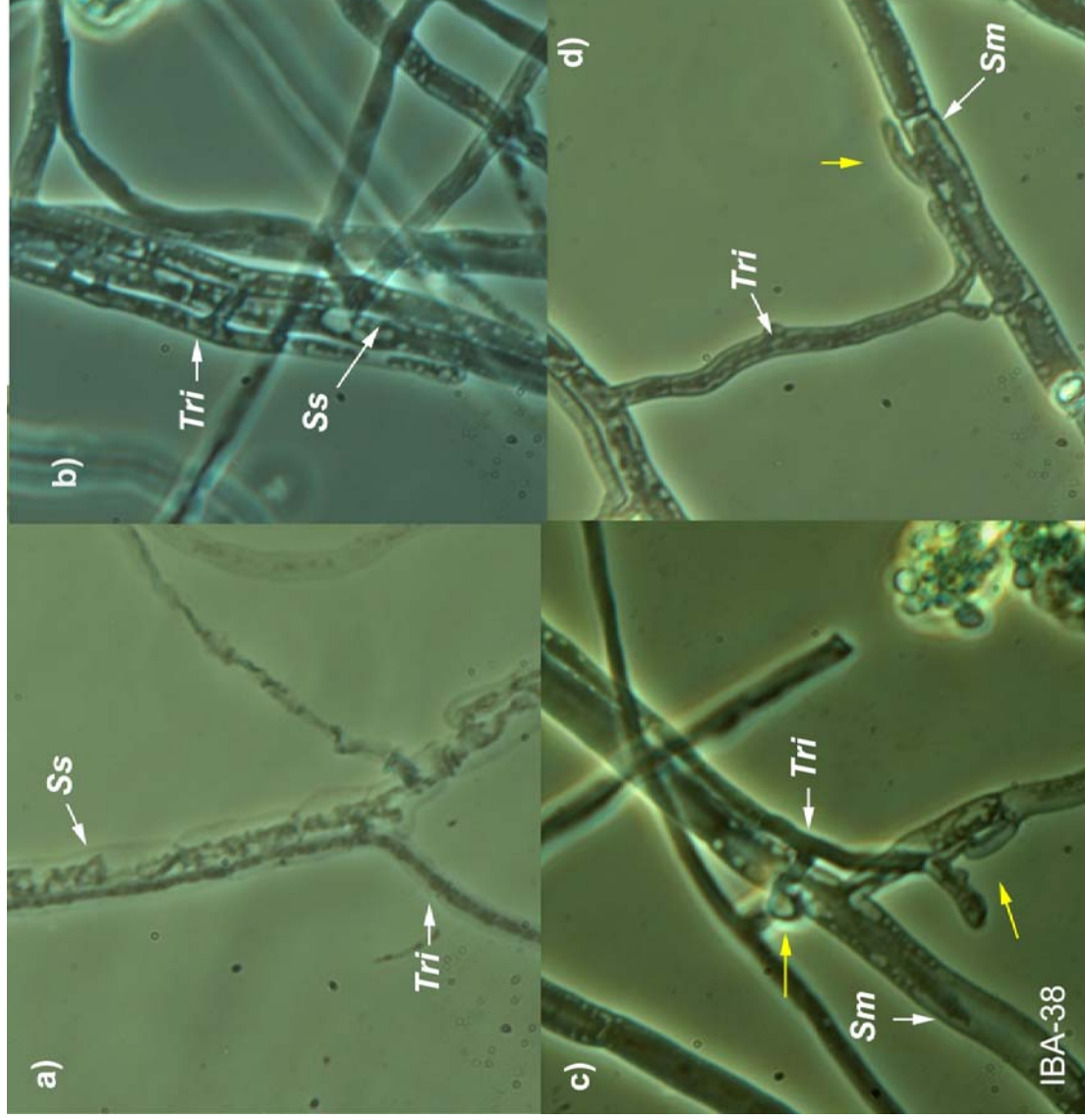
de *T. harzianum*. Inicialmente esta inhibición fue de pre-contacto o tropismo, y poco después se presentó un contacto rápido en los puntos de crecimiento hifal del hospedante produciéndose así, el micoparasitismo.

La pared celular de los hongos está integrada por diversos compuestos químicos y dentro de ellos se encuentran algunos polisacáridos (quitina, glucanas y celulosa). La producción de quitinasa, glucanasa y celulasa por parte de los hongos micoparásitos, hace posible la expresión de este tipo de interacción parasitaria. El proceso de micoparasitismo involucra varios eventos secuenciales que de manera general, incluye un reconocimiento (una interfase bioquímica), ataque y subsecuente penetración (una interfase física), y finalmente, la muerte del hospedante (Benítez *et al.*, 2004).

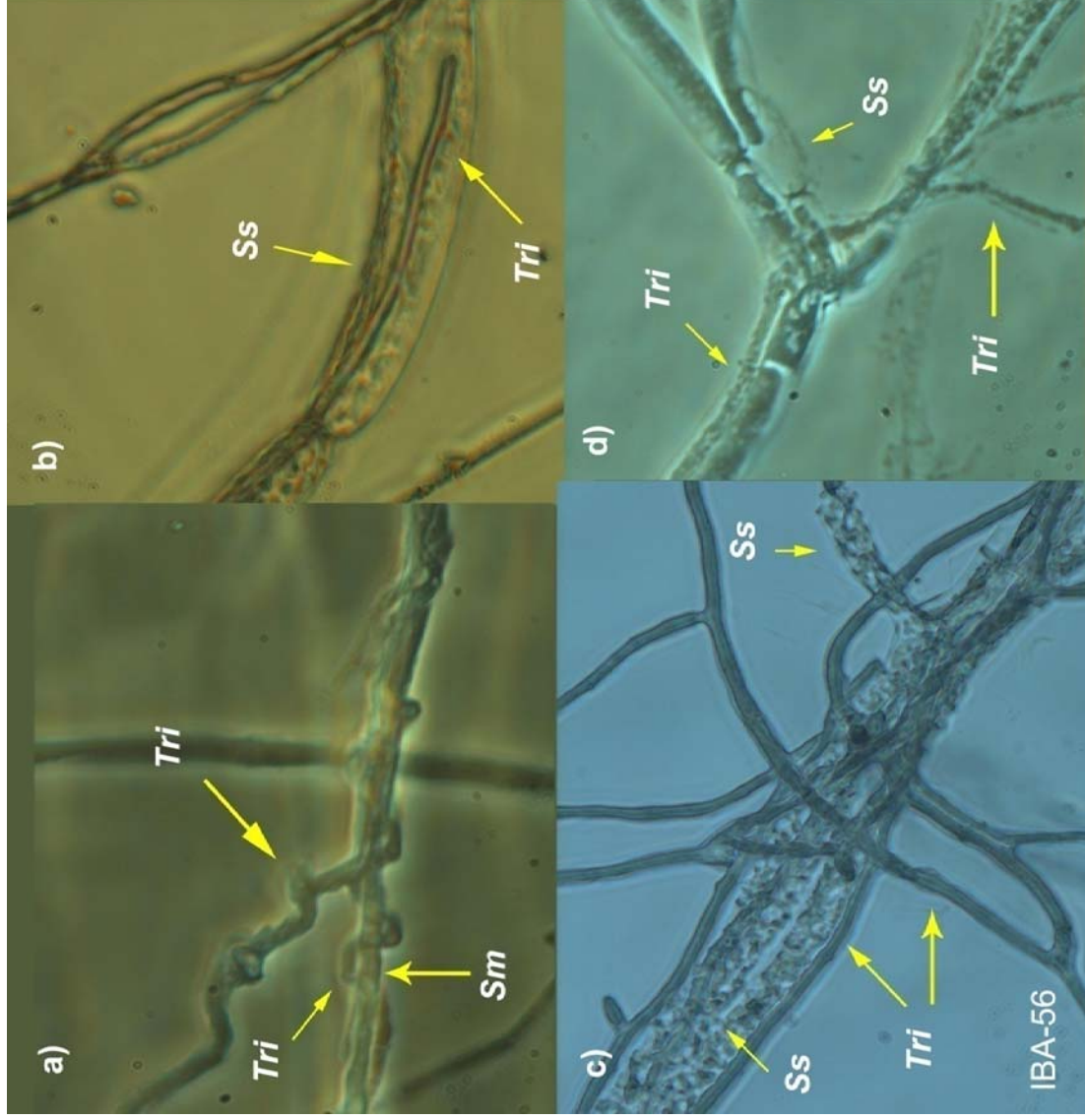




**Figura 9.** Micoparasitismo *Trichoderma* IBA-4 (*Tri*), sobre hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* (*Ss*) y *Sclerotinia minor* (*Sm*) donde: a) se observa adosamiento de hifas y un ligero enrollamiento, b) adosamiento y un ligero enrollamiento, c) adosamiento y la formación estructuras parecidos a los apresorios. Fotos tomadas en microscopio de contraste de fases OLYMPUS BX51, (40X).



**Figura 10.** Micoparasitismo de *Trichoderma* IBA-38 (*Tri*) con las hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* (*Ss*) y *Sclerotinia minor* (*Sm*) donde: a) granulación, b) adosamiento de hifas, c) adosamiento y la formación estructuras parecidos a los apresorios, d) adosamiento. Fotos tomadas en microscópio de contraste de fases OLYMPUS BX51, (40X).



**Figura 11.** Micoparasitismo de *Trichoderma* IBA-56 (*Tri*) con las hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* (*Ss*) y *Sclerotinia minor* (*Sm*) donde: a) enrollamiento de hifas, b) penetración de hifas, c) granulación y adosamiento, d) adosamiento y vacuolación de hifas. Fotos tomadas en microscopio de contraste de fases OLYMPUS BX51, (40X).

### 6.5. Preparación de inoculante biológico

Durante la preparación del inoculante de las cepas IBA-4, IBA-22, IBA-38 e IBA-56, mostraron ser altamente colonizadoras del arroz y del carbón vegetal utilizados como soporte y acarreador del inoculante. Sin embargo, en las pruebas de calidad utilizando cuenta viable

por la técnica de diluciones a los diez días, las cepas de *Trichoderma* mostraron diferencias en su capacidad de esporulación.

Las cepas con mayor producción de conidias viables cuantificadas como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de inóculo, fueron: IBA-4 con  $4.0 \times 10^{14}$  UFC g<sup>-1</sup>; IBA-56 con  $2.0 \times 10^{13}$  UFC g<sup>-1</sup>; y la cepa IBA-38 con  $2.5 \times 10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup>. Estas cepas de *Trichoderma* mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las demás cepas evaluadas (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Evaluación de calidad de inóculo medida con base en la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de inculante, a los diez días de inoculación en carbón como acarreador.

Cepa de <i>Trichoderma</i>	UFC g <sup>-1</sup> de inculante
IBA-1	$6.5 \times 10^5$ e
IBA-3	$3.5 \times 10^5$ e
IBA-4	$4.0 \times 10^{14}$ a
IBA-22	$1.5 \times 10^9$ c
IBA-23	$4.0 \times 10^6$ de
IBA-37	$2.5 \times 10^6$ de
IBA-38	$2.5 \times 10^{12}$ b
IBA-46	$3.0 \times 10^7$ d
IBA-54	$3.5 \times 10^5$ e
IBA-56	$2.0 \times 10^{13}$ ab

Medias con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, Tukey ( $P \leq 0.05$ ). n=3.

### 6.6. Evaluación del antagonismo hacia *S. sclerotiorum* y *S. minor* en lechuga

En los dos ensayos realizados en cultivo de lechuga en condiciones controladas, los aislados de *Trichoderma* no mostraron la capacidad de controlar a Sm y a Ss. El inóculo de *Trichoderma* en un acarreador de carbón vegetal, afectó negativamente el crecimiento de las plántulas de lechuga.

El porcentaje de protección de las plántulas en presencia del inóculo de las cepas de *Trichoderma* (IBA-4, IBA-38, e IBA-56) no fue distinto de las plántulas control inoculadas con los patógenos, por separado; es decir, las plantas murieron al cabo de 12 a 14 días. No

obstante, el desarrollo y crecimiento de los testigos absolutos fue normal. Lo anterior permite inferir que el inóculo de las cepas de *Trichoderma*, no tuvo la capacidad competitiva ante la velocidad de crecimiento micelial del patógeno. Es probable que los exudados de las raíces y según el sustrato donde crecen las plantas, tengan un efecto sobre la fisiología y patogenicidad de *Sclerotinia* en las plantas. No solo los microorganismos ejercen su efecto sobre las plantas, sino que estas a través de sus exudados, pueden modificar la composición de la comunidad rizosférica generando una fuerte presión selectiva que impide el crecimiento desmesurado de algunas poblaciones de hongos. Se ha demostrado, que existe una relación directa entre el número y tasa de microorganismos encontrados en las raíces (Vera *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2002). Así, por ejemplo, en las raíces más viejas predominan bacterias y hongos adaptados a condiciones oligotróficas y capaces de degradar compuestos más resistentes como lignina y celulosa (Yang y Crowley, 2000; Ezziyyani, 2004).

El efecto del control de patógenos de suelo por cepas de *Trichoderma* es afectado por numerosos factores bióticos y abióticos, que pueden reducir el crecimiento y establecimiento de estos hongos en el suelo. Bae *et al.* (2005) mencionan que la humedad, la variación de temperatura, la incorporación de residuos de plantas, así como el manejo de cultivo, son factores típicamente responsables en la eficiencia del control por *Trichoderma*. Además mencionan que algunas especies de *Pseudomonas* inhiben y lisan a *Trichoderma*. Así mismo, mostró que en suelos con un altos valores de biomasa microbiana en el suelo (153-517  $\mu\text{g}$  biomasa de carbono  $\text{g}^{-1}$  de suelo seco), se presenta una reducción del crecimiento hifal y la capacidad de biocontrol por parte de *Trichoderma* sobre los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, en un periodo de 14 días.

En el primer ensayo donde se inocularon esclerocios en lugar de micelio activo de *Sclerotinia*, la sintomatología se presentó hasta los 33 días después de la inoculación. Sin embargo, en el segundo ensayo que se inóculo con esclerocios y con micelio activo del

patógeno, la incidencia y severidad de la enfermedad se expresó a los 8 días después de la inoculación. Lo anterior, demostró la capacidad micoparasítica del patógeno en condiciones óptimas y en presencia de plantas susceptibles. En contraste, la germinación de las conidias y el crecimiento del micelio de *Trichoderma* no fueron aparentemente competitivos contra el micelio activo de *Sclerotinia*. En el Cuadro 11, se muestra la nula actividad antagonista de cada una de las cepas inoculadas, así como la agresividad por parte de *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum* en las plantas de lechuga a los 0, 8, 10, 12 y 14 días después de la inoculación (esclerocios, micelio e inoculante del antagonista).

**Cuadro 11.** Evaluación de la efectividad antagonista de cepas de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en plantas de lechuga.

<i>Trichoderma</i> (T)	Patógeno (P)	Tiempo en días				
		0	8	10	12	14
Sin	Sin	1.0 a	1.0 d	1.8 bc	1.8 cb	1.8 b
	Ss	1.0 a	1.6 cd	2.8 abc	3.0 abc	3.4 ab
	Sm	1.0 a	2.2 abcd	3.6 ab	4.2 a	4.4 a
Cepa IBA-4	Sin	1.0 a	1.2 cd	1.4 c	1.6 c	1.8 b
	Ss	1.0 a	3.4 a	4.2 a	4.8 a	5.0 a
	Sm	1.0 a	2.4 abc	3.0 abc	3.4 abc	3.4 ab
Cepa IBA-38	Sin	1.0 a	1.6 cd	2.8 abc	3.0 abc	3.4 ab
	Ss	1.0 a	1.6 cd	3.0 abc	3.6 abc	3.6 ab
	Sm	1.0 a	2.2 abcd	3.2 abc	3.4 abc	3.4 ab
Cepa IBA-56	Sin	1.0 a	3.2 ab	3.8 a	4.6 a	4.6 a
	Ss	1.0 a	2.0 bcd	3.2 abc	3.8 ab	4.0 ab
	Sm	1.0 a	1.8 cd	2.6 abc	3.6 abc	4.0 ab
DMS (LSD, $\alpha=0.05$ )	0	1.37	1.93	2.11	2.21	

Significancia  
T NS  
P NS  
T x P NS

La clave indica: *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Sclerotinia minor* (Sm), sin patógeno (Sin).

Escala de daños utilizada donde: 1=0-7 % de daño, 2=8-25 % de daño, 3=26-40 % de daño, 4=41-70 % de daño y 5=71-100 % de daño. Medias con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, LSD ( $P \leq 0.05$ ). n=3.

Con base en los ensayos *in vitro*, el crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* fue de 1.4 cm día<sup>-1</sup> y el de *S. minor* fue de 2.2 cm día<sup>-1</sup>. Comparando estos datos con el tiempo en que tardan las conidias de *Trichoderma* para germinar, se observó que la germinación se presentó después de 24 h.

Cabe remarcar que las condiciones en que se mantuvieron las plantas, fueron más favorables para el crecimiento de *Sclerotinia* y no para *Trichoderma*. Lo anterior permite confirmar la diferencia de tiempo en aplicación de los antagonistas, para un buen control de la enfermedad, por lo que se sugiere la aplicación del inoculante de *Trichoderma* al momento de la siembra para garantizar mayor protección radicular en la planta.

Con respecto al micoparasitismo sobre los esclerocios producidos en el sistema planta, se encontraron diferencias en el comportamiento de los aislados antagonísticos con relación a los patógenos. La mayoría de ellos fueron más activos a temperatura ambiente y con humedad menor al 50% (cultivos duales), en comparación con las temperaturas controladas y con humedad superior de 90% de la cámara bioclimática.

Se pudo observar, que el tratamiento con las cepas de *Trichoderma* después de 15 días, produjo la desintegración de la capa externa de los esclerocios expuestos en los diferentes tratamientos. En contraste, los esclerocios extraídos de las plantas testigo con inoculación del patógeno pero sin aplicación de los antagonistas, mantuvieron su integridad. Los numerosos esclerocios recuperados de los tratamientos en los que se inocularon las cepas de *Trichoderma*, estuvieron altamente dañados por efecto del parasitismo de los antagonistas (Figura 12).

Por otra parte, la germinación de esclerocios fue afectada por las cepas de *Trichoderma*, ya que al extraer los esclerocios *Sclerotinia sclerotiorum* y colocarlos en cámara húmeda, proliferó el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* (Figura 12b). La sobrevivencia de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, fue afectada por la invasión y la actividad de los

antagonistas probados (Figura 12c). Sin embargo, no se extrajeron esclerocios de *Sclerotinia minor* por lo que no se conoce si fueron destruidos o si la germinación fue afectada por los antagonistas.

Las pruebas de viabilidad realizadas para cada cepa de *Trichoderma* en cada tratamiento, demostraron la disminución de conidias a los 10 y a los 15 días de la inoculación, lo que demuestra la germinación de conidios estimulados por la presencia de micelio y esclerocios de *Sclerotinia minor* y de *Sclerotinia sclerotiorum*, en plantas de lechuga (Cuadro 12).



**Figura 12.** Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* extraídos de macetas tratadas con inoculante de las cepas de *Trichoderma*. a) esclerocio testigo, b) daño en la capa melanizada del esclerocio, c) crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sobre los esclerocios.

Mónaco *et al.* (1998) mencionan que la exposición de esclerocios a micoparásitos (*Trichoderma koningii*, *T. harzianum* y *Gliocladium roseum*) durante 30, 60 y 90 días en sustrato estéril, produce su desintegración. La recuperación de fragmentos desintegrados fue significativamente superior al testigo. Además observaron que los esclerocios recuperados a los 30 días estuvieron parasitados y por ello se inhibió la germinación micelial y carpogénica. Sin embargo, la capacidad de los antagonistas de permanecer viables y efectivos en el control biológico, es afectada por periodos de sequía. La capacidad de colonizar el sustrato



rápidamente por los antagonistas es también modificada por la presencia o no, de condiciones poco favorables (Molina *et al.*, 2006). Los esclerocios pueden estimularse para germinar de manera carpogénica después de un periodo fresco prolongado, al igual que la germinación micelial que puede ser influenciada con un tratamiento frío (García-Garza *et al.*, 1997).

**Cuadro 12.** Pruebas de viabilidad del inóculo, con respecto al tiempo de inoculación y finalización de ensayo con plantas de lechuga, promedio de UFC g<sup>-1</sup>.

Cepa de <i>Trichoderma</i>	Patógeno	UFC g <sup>-1</sup> de inoculante		
		0	10	15
Cepa IBA-4	Sin	3 x 10 <sup>5</sup>	16 x 10 <sup>4</sup>	7.3 x 10 <sup>4</sup>
	Ss		14 x 10 <sup>4</sup>	3.0 x 10 <sup>6</sup>
	Sm		16 x 10 <sup>4</sup>	6.0 x 10 <sup>4</sup>
Cepa IBA-38	Sin	1 x 10 <sup>6</sup>	15 x 10 <sup>5</sup>	10.0 x 10 <sup>4</sup>
	Ss		11 x 10 <sup>5</sup>	8.0 x 10 <sup>2</sup>
	Sm		11 x 10 <sup>5</sup>	1.0 x 10 <sup>4</sup>
Cepa IBA-56	Sin	5 x 10 <sup>8</sup>	13 x 10 <sup>6</sup>	12.0 x 10 <sup>4</sup>
	Ss		11 x 10 <sup>6</sup>	4.7 x 10 <sup>3</sup>
	Sm		12 x 10 <sup>6</sup>	5.0 x 10 <sup>3</sup>

La clave indica: *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Sclerotinia minor* (Sm), sin patógeno (Sin).

Por otra parte, el efecto de los antagonistas sobre *Sclerotinia* puede ser directo, creciendo sobre el micelio e incluso después de la formación de estructuras reproductivas y de protección, inhibiendo la actividad del patógeno. De manera indirecta, los antagonistas pueden estimular las respuestas de resistencia en la planta (Molina *et al.*, 2006).

La fertilización realizada con Bayfolan® (3 mL L<sup>-1</sup>) en el presente estudio, podría beneficiar a la planta, sin afectar la actividad de *Trichoderma*, al inducir mecanismos de defensa de la planta contra patógenos. Roco y Pérez, (2001) mencionan que la aplicación del Bayfolan® nutriente foliar, no afecta la germinación de conidias de *T. harzianum*; ya que, observaron un leve aumento en el crecimiento del patógeno *Alternaria alternata*, probablemente debido a la disponibilidad de nutrimentos en la formulación. Por lo anterior, se

infiere que la aplicación de este tipo de estimuladores del crecimiento vegetal no afectan la germinación y/o el crecimiento *T. harzianum* como agente de biocontrol, como ha sido señalado por Roco y Pérez (2001).

Los hongos de *Trichoderma* tienen capacidad antagonica contra patógenos de plantas en el suelo como *Sclerotinia sclerotiorum*, lo que los caracteriza como agresivos contra este patógeno (García-Garza et al., 1997). *Trichoderma* coloniza y degrada esclerocios eficazmente en suelos tratados con químicos, solarizados, o suelos que tienen reducidas poblaciones microbianas (García-Garza et al., 1997).

Las condiciones de humedad, temperatura, pH, son factores que no se pueden ignorar en el manejo de microorganismos, ya que pueden influir en el éxito o fracaso de un manejo integrado de enfermedades. Así, las diferentes especies de *Trichoderma* tienen distintos requerimientos ambientales (temperatura, humedad, pH, etc.). Según Rollan et al. (1999) la mayoría de las especies de *Trichoderma* presentaron mayor actividad micoparasítica de esclerocios en un rango de temperatura de 25 a 30 °C. Además, es conocido que la germinación de las conidias de *Trichoderma*, es muy rápida bajo condiciones ideales de temperatura y humedad, al igual que la penetración y la infección (Molina et al., 2006). Julca-Otiniano et al. (2006) afirman que un factor importante es la temperatura, ya que la actividad metabólica de los organismos se inicia cuando se supera un determinado umbral térmico, y aumenta a medida que las temperaturas se elevan hasta un cierto valor máximo y finalmente, se reduce rápidamente cuando las temperaturas superan este valor.

Naár y Kecskés (1995) sostienen que uno de los principales problemas en el control biológico de *S. minor* se relaciona con la temperatura óptima para que se lleve a cabo la germinación del esclerocio, el crecimiento micelial, y la infección de la planta. Así, la temperatura requerida por algunos fitopatógenos suele ser más baja que aquella requerida para la actividad de los antagonistas. Sin embargo, no es posible realizar mayores comparaciones

entre los resultados obtenidos en los ensayos de las cámaras bioclimáticas, ya que existieron diferencias metodológicas entre ellos. Sin embargo, la aplicación de micelio activo de *Sclerotinia*, favoreció la capacidad de este patógeno para colonizar a la planta susceptible.

Este resultado, no completamente satisfactorio, puede ser explicado en parte por el efecto de ciertos factores como: 1) ambientes extremadamente favorables para el desarrollo de la enfermedad, 2) alta población del patógeno y además, 3) por algunos daños en las plantas durante el trasplante. El determinar el momento de inoculación de los antagonistas podría favorecer un control exitoso de enfermedades causadas por *Sclerotinia*. La ventaja que tiene la utilización de hongos que presentan un ataque sin restricciones sobre estructuras de resistencia como los esclerocios, debe tomarse en cuenta para emplearlos con fines de protección para las plantas, ya que los aislados del género *Trichoderma* tienen importante función en la reducción de la cantidad de los propágulos de los patógenos, los cuales son también vulnerables durante su fase de latencia.

Si bien en condiciones de campo hay otros factores abióticos y bióticos que influyen sobre la expresión del antagonismo, las aptitudes de los agentes biocontroladores aislados a partir de diferentes zonas geográficas de México, garantiza una selección minuciosa de los mismos, para ser utilizados en distintos cultivos y en diferentes condiciones, y en pruebas futuras en invernadero y en campo.

El número y la actividad de los microorganismos, está controlado parcialmente por la cantidad de energía y las fuentes nutrimentales que puedan liberarse en la descomposición de la materia orgánica, sin importar cuántas etapas o que organismos intervienen en su mineralización. En consecuencia, ningún factor que influya en la biología del suelo puede incrementar el número de individuos heterotrófos, si no aumenta el nivel del sustrato energético. Por lo tanto si un grupo aumenta, otros deben necesariamente disminuir (Julca-Otiniano *et al.*, 2006; Acuña *et al.*, 2006).

La introducción de los hongos del género *Trichoderma* en el manejo integrado de enfermedades, se justifica en las ventajas que representan sus capacidades antagonicas en el suelo. Bajo estas perspectivas y de acuerdo con los resultados, se confirma lo observado por algunos investigadores respecto a que la selección previa de antagonistas mediante cultivos duales *in vitro* es útil, pero no garantiza el buen comportamiento de estas cepas en invernadero y/o campo, cuando interactúan con la planta y el patógeno (Cid Ahmed *et al.*, 2000; Ezziyyani, 2004; McLeod *et al.*, 1995).

Ante estos resultados, se piensa que una buena estrategia sería mejorar la producción de biopreparados, así como una selección más detallada de los antagonistas aislados, en condiciones similares a las que prevalecen en el ambiente donde se establecen los cultivos agrícolas. De esta forma, es posible obtener efectos promisorios de los antagonistas en el control de agentes patógenos en condiciones de campo, como han sido descritos por Ávila-Miranda *et al.* (2006).

## 7. CONCLUSIONES

- En algunos sitios de México podemos encontrar diversidad en suelos, de los que se pueden aislar y seleccionar hongos del género *Trichoderma* con capacidad antagonística a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger.
- Los hongos aislados por la técnica de cebo con esclerocios viables, resultó ser la mejor técnica para aislamiento y selección de microorganismos antagonísticos a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger.
- Se aislaron un total de 152 hongos de 14 muestras pertenecientes a suelo selvático, agropecuario y forestal; de los cuales el 46.7% de los hongos pertenecen al género *Trichoderma*. Sólo el 35.2% de los aislados de *Trichoderma* muestran 100% colonización sobre micelio y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger.
- La aplicación de métodos *in vitro* para la selección de micoparásitos, demuestra la capacidad de crecer y esporular, de aislados de *Trichoderma* sobre micelio y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *S. minor* Jagger.
- Todas las cepas de *Trichoderma* evaluadas, mostraron capacidad en la producción de conidias en sustrato de arroz y viabilidad de conidias en carbón, por lo que son aptos para la formulación de inoculante.
- Los resultados de este estudio demuestran que la aplicación de cepas antagonistas de *Trichoderma* spp. en condiciones controladas, no presentaron efectos de biocontrol, al inocularlos simultáneamente en plantas de lechuga y en presencia de micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *S. minor* Jagger.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña O., W. Peña, E. Serrano, L. Pocasangre, F. Rosales, E. Delgado, J. Trejos, y A. Segura. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos.
- REUNIÓN INTERNACIONAL ACORBAT, 15-20 de Octubre., Joinville, Santa Catarina, BRASIL.
- Adams, P. B., and W. A. Ayers. 1983. Histological and physiological aspects of infection of sclerotia of *Sclerotinia* species by two micoparasites. *Phytopathology*, 73:1072-1076.
- Agrios, G. N. 2005. Enfermedades por *Sclerotinia*, en *Fitopatología*. 2ª ed. México: Limusa, pag. 448-452.
- Ávila-Miranda, M. E., A. Herrera-Estrella, and J. J. Peña-Cabriales. 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38:1823-1830.
- Ayers, W. A., and P. B. Adams. 1979. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotiborum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 25:17-23.
- Bae, Y. S., R. Guy, and R. Knudsen. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control*. 32:236-242.
- Baquer, K. F., and R. J. Cook. 1974. Biological control of plant pathogen. San Francisco: Freeman. Pag. 433
- Barnett H. L., and F. L. Binder. 1973. The fumigal host-parasite relationship. Annual Review of Phytopathology. 11:273-292.
- Barnett, H. L. 1964. Mycoparasitism. *Mycologia*. 56:1-19.

- Benhamou N. and I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*. 83: 1062-1071.
- Benítez T., M. A. Moreno-Mateos, A. M. Rincón y A. C. Codón. 2006. Características de levaduras y hongos filamentosos de interés en agroalimentación. ¿Adaptación al ambiente? *Actualidad SEM* 41:17-27
- 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 host of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 14:10-17.
- 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):1-16.
- Brozová J. 2005. Micoparasitic fungi *Trichoderma* spp. In pant protection. *Plant Protect Science*. 2:63-74.
- Camargo-Castillo A. N. y Campuzano, S., 2006. Estudio piloto de detección de parásitos en frutas y hortalizas expedidas en los mercados públicos y privados de la ciudad de Bogota D. C. Nova, *Publicación científica*. 4: 77-81.
- Campos T., J. Rosello, M. Gomis, D., M. Hermosa, R., I. Grandona y E. Monte. 1998, Control biológico de la podredumbre húmeda de la lechuga, mediante la aplicación al agua de riego del hongo antagonista *Trichoderma* spp. III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). Valencia, España, pp 179.
- Chaube H. S., D. S. Mishra, S. Varshney, and U.S. Singh. 2003. Biocontrol of plant pathogens by fungal antagonists: historical background, present status and future prospects. *Annual Review of Plant Pathology*. 2:1-42.

- Chungh J. K., and B. A. Wallace. 2001. Peptaibols: models for ion channels. *Biochemical Society Transaction* 29:565-570.
- Ciampi L., E. Schnettler, M. Gutiérrez, y L. Ramos 1994, Pesticidas biológicos para el control de enfermedades de la papa. *Fitopatología* 29: 19-81.
- Coker, W. C. 1923. *The Saprolegniae*, Whith notes on ther wáter molds. University of North Carolina Press, Chapel Hill, North Carolina. p- 201.
- Cook, R., and K. F. Baker. 1989. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American of Phytopathology Society*. 539 p.
- Cundom M. A., S. M. Meza de G., M. A. Mazzanti de C., S. A. Gutiérrez de A., y M. Coutinho. S/F. Actividad antagónica *in vitro* de hongos saprofitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.
- De Bach, P. 1964. Biological control of insect pest. *Annales Review Entomology*. 3:291-310.
- De Marco, J. L., and C. R. Felix. 2002. Characterization of a protease by *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant whiches' broom disease. *BMC Biochemistry*, 3:3. [www.biomedcentral.com/1471-2091/3/3](http://www.biomedcentral.com/1471-2091/3/3)
- Dillard, H. R. and R. G. Grogan, 1985. Influence of green manure crops and lettuce on sclerotial populations of *Sclerotinia minor*. *Plant Disease*. 69: 579-581.
- Domsch, K. H., W. Gams, and A. Traute-Heidi. 1980. *Trichoderma* Pers. Ex Fr. 1821. In *Compendium of soil fungi*, Volume 1. Academic Press (London) LTD. pg: 794-809.
- Dos Santos, A. F., O. D. Dhingra. 1980. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Botanical*. 60:472-475.
- Dwivedi B. P. and D. N. Shukla 2002, Biocontrol of *Fusarium* wilt of guava (*Psidium guajava* L.) using *Trichoderma* and *Gliocladium* species. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 15: 399-400.



- Elad Y., and J. Katan. 1980. *Trichoderma Harzianum*: a Biocontrol agent effective against *Sclerotinia rolfssii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 70:119-121.
- Elad, Y., and A. Kapat. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology. 105:177-189.
- EROSKI. 2005. Escuelas Idea Sana EROSKI Mayo – Junio 2005 / “La Lechuga” [www.ideasana.com](http://www.ideasana.com)
- Estrada-Venegas E. G., 2007. Ácaros del suelo en los procesos de descomposición. In Microbiología Agrícola. R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón. (ed) Trillas, México. pp:274 y 283.
- Ezzyyani M. 2004. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum nahum* L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia España.
- FAO. 1998. Base de datos estadísticos de cultivos primarios. (noviembre, 2005). <http://fao.org> (<http://www.fao.org/inpho/content/documents/ulibrary/ae620s/pfirescos/LECHUGA/HTM>.)
- Ferrera-Cerrato R., R. E. Cruz, and D. H. Humbell 1976. Further studies an a mycoparasitic basidiomycete species. Applied and Environmental Microbiology. 31: 60-62.
- Ferrera-Cerrato, R. 1977. Estudio del hiperparasitismo de algunos basidiomicetos *in vitro*. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
- Gao K., X. Liu, Z. Kang, and K. Mendgen 2005. Mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by endophytic *Chaetomium spirale* ND35: ultrastructure and cytochemistry of the interaction. Journal of Phytopathology. 5:280-290.
- García-Breijo F. J., M. P. Santamarina, y J. Roselló 2005 *Trichoderma*: mecanismos de control. Phytoma. 172: 106-107.

- García-Espinosa, R. 2007. Definiciones de control biológico en enfermedades. Enfermedades con origen en el suelo, control biológico y supresividad de suelo. In: Microbiología Agrícola. R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón. (ed) Trillas, México. pp:329.
- García-Garza, J. A., R. D. Reeleder, and T. C. Paulitz. 1997. Degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus gnats (*Bradysia copriphila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. Soil Biology and Biochemistry 29:123-129.
- Garrabrandt, L. E., S. A. Johnston, J. L. Peterson. 1983. Tan Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce. Mycologia. 75:451-456.
- Gäumann, E. 1946. Types of defence reactions in plants. Phytopathology. 36:624-633.
- Gebhardt, S. E., and R. H. Matthews. 1988. Nutritive value of foods. USDA-HNIS, Home and Garden Bull. 72, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, U.S.A., 72p.
- Gomar, E., M. Martí y R. Sorbias. 1993. Daños que produce *Sclerotinia* sp en cultivos de *Lactuca sativa*. Phytoma, 46: 16-22.
- Granados M. M., and E. Wang. 2005 Aislamiento e identificación de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Agronomía Costarricense 29:57-66. [www.mag.go.cr/rev\\_agr/inicio.htm](http://www.mag.go.cr/rev_agr/inicio.htm) y [www.cia.ucr.ac.cr](http://www.cia.ucr.ac.cr)
- Harman, G. E, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. Nature Review Microbiology. 2:43-56.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease. 84:377-393.
- Hartley, C. 1921. Damping-off in forest nurseries. US Dept Agric Bull 934:1-99.
- Hemeroteca Virtual ANUIES. Febrero del 2006 citado en línea: <http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES>

- Hernández A., R. Plana, G. M. Martín, and J. L. Santander. 2002. Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en suelo ferralítico rojo. Cultivos Tropicales. 1:15-20.
- Herrera, C. R. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Licopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernadero. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Citado en línea. (Febrero 2007) [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/montealegre\\_j/14.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/14.html)
- Howel, C. R. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control whit *Trichoderma* spp. Phytopathology. 92:177-180.
- Howell, C. R. 2003. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87:4-10.
- Hung-Chang, H., E. R. Scout, C. Chang, J. R. Moyer, F. J. Larney and H. Jenn-Wen 2002. Organic soil amendments for control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology Bulletin 11:207-214.
- Invar, J., A. Mendez, and I. Chef. 1996. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Soil Biology and Biochemistry. 28:757-763.
- Jones D., and D. Watson. 1969. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, a phytopathogenic fungus. Nature. 224:287-288.
- Julca-Otiniano, A., L. Meneses-Florian, R. Blas-Cevillano, y S. Bello-Amez. 2006. La materia organica, importancia y experiencia de uso en la agricultura. IDESIA (Chile) 24: 49-61. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-34292006000100009&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292006000100009&lng=es&nrm=iso). ISSN 0718-3429.

- Karling, J. S. 1942. Parasitism among the chytrids. American Journal of Botany. 29:24-35.
- Koutecká J, and E. Dusková. 1998. Interactions of soilborne pathogenic and nonpathogenic fungi and their effects on cucumber germinating plants. Institute of Agricultural and Food Information, 25: 109-113. (AGRIS 2006 - FAO of the United Nations).
- Laing, S. A. K., and J. W. Deacon. 1991. Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and an unnamed *Pythium* species. Mycological Research. 95:469-479.
- Lara H., M. E., y R. Ferrera-Cerrato. 2007. Mecanismos microbianos en el control biológico. In: Microbiología Agrícola. R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón. (ed) Trillas, México. pp:356-364.
- Lorito, M. G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Transmo, S. L. Woo, and A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produce by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endoquinase and chitobiosidase. Phytopathology. 83:302-307.
- M.A.G. 1994. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa de control biológico. San José, Costa Rica.
- Madigan M. T., J. J. Martinko, and J. Parker. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Pearson Educación, Madrid.
- McLeod, A., N. Labuschagne, and J. M. Kotzé. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bank medium artificially infest with *Phytophthora cinnamomi*. South African Avocado Growers Association Yearbook. 18:32-37.
- Melgarejo, P., A. De Cal, and E. M.-Sagasta. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. Canadian Journal of Botany. 67:83-87.

- Melzer, M.S., E. A. Smith, and G. J. Boland. 1997. Index of plant hosts of *Sclerotinia minor*. Canadian Journal of Plant Pathology. 19:272-280.
- Menendez, A. B.; y A. M. Godeas 1995. Capacidad antagonica de algunos micoparásitos de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, presentes en la región de Pergamino, Argentina. Rev. Facultad de Agronomía. La Plata 71 (1):67-72.
- Mercier, J. and R. D. Reeleder. 1987. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and other fungi on the phylloplane of lettuce. Canadian Journal of Botany. 65: 1633-1637.
- Michalíková A., and J. Michina. 1997. Regulatori potencial of *Trichoderma harzianum* B1 in relation whit phytopathogenous microorganisms. In: Proc. XIV. Slovak and Czech plant Protect. Nitra: 291-292.
- Migheli Q., C. L. Gonzáles, L. Dealessi, A. Camponogara, and V. D. Ramón. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the  $\beta$ -1, 4-endoglucanase gene eg11 show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. Phytopathology, 88: 673-677.
- Mohammed E., P. C. Sánchez, E. M. Requena, L. Rubio, and M. E. Candela. 2004a. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.
- Mohammed E., P. C. Sánchez, S. A. Ahmed, M. E. Requena, L. Rubio, and M. E. Candela. 2004b. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*). Anales de Biología, 26:35-45.
- Molina M, G., S. F. Zaldúa, G. V. E. González and V. S. Sanfuentes, 2006. Selección de hongos antagonistas para el control de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque 27:126-134.

- Mónaco, C. I. 1990. Evaluación de la eficiencia de micoparásitos sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*. Revista Facultad de Agronomía, 65:67-73
- Mónaco, C. I., M. C. Rollán, and A. I. Nico, 1998. Efecto de micoparasitismo sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. Revista Iberoamericana de Micología. 15:81-84.
- Morales R., A. 2007. Etiología y control de la pudrición blanca y gris del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Tesis de licenciatura. Parasitología Agrícola, Chapingo, Edo. de México.
- Mueller, D. S., A. E. Dorrance, R. C. Derksen, E.Ozkan, J. E. Kurlle, C. R. Grau, J. M. Gaska, G. L. Hartman, C. A Gaska, C. A. Bradley, and W. L. Pedersen. 2002. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. Plant Disease. 86:26-31
- Mukerji, K. G., and K. L. Garg. 2000. Biocontrol of Plant Diseases, Volume 1. CRC Press, Inc., Corporate Blvd., N. W., Boca Raton, Florida. Pp.211.
- Naár Z., and M. Keeskés. 1995. A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. Microbiology Research. 150:239-246.
- Ocampo J. O, R. D. Jiménez, M. E. Salas, H. G. Mena, C. G. Virgen, O. A. Flores y P. V. Olalde. 2001. Uso de microorganismos rizosféricos en Solanáceas. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN U. Irapuato Depto. Biotecnología y Bioquímica. Memorias de congreso horticultura, Saltillo, 2001. [http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Ponencia\\_02.pdf](http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Ponencia_02.pdf)
- Olalde P. V., y G. L. I. Aguilera, 1998. Microorganismos y biodiversidad, Terra 3: 289-292.
- Orietta F., y Larrea V. 2001 Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Costa Rica. Manejo Fitosanitario de Plagas 62:96-100.

- Ortiz A. and S. Orduz. 2000. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting and *Atta cephalotes*. Mycopathologia. 150:53-60.
- Papavizas, G. C., and R. D. Lumsden. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology, 18:389-413.
- Quintero, I., J. Zambrano, M. Cabrera, and R. Gil. 2000 Evaluación en campo y postcosecha de nueve cultivares de lechuga *Lactuca sativa* L. Revista Facultad de Agronomía 17:482-491.
- Ritieni A., V. Fogliano, and E. Randazzo. 1997. Advance on active peptabols produced by *Trichoderma* genus. In: 5th Eur. Seminar, Szeged, Hungary: 299-302.
- Roco A., and L. M. Pérez. 2001. *In vitro* activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. Journal of Biotechnology. 468-473.
- Rollán M., C. Mónaco, y A. Nico. 1999. Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia rolfssii*. Invs. Agragiculture Production Prot. Vegetal. 14:34-47
- Ruiz C. A., G. G. Medina, T. C. Ortiz, A. I. González, L. H. Flores, y M. K. Byerly. 1999. Requerimientos Agroecológicos de cultivos. INIFAP, Pacífico Centro, SAGARPA. Pag. 326.
- Ryder, E. J. 2001. Introducción. Tipos de lechuga. In: Plagas y enfermedades de la lechuga. R. M. Davis, K. V. Subbarao, R. N. Raid y E. A. Kurtz. (ed). Mundiprensa. España. pp: 2-8.
- Scannavini, M., L. Cobelli, and L. Antoniaci. 1993. Agenti del marcume del colletto Della lattuga. Informe patológico. 3:23-28.
- Schirmböck M., M. Lorito, Y. L. Wang, C. K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G. E. Harman, and C. P. Kubicek. 1994 Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and

- peptaibol antibiotic, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Applied and Environmental Microbiology. 60: 4364-4370.
- SIAP. 2005. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA, situación al 28 de Febrero 2005, citado en línea: [www.siap.sagarpa.org.mx](http://www.siap.sagarpa.org.mx)
- Sivan A., Y. Elad, and I. Chet. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology. 74: 498-501.
- Subbarao K. V. 2001. Enfermedades causadas por hongos. Caída (Drop). In: Plagas y enfermedades de la lechuga. R. M. Davis, K. V. Subbarao, R. N. Raid y E. A. Kurtz. (ed). Mundiprensa. España. pp:19-21.
- Ulhoa, C. J. 1996. Enzimas micolíticas producidas pelo agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*. p.234-238 en V sincobiol Simposio de controle biológico. Anais: conferencias y palestras.Foz de Iguaçú-Parana-Brasil.
- USDA, Agricultural research service, Nutrient data laboratory. Citado en línea, marzo 2008. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- Vera D. F., H. Pérez, y H. Valencia, 2002. Distribución de hongos solubilizadores de fosfatos en dos microhábitats de suelo de dos unidades fisiográficas de guaviare, Colombia. Acta Biológica Colombiana, 1:23-31.
- Vero M., S. y P. Mondito. 1999 Control biológico postcosecha en Uruguay. Facultad de Química, Cátedra de Microbiología. Montevideo. Uruguay. Revista, Horticultura Internacional Año 7, n° 26
- Villegas B., E., y J. Castaño Z. 1999. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora cactorum* (LEBERT & COHN) Schöeter, causante de la pudrición de la corona y raíz del manzano (*Malus domestica*



- Borkh.) en Caldas. Fitotecnia, Resumen de investigación Universidad de Caldas, Colombia.
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other fungi, Phytopathology. 22:837-845.
- Werner A, and Zadworny. 2003. *In vitro* of mycoparasitism of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria* against *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of *Pinus sylvestris*. Mycorrhiza 13:41-47.
- Whipps, J. M. 1991. Effects of mycoparasites on sclerotia forming fungi. En Biotic Interactions and Soil-borne Diseases. Eds. A.B.R. Beemster. Amsterdam: Elsevier. pp. 129-140.
- Whitmore, L., and B. A. Wallace 2004. The peptaibol database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. Nucleic Acids Research 32, Database issue D593-D594. DOI: 10.1093/nar/gkh77.
- Willett, H. J., and J. A. L. Wong. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. The Botanical Review. 46:101-165
- Yang, C. H., and D. E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. Applied and Environmental Microbiology. 66:345-351.
- Zavaleta, M. E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra 3:201-207.

## APÉNDICE I

### Ácaros de suelo

Los ácaros del suelo, comprenden un amplio grupo dentro de los artrópodos y se encuentra distribuido en todo el globo terrestre. En el suelo destacan por su diversidad de especies y abundancia. La diversidad de ácaros se favorece debido a la ausencia de otros grupos importantes, como: colémbolos, lombrices de tierra, miriápodos, coleópteros, etc., que participan en la trituration de la materia orgánica (Estrada-Venegas, 2007).

Por otra parte, también ayudan a la dispersión de microorganismos al acarrear esporas adheridas en sus cuerpos, permitiendo su distribución más efectiva entre las partículas de suelo y encontrando nuevos sustratos para su desarrollo (Estrada-Venegas, 2007).

Villegas y Castaño (1999), sugieren que para evitar la contaminación de ácaros, realizar resiembras de micelio; tomando una porción superficial de la masa de esporas y sembrando en PDA, repitiendo el proceso hasta lograr la pureza del hongo. Este proceso, se puede utilizar en la técnica de pastelitos, cuando aparezcan masas algodonosas de color verde oliva correspondientes a las conidias del *Trichoderma*, realizando la técnica antes descrita, para la purificación. Los ácaros se encontraron solo en esta técnica, tanto en micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. En la figura 13 se muestra el daño ocasionado por ácaros sobre el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* inoculado con “pastelitos” de suelo de Oaxaca, además se muestra un ácaro aislado del micelio de *Trichoderma*.



**Figura 13.** Ácaros: a) Daño ocasionado por ácaros micofagos, b) ácaro presente en las muestras de suelo.

## APÉNDICE 2

Origen	Muestra de suelo	Clave de aislamiento	Técnica utilizada	Clave de cepa
E. México	Chinampa	F5-H10	Cebo-Ss	IBA-27
E. México	SCH	F5-H4	Cebo-Sm	IBA-28
E. México	Chinampa	F6-H7	Cebo-Ss	IBA-39
E. México	Chinampa	H47	Pastelitos	IBA-47
E. México	Chinampa	H39	Pastelitos	IBA-55
E. México	Chinampa	H63	Pastelitos	IBA-63
E. México	SCH	H67	Diluciones	IBA-67
Guanajuato	Loma 3	F4-H3	Cebo-Ss	IBA-20
Guanajuato	Pitayo	H35	Motita	IBA-35
Guanajuato	Loma 3	F1-H1	Cebo-Sm	IBA-45
Guanajuato	Pitayo	F6-H5	Cebo-Sm	IBA-46
Guanajuato	Pitayo	H53	Motitas	IBA-53
Guanajuato	Pitayo	H54	Motita	IBA-54
Guanajuato	Pitayo	H69	Motitas	IBA-69
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F5-H5	Cebo-SS	IBA-1
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F6-H3	Cebo-SS	IBA-12
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F6-H2	Cebo-Sm	IBA-13
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F5-H6	Cebo-Sm	IBA-18
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F2-H2	Cebo-Sm	IBA-23
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H24	Motita	IBA-24
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H25	diluciones	IBA-25
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F2-H2	Cebo-Sm	IBA-33
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F3-H9	Cebo-Sm	IBA-38
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F1-H2	Cebo-Sm	IBA-4
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H44	Motita	IBA-44
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H1	Diluciones	IBA-56
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F3-H4	Cebo-Sm	IBA-57
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F3-H6	Cebo-Sm	IBA-58
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	F3-H5	Cebo-SS	IBA-59
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H59	Pastelitos	IBA-60
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H60	Motitas	IBA-66
Jalisco	MJ <sub>2</sub>	H9	pastelitos	IBA-9
Oaxaca	3PRI	H11	Motitas	IBA-11
Oaxaca	3PRI	F3-H1	Cebo-Sm	IBA-14
Oaxaca	3PRI	H21	Motitas	IBA-21
Oaxaca	3PRI	H22	Motitas	IBA-22
Oaxaca	3PRI	H26	Motitas	IBA-26
Oaxaca	3PRI	F5-H7	Cebo-Sm	IBA-43
Oaxaca	3PRI	F2-H1	Cebo-Sm	IBA-61
Oaxaca	3PRI	F6-H8	Cebo-Sm	IBA-62
Oaxaca	3PRI	F2-H2	Cebo-SS	IBA-64
Oaxaca	3PRI	F3-H8	Cebo-Sm	IBA-65
Oaxaca	3PRI	F1-H1	Cebo-Ss	IBA-71
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	F3-H3	Cebo-Sm	IBA-10
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	F3-H3	Cebo-Sm	IBA-15
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	H19	Diluciones	IBA-19
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	F3-H3	Cebo-Sm	IBA-42
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	F3-H10	Cebo-Sm	IBA-68
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	F1-H5	Cebo-Sm	IBA-7
Oaxaca	5B <sub>2</sub>	H70	Diluciones	IBA-70
Oaxaca	9B <sub>2</sub>	F5-H2	Cebo-Sm	IBA-31
Oaxaca	9B <sub>2</sub>	H40	Diluciones	IBA-40
Oaxaca	9B <sub>2</sub>	H41	Diluciones	IBA-41
Oaxaca	9NTB <sub>1</sub>	F6-H4	Cebo-Sm	IBA-36
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	F2-H5	Cebo-Sm	IBA-17
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	F6-H6	Cebo-SS	IBA-34
Veraacruz	12 2 <sup>a</sup>	F1-H8	Cebo-Sm	IBA-3
Veraacruz	12 2 <sup>a</sup>	F1-H3	Cebo-Ss	IBA-5
Veraacruz	13 2 <sup>a</sup>	F6-H9	Cebo-Sm	IBA-29
Veraacruz	13 2 <sup>a</sup>	F1-H9	Cebo-Sm	IBA-30
Veraacruz	13 2 <sup>a</sup>	F5-H9	Cebo-Sm	IBA-32
Veraacruz	13 2 <sup>a</sup>	F5-H8	Cebo-Sm	IBA-37
Veraacruz	13 2 <sup>a</sup>	F6-H10	Cebo-Ss	IBA-6
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H2	Diluciones	IBA-2
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H49	Motita	IBA-49
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H8	Diluciones	IBA-8
Veraacruz	12 2 <sup>a</sup>	H16	Diluciones	IBA-16
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H51	Motita	IBA-51
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H48	Diluciones	IBA-48
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H50	Diluciones	IBA-50
Veraacruz	11 2 <sup>a</sup>	H52	Diluciones	IBA-52

**Motita:** sin uso de cebo, considerando humedad y materia orgánica del suelo

## ANEXOS

### Preparación de reactivo Melzer + PVLG.

Melzer's	
Clorhidrato	100 g
Agua destilada	100 mL
Yodo	1.5 g
Yoduro de potasio	5.0 g

Polivinil- lacto- glicerol (PVLG)	
Agua destilada	100 mL
Acido láctico	100 mL
Glicerol	10 mL
Alcohol de polivinilo (PVA)	16.6 g

Para la preparación de PVLG (a una proporción de volumen de 1:2): mezclar todos los ingredientes en una botella oscura antes de agregar el alcohol de polivinilo (PVL). El PVA debe tener las propiedades siguientes: hidrolizado 99-100%, y una viscosidad de 24 - 32 centipoles en una solución acuosa 4% a 20°C. El PVA se agrega como un polvo a los otros ingredientes líquidos. El PVA disuelve despacio, y sólo cuando se coloca en un baño de agua caliente (70 - 80°C).

La solución estará clara en 4-6 horas; PVLG guarda bien en las botellas oscuras durante aproximadamente un año.