



Tecnológico Nacional de México.

Departamento de Química y Bioquímica

Licenciatura en Ingeniería Bioquímica

Inhibición de crecimiento *in vitro* de *Fusarium verticillioides* por confrontación directa con Hongos entomopatógenos

Asesora de informe de residencia : Dra. Rosa Isela Cruz Rodríguez

Contenido

1	Introducción	4
2	Justificación	5
3	Objetivos	7
	Objetivos Generales.	7
	Objetivos Específicos.	7
5	Marco teórico.	9
	5.1 Hongos fitopatógenos	9
	5.2 Generalidades del género <i>Fusarium</i>	10
	5.2.1 Patogénesis en animales, humanos y plantas.	10
	5.2.2 Principales síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos.	12
	5.2.3 Desarrollo de la enfermedad.	12
	5.2.4 Colonización de los tejidos del huésped.	13
	5.3 <i>Fusarium verticillioides</i>	14
	5.3.1 Clasificación taxonómica	15
	5.4 <i>Fusarium verticillioides</i> en la agricultura	16
	5.4.1 Mecanismo de infección del patógeno	16
	5.5 Maíz.	21
	5.5.1 Descripción botánica.	21
	5.5.2 Importancia del cultivo de maíz.	22
	5.6 Generalidades de los hongos entomopatógenos.	23
	5.6.1 Mecanismos de acción de hongos para control de enfermedades fitopatógenas.	24
	5.6.2 Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos en los insectos.	25
	5.7 <i>Beauveria bassiana</i>	28
	5.7.1 Clasificación taxonómica.	29
	5.7.2 Ciclo biológico de <i>Beauveria bassiana</i>	30
	5.8 Capacidad de producción enzimática.	31
	5.9 Capacidad antifúngica de hongos entomopatógenos.	32
6	Procedimientos y descripción de las actividades realizadas.	34
	6.1 Actividad antagónica	34
	6.2 producción de enzimas hidrolíticas	35
7	Resultados	37
8	Conclusiones.	52
9	Recomendaciones y limitaciones.	53

10 Bibliografía54

1 Introducción

Cepas aisladas de hongos entomopatógenos fueron usadas para determinar su actividad antagónica contra *Fusarium verticillioides* empleando el método de confrontación dual *in vitro*. Se procedió a realizar la extracción de discos miceliales (5 mm Ø) de cada una de las cepas antagonistas y patógenas utilizando un sacabocado; posteriormente, los discos se depositaron en otra caja Petri conteniendo 15 mL del medio sólido, en extremos opuestos y equidistante a 80 mm de separación entre cada uno de los discos. La habilidad de los hongos antagonistas para reducir la expansión de las colonias de *Fusarium verticillioides* fue medida para determinar el porcentaje de inhibición de *Fusarium verticillioides*. Todas las cepas inhibieron el crecimiento de *Fusarium verticillioides*. Para la producción de enzimas hidrolíticas se utilizó medio de cultivo Czapeck adicionando dos sustratos; Laminarina y quitina. Es importante mencionar que cada dos días se realizará el filtrado y obtención de la solución enzimática hasta finalizar los ocho días de duración del experimento. Transcurrido el período de incubación, se efectuará la separación de la biomasa por filtración con papel filtro Whatman No.1; se toman 10 mL para las siguientes determinaciones: pH, número de esporas.

2 Justificación

El control de los patógenos que causan enfermedades en plantas hasta la fecha se realiza con productos químicos, los cuales se aplican al follaje, a las semillas y al suelo (Ho, 2000); sin embargo, esta dependencia al empleo de productos químicos genera efectos nocivos sobre el ambiente debido a su residualidad (O’Keeffe y Farrell 2000), lo que provoca acumulación en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales; además de que generan resistencia por parte de los fitopatógenos (Elad, 2000a), sin olvidar el detrimento que causa en la salud humana. Actualmente con el propósito de promover la producción sustentable y sana de alimentos, se ha propuesto el desarrollo de estrategias de control alternativas, menos tóxicas y seguras, que no atenten contra la ecología y la salud humana y de los animales.

Con lo antes mencionado, la búsqueda de alternativas al uso de los plaguicidas es de gran valor, razón por la que con mayor frecuencia los investigadores dirigen la mirada hacia los microorganismos, que pueden ser usados como agentes biocontroladores de microorganismos fitopatógenos. El desarrollo de hongos entomopatógenos para el control de plagas de insectos ha experimentado en los últimos años un considerable progreso. El empleo de estos agentes de control biológico presenta numerosas ventajas, seguridad para la salud humana y para la fauna útil, reducción de la presencia de residuos insecticidas en los alimentos e incremento de la biodiversidad del medio. Los hongos son únicos y sobresalientes entre los microorganismos entomopatógenos porque infectan a los hospedantes a través del tegumento, acción por contacto, lo que les confiere ventaja para el control de varios grupos de insectos fitófagos de gran relevancia en la agricultura.

El interés en los agentes de control biológico, está creciendo, porque ellos son seguros, (tienen un blanco específico), no contaminan y algunas veces son más efectivos que los químicos. Algunos de los productos químicos más letales conocidos han sido desarrollados y esparcidos a través de todo el ambiente. Aunque ellos son efectivos en un período de tiempo corto, los plaguicidas químicos son caros y dan solamente un remedio temporal, ya que las capacidades reproductoras y evolutivas de los insectos les permiten desarrollar mecanismos de resistencia a estas y otras estrategias de control.

Debido a que las hidrolasas como quitinasas y glucanasas se han identificado como las responsables de la degradación de la pared celular de los hongos (Adam, 2004), las enzimas de los hongos entomopatógenos que hidrolizan estas estructuras pueden ser empleadas con fines de control biológico.

3 Objetivos

Objetivos Generales.

Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de diferentes aislados de hongos entomopatógenos para el control de *Fusarium verticillioides*.

Objetivos Específicos.

- Determinar el grado de antagonismo de los aislados de hongos entomopatógenos para controlar el crecimiento de *Fusarium verticillioides*.
- Evaluar las condiciones de crecimiento de los aislados de hongos entomopatógenos en medios enriquecidos con quitina y laminarina.

4 Descripción del área de trabajo

Este proyecto se realizó en Carretera Panamericana Km 1080, Terán 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chis. En el laboratorio de biotecnología vegetal, en el instituto tecnológico de Tuxtla.

5 Marco teórico.

5.1 Hongos fitopatógenos

La patogenicidad está definida como la capacidad en este caso de un microorganismo para causar daño en un hospedero. Por lo anterior, un microorganismo patógeno causa enfermedad sólo cuando el daño incurrido en su hospedero es tal que afecta su estado de equilibrio. El daño causado al hospedero puede ocurrir como consecuencia de la acción microbiana directa sobre los tejidos o como consecuencia de la respuesta de defensa del microorganismo o ambos (Casadevall y Pirofski, 1999).

Los hongos son organismos eucariotas, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y de tejidos conductores. Más de 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen solo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que le sirven de hospedero durante todo su ciclo de vida, otros requieren de una planta hospedera durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en medios artificiales, y más aún, otros se desarrollan y reproducen tanto en plantas vivas como en materia orgánica muerta (Agrios, 1991).

5.2 Generalidades del género *Fusarium*.

5.2.1 Patogénesis en animales, humanos y plantas.

La patogenicidad está definida como la capacidad en este caso de un microorganismo para causar daño en un hospedero. Por lo anterior un microorganismo patógeno causa enfermedad solo cuando el daño incurrido en su hospedero es tal que afecta su estado de equilibrio (Casadevall y Pirofski, 1999).

Sin embargo una diferencia importante entre la patogénesis de vegetales y animales es que estos últimos tienen sistemas inmunológicos adaptables que pueden responder ante antígenos fúngicos en caso de infecciones. Aunque el sistema inmunológico puede mediar la protección también puede producir respuestas que aporten al aumento de la enfermedad (MacDonald *et al*; 2002)

Los hongos fitopatógenos aunque no tienen que competir con un sistema inmunológico tan desmedido como el de los animales o humanos, debe poseer, en cambio, poderosos mecanismos físicos y enzimáticos para perforar la pared celular de la planta (Casadevall, 2007).

Aunque los hongos son los principales patógenos tanto en vertebrados como de invertebrados (Ratallick *et al*; 2004). De modo interesante Casadevall (2005) reportó que especialmente los mamíferos incluyendo al hombre son relativamente más resistentes a enfermedades fúngicas en contraste con enfermedades bacterianas o parásitas. La asociación entre una alta temperatura y una sensibilidad relativamente baja a enfermedades fúngicas puede ser una respuesta a la cual los mamíferos incluyendo al hombre son un poco más resistentes a las patologías fúngicas. Lo anterior parte del hecho que la mayoría de los hongos tienen como temperatura óptima de crecimiento aproximadamente entre 22°C – 28°C; además si se compara su tasa de crecimiento con las de las bacterias la de los hongos es mucho más bajas (Carlile, 1994), lo que sugiere que la elevada temperatura de los animales proporciona una barrera de protección térmica que excluye la posibilidad que la mayor parte de las especies fúngicas sean patógenas para esta clase de hospederos (Casadevall, 2005).

El género de *Fusarium* es el agente casual del marchitamiento vascular, enfermedad que afecta una gran variedad de cultivos (ajo, algodón, arveja, banano, brócoli, calabacita, cebolla, chile, fresa, linaza, melón, ornamentales- clavel, crisantemos, gladiolos, tulipanes, repollo, maíz, tomate, etc.) económicamente importantes alrededor de todo el mundo (Ortoneda, *et al*; 2004; Groenewald, 2006).

Fusarium crece rápidamente en agar papa dextrosa a 25 °C, produciendo un micelio algodonoso e incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa pálido, rojo o púrpura (Díaz de Castro *et al*; 2007).

Este patógeno produce un micelio septado hialino que produce tres tipos diferentes de esporas asexuales. Los microconidios son producidos en el micelio aéreo solo o en cadenas, tiene de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones. Estas esporas son las que el hongo forma con más frecuencia en el interior de los vasos sanguíneos de las plantas infectadas, o en el torrente sanguíneo en el caso de animales y humanos (Díaz de Castro *et al*; 2007). Las macroconidias son esporas típicas de *Fusarium*, están constituidas por 3 o 5 células, que se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. Aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno, estas macroconidias son producidas en una estructura especializada, el esporodoquio, una masa de monofiálides cortas que sostienen las macroconidias. Además pueden producirse en el micelio aéreo ya sea en el monofiálides o polifiálides. El último tipo de espora son las clamidosporas, que están constituidas por una o dos células, son esporas redondas de pared gruesa lisa o rugosa y contiene un material lipídico que le permite al hongo sobrevivir en situaciones adversas. Pueden estar solas, en pares, cadenas o grupos. Estos tres tipos de esporas se forman en el cultivo del hongo y quizá también en el suelo, aunque cabe decir que sólo las clamidosporas sobreviven en este último sustrato durante más tiempo (Díaz de Castro *et al*, 2007).

Fusarium oxysporum junto con *Fusarium solani* y *Fusarium verticillioides*, son los responsables prácticamente de todos los casos de infección invasivas en animales y humanos así como se producen lesiones diseminadas como queratomocosis, úlceras

y onicomiosis, además de ser los principales patógenos de plantas (Pontón *et al*, 2000; Chade *et al*, 2003; Ortoneda *et al*, 2004).

5.2.2 Principales síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos

Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de tipos diferentes de síntomas. Los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (Agrios, 1991).

5.2.3 Desarrollo de la enfermedad.

La infección es el proceso mediante el cual los patógenos entran en contacto con las células o tejidos susceptibles de un hospedero y en el que se producen nutrientes suficientes para ambos. Durante la infección, los patógenos se desarrollan o reproducen dentro de los tejidos de las plantas, animales o humanos e invaden a estos en forma variable. De esta manera, la invasión del patógeno sobre los tejidos, el crecimiento y reproducción (colonización) en los tejidos infectados constituyen dos fases concurrentes en el desarrollo de una enfermedad dentro del proceso infeccioso (Llácer *et al*; 2000).

Durante la infección en plantas, el fitopatógeno obtiene sus nutrientes a partir de células vivas que con frecuencia no son destruidas, otros destruyen a las células y utilizan sus contenidos conforme las invaden, y otros matan a las células y desorganizan a los tejidos que se encuentran alrededor de ellos.

Durante la infección; los patógenos liberan en el hospedero ciertas sustancias biológicamente activas (por ejemplo, enzimas, toxinas y reguladores de crecimiento) que afectan la integridad estructural de las células del hospedero o bien sus procesos fisiológicos. En respuesta a los patógenos, las plantas reaccionan con una gran variedad de mecanismos de defensa que dan como resultado diferentes grados de protección de la planta ante el patógeno (Agrios, 2005; Llácer *et al*; 2000). Aunque las infecciones efectivas dan como resultado la formación de zonas necróticas o de zonas decoloradas y malformadas (Ortoneda *et al*; 2004).

5.2.4 Colonización de los tejidos del huésped.

Se cree que los hongos patógenos perjudican las células de su hospedero causando enfermedad mediante la acción individual o combinada de cuatro mecanismos fundamentales de patogénesis (Llácer et al., 2000, Rehman et al., 2013)

1. La producción y liberación de enzimas para la degradación de la pared celular y la cutícula.
2. La producción y liberación de sustancias (toxinas) que interfieren con el metabolismo o que afectan la estructura normal del citoplasma (animal y humano) y protoplasma (plantas).
3. La producción y liberación de sustancias que interfieren con el control normal del crecimiento y desarrollo (compuestos hormonales, antihormonales, u otros), causando la interrupción no solo del crecimiento, sino de la diferenciación de las células y los tejidos.
4. La interferencia con los movimientos normales del agua, nutrientes y metabolitos.

Durante la infección en plantas, el fitopatógeno obtiene sus nutrientes a partir de células vivas que con frecuencia no son destruidas, otros destruyen a las células y utilizan sus contenidos conforme las invaden, y otros matan a las células y desorganizan a los tejidos que se encuentran alrededor de ellos. Durante la infección, los patógenos liberan en el hospedero ciertas sustancias biológicamente activas (por ejemplo, enzimas, toxinas y reguladores del crecimiento) que afectan la integridad estructural de las células del hospedero o bien sus procesos fisiológicos (Rehman et al., 2013).

5.3 Fusarium verticillioides.

Las colonias son de crecimiento moderadamente rápido, de 8 cm a los ocho días, de color blanco a durazno. Las microconidias son abundantes, generalmente de una célula, de ovala a ovoide, en largas cadenas o en falsas cabezas. Los conidióforos son largos, no ramificados y ramificados, monofiliades y polifiliades. Las macroconidias están presentes pero son escasas, y varían levemente de su forma curva a casi rectas, de paredes delgadas. Las clamidosporas están ausentes (Sanabria *et al.*, 2002; agrios, 2005).

Fusarium verticillioides es un hongo cosmopolita, pero con cierto predominio en zonas tropicales y subtropicales. Puede causar queratitis, endoftalmitis, infecciones cutáneas y en ocasiones infecciones diseminadas. El crecimiento en APD es rápido, unos 40 mm en una semana con abundante micelio aéreo algodonoso, de color blanco a melocotón o rosa salmón que se tiñe de color azulado o púrpura en pocos días. El color del reverso varía de crema a lila, vino tinto o púrpura.

5.3.1 Clasificación taxonómica

Reino *Fungi*

Phylum *Ascomycota*

Clase *Deuteromycete*

Orden *Hypocreales*

Familia *Hypocreaceae*

Género *Fusarium*

Especie *Fusarium verticillioides*

Clasificación taxonómica de fusarium según Groenewald (2006) y Diaz de castro *et al*; (2007).

5.4 Fusarium verticillioides en la agricultura

La especie *F. verticillioides* se distribuye por todo el mundo, y con alta frecuencia es aislada del maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas cuantiosas que varían año con año. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, así como las condiciones ambientales. El clima caliente y húmedo favorece la pudrición de la mazorca durante el periodo de llenado de grano.

5.4.1 Mecanismo de infección del patógeno

Uno de los aspectos que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides* en el maíz es que el hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo incluyendo el suelo, el aire y la transmisión vectorial, cada uno afecta diferentes partes de la planta, incluyendo las semillas, las sedas, las raíces, las hojas y las orejas, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (Figura 2.1). Las semillas en germinación son el objetivo más común, a esta vía se le denomina infección sistémica (Foley, 1962). Esta infección puede comenzar a partir de conidios de hongos o micelios ya sea dentro de las semillas o en la superficie de la semilla y ocurre hasta el establecimiento de las plántulas, como el hongo sobrevive –ya sea en la semilla o en el suelo–, se encuentra estratégicamente

posicionado para infectar a la planta (Lanubile *et al.*, 2010). En el suelo, *F. verticillioides* puede penetrar en la planta a través de las raíces y del mesocótilo, las hifas colonizan las células del parénquima del escutelo y llegan hasta el córtex. Entre 25 y 30 días, las raíces y el mesocótilo ya se hallan colonizados y pueden mostrar síntomas de pudrición, dependiendo de la cantidad de inóculo y de factores ambientales. En el tallo no hay muchas hifas, de ahí que la infección puede cursar de manera asintomática hasta ciertos tejidos (Oren *et al.*, 2003). Aunque el hongo es capaz de translocarse por el tallo y llegar a la nueva mazorca en desarrollo; el único sitio que parece limitar su paso es el tejido de transición entre la corona de la plántula y el tallo (Munkvold *et al.*, 1997a).

La vía más común para que *F. verticillioides* infecte a la mazorca es a través del estigma. Lo anterior sucede cuando el inóculo aéreo y las conidias transportadas por el agua de lluvia se depositan en el estigma. De esa forma, se facilita el acceso a las células del pericarpio y la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula para poder acceder al grano, a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas. Se cree que esta estrategia sea la vía principal para la infección del núcleo (Munkvold *et al.*, 1997a).

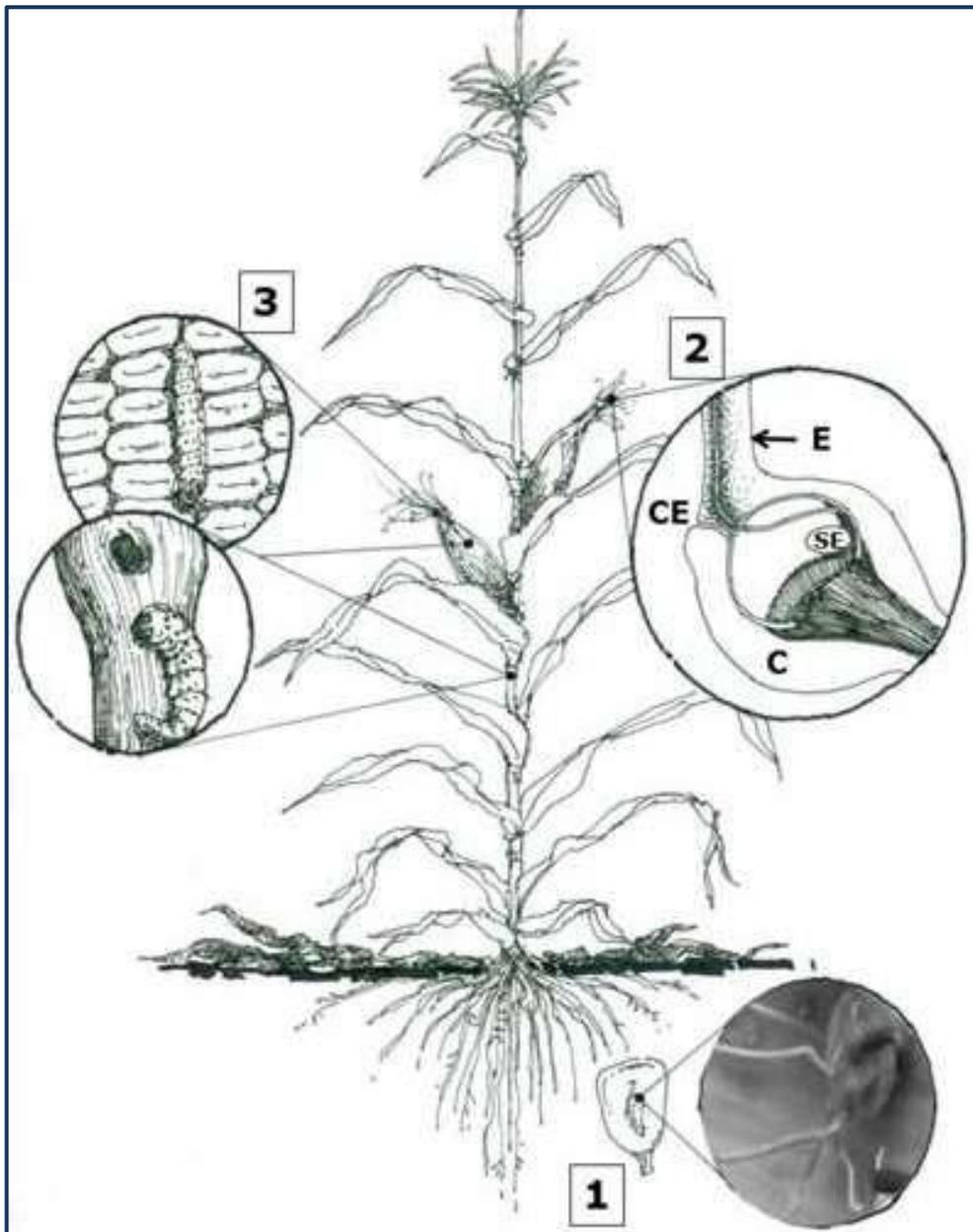


Figura 5. 1. Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. El hongo sobrevive en la semilla o en el suelo de donde accede a la plántula e infecta las raíces. 2. Infección a través del estigma. Las conidias del hongo son depositadas en el estigma (E) y penetran a través de la parte inferior del canal estilar (CE). C: carpelo, SE: saco embrionario. 3. Infección a través de heridas. El hongo accede al tallo y/o a la mazorca a través de lesiones mecánicas causadas por insectos al alimentarse.

La Infección del tallo y la mazorca también se producen a través de las heridas causadas por insectos, es decir por daño mecánico. Al alimentarse, varios insectos –plagas del maíz– horadan las mazorcas y los tallos de la planta. Este daño mecánico funciona como ruta de entrada para las conidias de *F. verticillioides*. Además, hay insectos que actúan como vectores del hongo, ya sea dispersándolo a lo largo de la superficie de la planta hacia los granos – como el gusano barrenador *Ostrinia spp.*, (Munkvold *et al.*, 1997b) o, bien, transportándolo a través de grandes distancias –como el gusano de la raíz (*Diabrotica sp.*)–. Otros vectores descritos son el gusano elotero –en sus fases de larva y de adulto–, los trips y los gorgojos. Evidentemente las rutas de infección mencionadas no son excluyentes y en el campo las plantas son atacadas a través de una o más de estas vías y por distintas cepas del patógeno.

Los síntomas de la infección son excepcionalmente variables, desde asintomática, sin signos de infección a una enfermedad severa que resulta en descomposición completa o marchitamiento. Debido a que la planta puede permanecer asintomática durante todo el ciclo de la enfermedad, la infección puede pasar desapercibida (Brown *et al.*, 2007). *F. verticillioides* es un hongo endofítico que crece sistémicamente dentro de la planta (Bacon y Hinton, 1996). Anteriormente, se desconocían las ventajas de la relación endófita planta- hongo sin síntomas. Yates *et al.*, (1997) encontraron que en las infecciones asintomáticas, las hifas crecen intercelularmente en las raíces y los brotes de las plantas infectadas, pero el crecimiento tiene una distribución limitada en las hojas, lo cual se manifiesta en un incremento en el peso seco de raíz de las plántulas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* en comparación al de las plantas de semillero no infectadas. Williams *et al.*, (2007) demostraron que el crecimiento de la raíz se estimula con dosis bajas de fumonisinas 1 (FB1 principalmente).

El siguiente paso en el establecimiento de la infección supone la penetración de los hongos patógenos en sus hospedadores. La penetración puede tener lugar mediante tres mecanismos:

Mecánica: existen algunas especies de hongos que penetran en la planta hospedadora a través de heridas causadas por procesos naturales (caída de hojas, formación de raíces secundarias, etc.) Prácticas agrícolas (poda, recolección, etc.) O ataques por insectos (Agrios, 1991). Las heridas naturales o artificiales pueden dar lugar a la exudación de nutrientes y a la exposición directa del xilema, hacia el cual son absorbidos los propágulos fúngicos (Llácer *et al* 2000).

Digestión enzimática: La penetración también puede producirse por digestión enzimática de la cutícula y la pared celular. La producción de cutinasas por parte de determinados hongos es determinante en la invasión de las plantas, lo que ha quedado demostrado mediante la inhibición de esta enzima con anticuerpos o inhibidores químicos, que ocasionan una reducción de la virulencia del hongo. En general, las enzimas que degradan las barreras celulares son consideradas porque juegan un papel importante en la patogénesis animal, humana y vegetal causada por hongos, debido a que estas enzimas facilitan la penetración y colonización tisular, para dar paso a continuación a los determinantes de virulencia los cuales van a ser responsables del desarrollo de los síntomas una vez inicie el crecimiento del hongo dentro del hospedero (Agrios, 2005).

Aberturas naturales como las lenticelas en tallos y frutos, por los estomas en las hojas, siendo esta última la ruta más común (Alexopoulos, 1985).

Otros hongos fitopatógenos penetran directamente a través de la superficie intacta de la planta por medio de los tubos germinativos, por medio de apresorios o agregados hifales más complejos que reciben el nombre de cojines de infección. La penetración de la cutícula es seguida por un crecimiento subcuticular o intramural, que puede en ocasiones verse interrumpido dando lugar a infecciones latentes (Alexopoulos, 1985; Agrios, 1991).

5.5 Maíz.

5.5.1 Descripción botánica.

La especie botánica maíz (*Zea mays*) es una gramínea que pertenece a la tribu Maideas y a la familia Poaceae (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud alcanzando alturas de 1 a 5 m, con pocos macollos o ramificaciones, su aspecto recuerda al de una caña de azúcar por la presencia de nudos y entrenudos y su médula esponjosa. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo; se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema floral, de tamaño y ancho variable. Las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias, que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, ambas tienen la misión de mantener a la planta erecta (Jugenheimer, 1988).

El maíz es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina es terminal, se conoce como panícula (o espiga) consta de un eje central o raquis y ramas laterales; las inflorescencias femeninas (mazorcas) se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas de forma cilíndrica que consisten de un raquis central u olote donde se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla con dos flores pistiladas una fértil y otra abortiva; estas flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis, un estilo muy largo donde germina el polen. El maíz es una planta de polinización abierta (anemófila) propensa al cruzamiento. La polinización ocurre con la

transferencia del polen, por el viento, desde la espiga a los estigmas (cabellos) de la mazorca. Cerca del 95% de los óvulos son fecundados con polen de otra planta y un 5% con el mismo polen, aunque las plantas son completamente autocompatibles. En la mazorca cada grano o semilla es un fruto independiente llamado carióspside que está insertado en el raquis cilíndrico u olote (Jugenheimer, 1988).

5.5.2 Importancia del cultivo de maíz.

El maíz es el cultivo de mayor relevancia a nivel mundial por el volumen de su producción, la gran diversidad de su uso y por producirse en países de todos los continentes en condiciones extremadamente diferentes. En México, la producción de maíz se destina predominantemente al consumo humano y, en menor medida para el consumo pecuario e industrial, lo que permite la generación de productos elaborados desde la tortilla hasta los cereales de mesa, aceites comestibles, frituras, almidones y fructosa; también es utilizado como alimento para el ganado en forma directa o es canalizado a la industria de alimentos balanceados, principalmente para aves y cerdos (UACH, 2001).

La importancia del maíz en el sector agrícola se aprecia a través de su alta participación en la dieta nacional, en la superficie sembrada y su peso relativo en el valor de la producción. México es el principal productor mundial de maíz blanco, en virtud de su alto contenido nutricional se produce exclusivamente para el consumo humano; en tanto que el maíz amarillo se destina al procesamiento industrial y a la alimentación animal (UACH, 2001).

Desde el punto de vista alimentario, económico y social el maíz es el cultivo de mayor importancia en México, teniendo una producción de 23.3 millones de toneladas de maíz blanco para el presente año, lo que representaría un aumento

estimado de 4.7 por ciento y se fortalecerá la autosuficiencia en la producción de este grano básico para la alimentación de los mexicanos. De acuerdo con un informe de la dependencia federal, este incremento durante el año comercial (octubre 2016-septiembre 2017) representaría un volumen adicional de cerca de un millón de toneladas con respecto al periodo anterior. Sinaloa es el principal estado productor seguido de Jalisco, Estado de México, Michoacán, Guanajuato, Chihuahua, Guerrero, Veracruz y Chiapas, que en conjunto generan un volumen de producción de 17, 528, 281 toneladas de maíz grano a nivel nacional. En México existe una gran diversidad de variedades de maíz, sin embargo se produce y cultiva el maíz blanco en la mayor parte de la superficie sembrada del país (SAGARPA, 2017).

5.6 Generalidades de los hongos entomopatógenos.

En los últimos 50 años, la investigación en la protección de los cultivos contra los insectos plaga ha estado enfocada al uso de agentes de biocontrol (BCA) (Whipps y Lumsden, 2001). La creciente inquietud por los efectos nocivos sobre la salud causados por las prácticas de la agricultura tradicional intensiva que involucra el uso de insecticidas sintéticos; la aparición de resistencia a los insecticidas químicos en algunos insectos de importancia económica hacen que haya un interés cada vez mayor en el uso de insecticidas de origen biológico (Glare *et al.* 2012). En consecuencia, desde mediados del siglo XX ha habido gran expansión del mercado en base a hongos patógenos con actividad selectiva contra las plagas de insectos (López-Pérez *et al.* 2014). El uso de estos métodos de control se deriva de una disciplina denominada control biológico, que se basa en el principio natural en que muchas especies de organismos se alimentan, viven y se reproducen sobre otras, cuyas poblaciones son reguladas por las primeras en los diferentes ecosistemas, indirectamente esto logra que las

cantidades alcanzadas por los grupos poblacionales no sean nocivas al sistema (Madrigal, 2001). Ernest y Brown (2001) definen la homeostasis como “las interacciones compensatorias entre especies, que producen estabilidad en un ecosistema”, en consecuencia los hongos entomopatógenos y las enfermedades que de forma natural causan en los insectos son un ejemplo claro de esta relación y el control biológico es el aprovechamiento de estas interacciones regulatorias para disminuir las poblaciones de una plaga.

Entre los microorganismos entomopatógenos, los hongos son considerados controladores promisorios, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula y poseen múltiples mecanismos de acción que les confieren una alta capacidad para evitar que el hospedero despliegue mecanismos de resistencia (Hayek y Leger, 1994). Sin embargo, su crecimiento y desarrollo está limitado por las condiciones ambientales externas, en particular por la humedad, la radiación solar y la temperatura, que determinan la adecuada esporulación y germinación de las conidias (Tanada y Kaya, 1993).

5.6.1 Mecanismos de acción de hongos para control de enfermedades fitopatógenas.

Las enfermedades presentes en las plantas son las responsables de una pérdida total anual del cultivo valorado en más de 200 billones de euros (Agrios, 2005). La mayoría de estas enfermedades son causadas por hongos como *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* y *Thielaviopsis*, algunas bacterias tales como *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* y *Streptomyces scabies* y nematodos como *Meloidogyne incognita*. La habilidad de los hongos empleados como antagonista de fitopatógenos para lograr la reducción de las enfermedades provocadas en los cultivos son bien conocidas, entre ellos, competencia por nutrientes que es

indispensable para la germinación de esporas o sitios de infección (Goldman et al., 1994). El micoparasitismo, que hace referencia al papel de diferentes sustancias y la antibiosis con la producción de enzimas así como los metabolitos secundarios, siendo estos últimos clave para muchas interacción que causan la destrucción del patógeno (Jensen y Wolffhechel, 1995).

Se tiene registro de un número de agentes de control biológico y que además están disponibles como productos comerciales, donde también se incluyen cepas pertenecientes al género *Bacteria* como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*; mientras que del género *Fungi* encontramos a *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*. Siendo *Trichoderma* el hongo que de manera frecuente se ha aislado del suelo y está presente en el ecosistema de las raíces de plantas (Harman et al., 2004). De lo anterior, se tiene conocimiento que *Trichoderma* es un hongo oportunista, no virulento para las plantas y tiene una función parasitaria y antagonista de muchos hongos fitopatógenos, permitiendo la protección de las plantas hacia las enfermedades. Además, es de los agentes de control biológico más estudiados y comercialmente empleado como biopesticida, biofertilizante y reparador del suelo (Harman et al., 2004; Lorito et al., 2004).

5.6.2 Proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos en los insectos.

La mayoría de estos hongos son patógenos obligados o facultativos que causan en el insecto enfermedades denominadas micosis (Tanada y Kaya, 1993). El proceso infeccioso comienza con la Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto este proceso está directamente relacionado con el tipo de conidias y la hidrofobicidad de la cutícula del insecto, cuando las conidias crecen aéreamente se unen bien a superficies hidrofóbicas pero la adhesión a superficies hidrofílicas es débil; las conidias que crecen sumergidas se unen bien a ambos tipos de superficies y las blastosporas (In vitro) se unen de una manera fuerte a superficies hidrofílicas y débilmente a superficies hidrofóbicas (Holder y Keyhani, 2005). La adhesión de las conidias también puede estar influenciada

por la topografía cuticular, la presencia de setas o espinas puede facilitar este proceso (SosaGomez *et al.* 1997). Una vez la conidia se ha adherido comienza el proceso de germinación que es el retorno de la actividad o metabolismo vegetativo, morfológicamente es la emergencia de la célula vegetativa en forma de un tubo germinativo que crece sobre la superficie cuticular formándose un apresorio que penetra la cutícula (Vargas, 2003), factores como la humedad ambiental, la temperatura y estado de desarrollo, parte del cuerpo y balance nutricional del insecto pueden influenciar la germinación de la conidia de un hongo entomopatógeno (Volcy y Pardo, 1994; Tanada y Kaya, 1993). La rápida germinación de las conidias puede ser una ventaja ya que evita la exposición a ambientes que pueden ser adversos para el hongo y reduce la posibilidad de que el insecto tenga una respuesta al ataque del mismo (Vega *et al.* 2012). Una vez la conidia ha germinado comienza la penetración en la cutícula del hospedero que ocurre como resultado de una Caracterización de hongos entomopatógenos asociados a insectos plaga de palma de aceite (*Elaeis guinnensis* Jacq) 24 combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el extremo de una hifa invasiva que forma un botón de penetración donde la capa cuticular es deformada por presión (Tanada y Kaya, 1993; Humber, 2009).

El mecanismo químico de penetración de la cutícula involucra una serie de enzimas como proteasas, aminopeptidasas, esterases, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración (Vega *et al.* 2012). Durante este proceso de penetración en algunos casos se produce una respuesta no celular, llamada melanización cuticular que puede retardar o detener el proceso de germinación mediante el endurecimiento de la cutícula que forma una barrera contra la penetración del hongo (Humber, 2009; Schrank y Vainstein, 2010). Una vez que el hongo atraviesa la cutícula debe vencer el sistema inmunológico del hospedero antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto (Madrigal, 2001). Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos pasan a una fase levaduriforme o de crecimiento por

gemación. Las infecciones causadas por hongos en su gran mayoría tardan más de dos días en causar la muerte del hospedero.

Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física de sus tejidos (Bustillo, 2001). En la medida que avanza el proceso de infección el hongo crece y comienza a absorber una proporción cada vez mayor de nutrientes del hospedero, se da una creciente competencia por el oxígeno disuelto disponible y por el crecimiento de las estructuras del hongo se produce una invasión del espacio que impide la circulación de la sangre a través del hemocele (Humber, 2009). La colonización del hemocele por el hongo produce una alteración del estado fisiológico del insecto y de sus funciones de excreción y respiración provocando la muerte del insecto (Humber, 2009).

5.7 *Beauveria bassiana*.

La primera especie de hongo entomopatógeno utilizada para el control biológico de plagas fue *B. bassiana*, siendo un género factible para la reproducción masiva (Hernández- Velázquez *et al.*, 1996) y se han aislado numerosas cepas con actividad insecticida contra una gran variedad de insectos plaga. Es la especie más distribuida del género, así mismo se encuentra en un amplio rango de ambientes tanto de manera endófito como mutualista (suelo, rizósfera, superficie e interior de plantas) y se ha adaptado a una gran cantidad de hospederos (Zimmerman, 2007), razón por la que es ampliamente estudiada y empleada como un agente de control biológico.

El género *Beauveria* es un hongo entomopatógeno con hifas septadas, contiene estructuras reproductivas llamadas conidióforos, sobre las cuales se desarrollan las conidias. El micelio de *Beauveria* se ramifica para formar los conidióforos, que son simples e irregulares y terminan en vértice formando racimos, la base de la célula conidiógena es globosa presentando un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios, estos conidios también son globosos de 2-3 x 2.0 µm (Humber, 1998, Gallegos, 2004).

El desarrollo completo lo alcanza a los 21 días a 27°C en medio sólido; se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodonoso o amarillento cremoso (Hernández-Velázquez *et al.*, 1996).

5.7.1 Clasificación taxonómica.

Con la actualidad de las técnicas moleculares se presentan variaciones en la clasificación taxonómica de los hongos permitiendo que algunos hongos anteriormente clasificados como *Deuteromycetes* se relacionaran con sus correspondientes estadios sexuales y de esta forma se integraron dentro del phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Estos análisis moleculares filogenéticos muestran una organización de linajes divergentes relacionados a la especie sexual *Cordyceps bassiana* (Rehner y Buckley, 2005). De acuerdo a The National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2009)

División *eukarya*

Reino *Fungi*

Phylum *Ascomycota*

Subphylum *Pezizomycotina*

Clase *Sordariomycetes*

Subclase *Hypocreomycetidae*

Orden *Hypocreales*

Familia *Cordycipitaceae*

Genero *Beauveria*

Especie *Beauveria bassiana*

5.7.2 Ciclo biológico de *Beauveria bassiana*.

Presenta un ciclo dimorfo del crecimiento, cuando hay ausencia de hospedero específico, pasa a través de un ciclo vegetativo asexual que incluye germinación, crecimiento micelial y formación de conidias. Cuando se presenta un hospedero se cambia a un ciclo patógeno donde las conidiosporas germinan en la superficie de la cutícula y los tubos germinativos penetran el integumento del hospedero directamente. (Culebro Ricaldi, 2017)

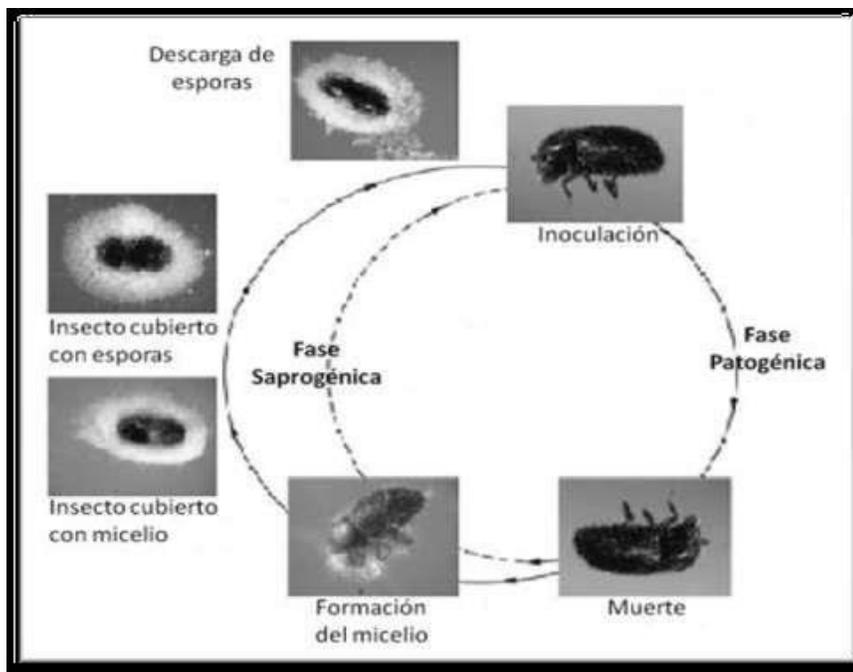


Figura 5.2. Ciclo biológico de *Beauveria bassiana*.

Una vez habiendo penetrado la cutícula, el hongo altera su morfología de crecimiento y produce cuerpos hifales que proliferan por gemación. En seguida de la muerte del hospedero, el crecimiento del hongo regresa a su etapa saprófita (Gillespie y Claydon, 1989). En condiciones controladas de laboratorio, Posada (2005) reporta que la fase patogénica dura 4 días en promedio mientras que la fase saprófita es de 6.2 días. Algunos otros autores reportan tiempos entre 3 y 14 días de la fase patogénica (campo); esta variación es dependiente de la cepa

de hongo, ubicación geográfica, dosis de conidios, temperatura, humedad, especie y estadio del insecto (Monzón, 2001).

5.8 Capacidad de producción enzimática.

La acción enzimática de los hongos entomopatógenos aunque es muy compleja, fue posible relacionarla con la capacidad infectiva y la patogenicidad sobre los insectos (Smith *et al.*, 1981). La cutícula de los insectos es una estructura consistente en nanofibras de quitina cristalina integrada a una matriz de proteínas, polifenoles, agua y pequeñas cantidades de lípidos (Vincent y Wegst, 2004), que puede ser degradada por proteasas y quitinasas. Por su parte, la pared celular de los hongos es una estructura compleja compuesta de quitina, glucanos y otros polímeros, formándose un entrecruzamiento entre estos componentes, creando una estructura reticular compleja (Adam, 2004). Debido a que las hidrolasas como quitinasas y glucanasas se han identificado como las responsables de la degradación de la pared celular de los hongos (Adam, 2004), las enzimas de los hongos entomopatógenos que hidrolizan estas estructuras pueden ser empleadas con fines de control biológico.

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las proteínas por sus enlaces peptídicos y son empleados para destruir las proteínas antimicóticas del hospedero, causar proteólisis en la hemolinfa y la desnutrición del hospedero (Tartar y Boucias, 2004), facilita la activación proteolítica para la producción de precursores de diversas toxinas y la liberación consecuente de aminoácidos dando lugar a la producción de aminos, elevando el pH del medio.

De acuerdo al mecanismo de acción, se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. A su vez las endopeptidasas se clasifican en cuatro clases: serin proteasa (EC 3.4.21), cistein proteasa (EC 3.4.22), aspartil proteasa (EC

3.4.23) y metaloproteasa (EC 3.4.24) (Rao *et al.*, 1998); de estas las más comunes en hongos entomopatógenos son las serin-proteasas del tipo subtilisina (St Leger, 1995), aunque también producen proteasas del tipo tripsina denominada Pr2 (Cole *et al.*, 1993). Ambas proteasas son enzimas extracelulares secretadas para la degradación de la cutícula, proporcionando nutrimentos para el hongo (Tiago *et al.*, 2002). De la misma manera como los hongos patógenos utilizan la síntesis de proteasas durante el proceso de infección, los hongos entomopatógenos pueden emplear la misma estrategia en el control de insectos, hongos fitopatógenos, bacterias y nematodos (Khan *et al.*, 2003).

Se han sugerido varias estrategias, una de las cuales es utilizar inductores para permitir el crecimiento de los hongos y así producir eficientemente estas enzimas en medios sólidos o líquidos (Pereira *et al.*, 2007) y además permite que la virulencia de los hongos entomopatógenos se mantenga.

5.9 Capacidad antifúngica de hongos entomopatógenos.

Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo. Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor sea la probabilidad de que un aislamiento de *Trichoderma*, manifieste varios modos de acción; más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, aspectos que no poseen los plaguicidas químicos.

Desde los primeros estudios en esta temática y hasta el presente, entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico, se

encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos.

Trichoderma Rifai como un controlador biológico y antagonista natural de fitopatógenos muestra una amplia gama de hospedantes y dentro de ellos están los hongos fitopatógenos de importancia, tales como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Syd. y Hans, *Fusarium roseum* Link, *Botrytis cinerea* Pers, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp. *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., entre otros.

6 Procedimientos y descripción de las actividades realizadas.

6.1 Actividad antagónica

La actividad de las nueve cepas de hongos entomopatógenos contra *Fusarium verticillioides* será evaluada usando el método de confrontación dual, producción de compuestos volátiles y la producción de HCN. En la confrontación dual, un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada una de las cepas antagónicas (entomopatógenos) con un crecimiento activo de 7 días, se inoculará en el margen de la caja Petri con medio PDA y en el margen equidistante con una separación de aproximadamente 5 cm, se transferirá un disco con crecimiento micelial del hongo fitopatógeno (*Fusarium verticillioides*). Las cajas se mantendrán a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta el momento en que las hifas de ambos hongos entren en contacto. Los experimentos se realizarán con cinco réplicas empleando un diseño experimental completamente aleatorizado. Los controles serán cajas Petri sólo con *Fusarium verticillioides*. El efecto supresor o inhibidor será evaluado empleando el Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento Radial (PICR) de *Fusarium verticillioides* acorde a las mediciones que se efectuarán cada dos días (Gaigole et al. 2011). La habilidad del hongo antagonista para reducir la expansión de las colonias de *Fusarium verticillioides* fue medida para determinar el momento del primer contacto entre los hongos y la zona de inhibición que se logró observar. La evaluación del antagonismo (Tabla 1) se efectuó de acuerdo a la clasificación propuesta por Mbarga et al., (2012).

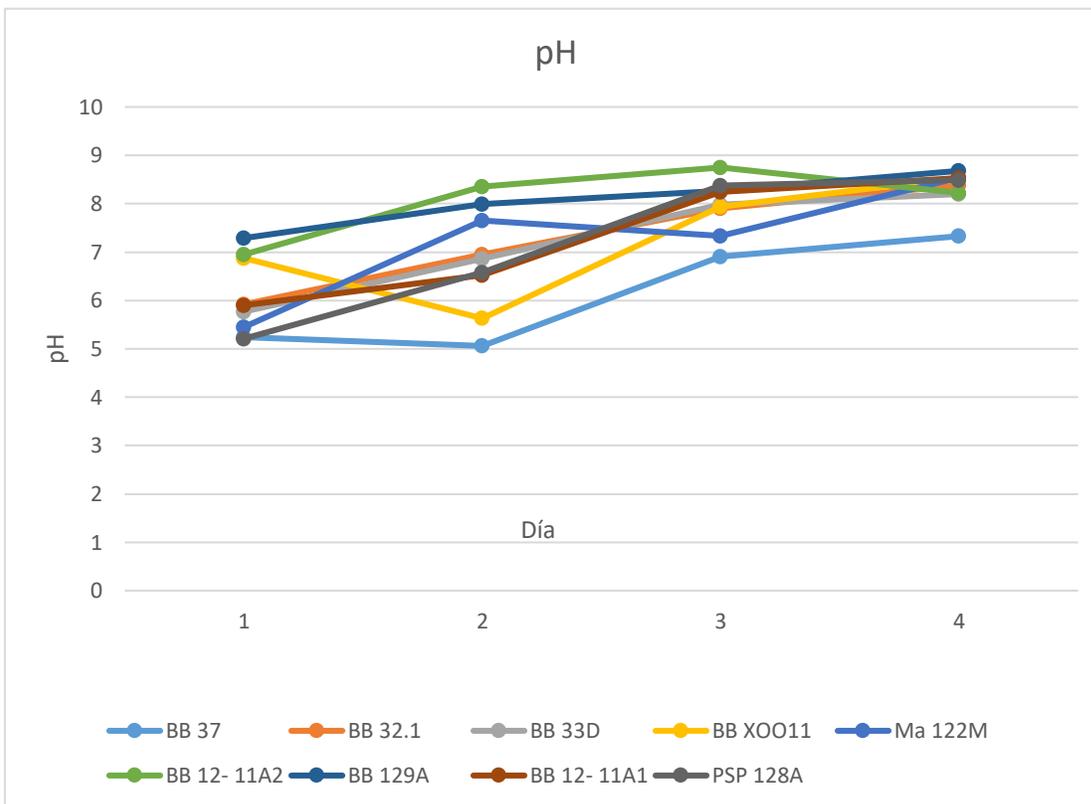
6.2 producción de enzimas hidrolíticas.

Con el propósito de cuantificar la producción específica de quitinasas y glucanasas de las cepas de entomopatógenas, se utilizará la metodología propuesta por Rajeswari, (2015). Matraces Erlenmeyer de 250 mL, se colocarán 50 mL de medio de cultivo. El medio empleado estará conformado por $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; KCl, 0.5g/l; NaNO_3 , 3g/l; K_2HPO_4 , 1 g/l; FeSO_4 , 0.01 g/l; jugo V8, 200 ml y agua destilada, 1000 mL. Como inductores enzimáticos, el medio se suplementará con quitina en polvo, 1% (p/v) ó laminarina, 0.1% (p/v) para la producción específica de quitinasas y glucanasas, respectivamente. Posteriormente, se inocularán con 5 discos miceliales (5 mm Ø) y se incubará a 28°C, 12 h luz/oscuridad en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 8 días (Ahmed Idris et al. 2007). Es importante mencionar que cada dos días se realizará el filtrado y obtención de la solución enzimática hasta finalizar los ocho días de duración del experimento. Transcurrido el período de incubación, se efectuará la separación de la biomasa por filtración con papel filtro Whatman No.1; se toman 10 mL para las siguientes determinaciones: pH, número de esporas.

Tabla 1 Clasificación de antagonismo con la técnica de confrontación dual.

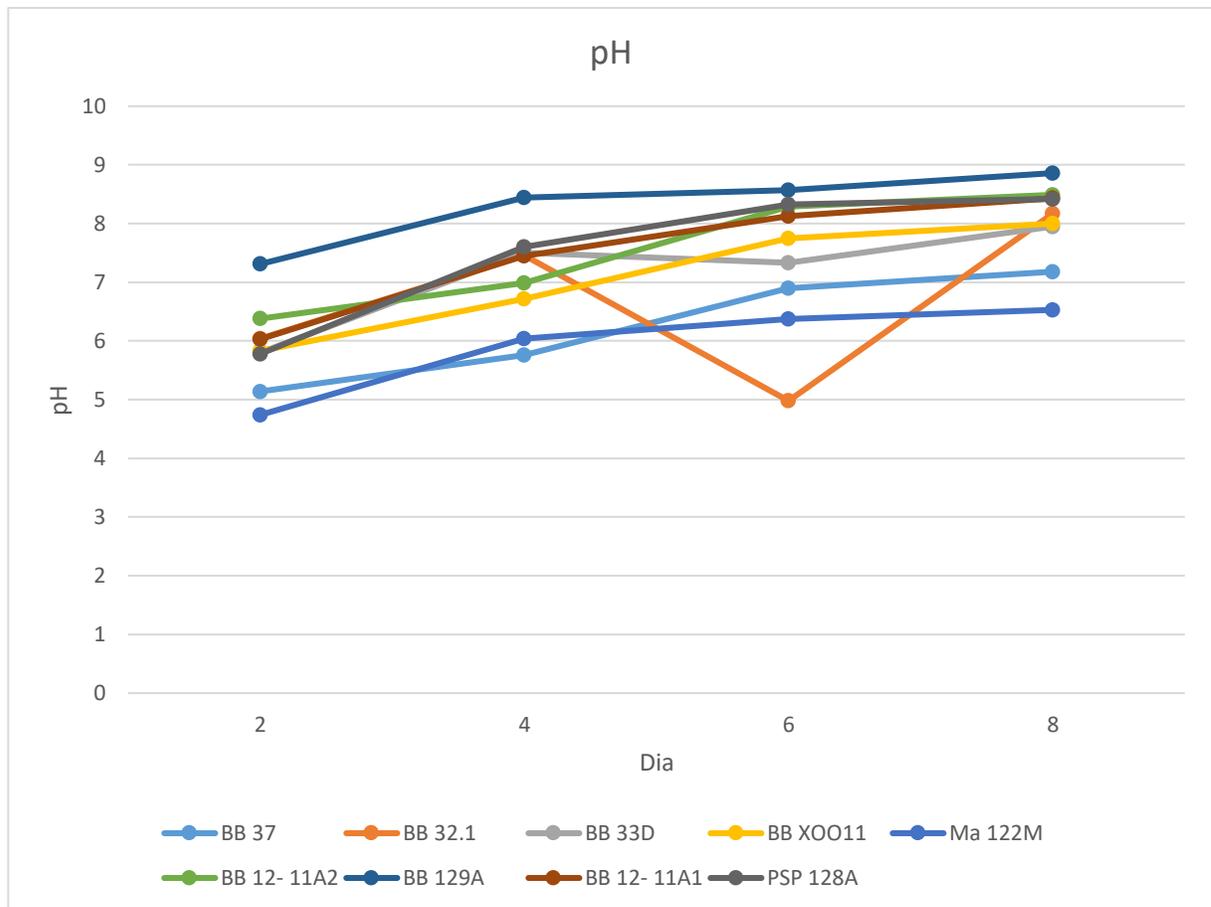
Antagonismo	Características
1	Antagonista crece sobre el patógeno y ocupa la totalidad de la superficie del medio
1.5	Antagonista ocupa el 87.5% de la superficie del medio
2	Antagonista ocupa el 66.6% de la superficie del medio
2.5	Antagonista ocupa el 62.5% de la superficie del medio
3	Antagonista ocupa el 50% de la superficie del medio
3.5	Antagonista ocupa el 37.5% de la superficie del medio
4	Antagonista ocupa el 33.3% de la superficie del medio
5	Antagonista no crece y el patógeno ocupa la totalidad de la superficie del medio

7 Resultados



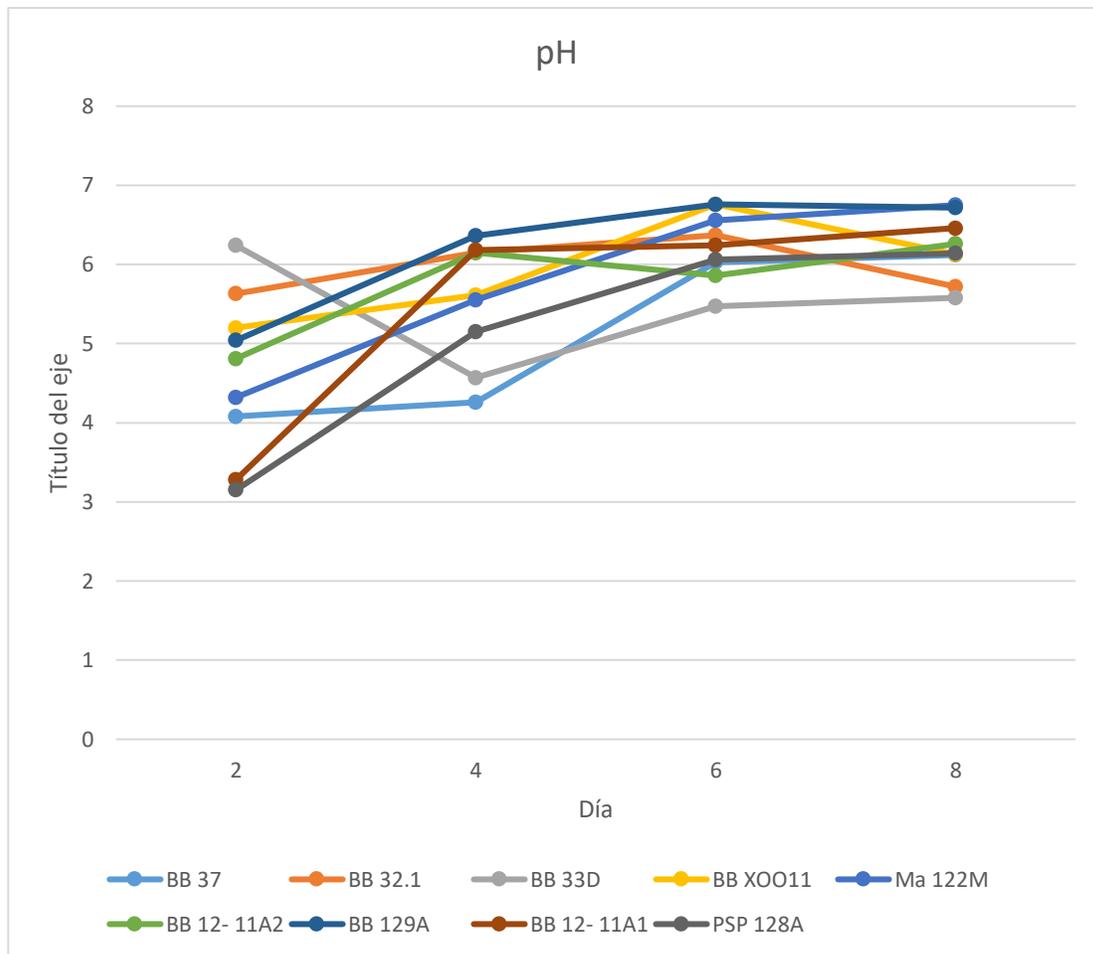
Grafica 1 cuantificación de pH con medio de cultivo Czapeck con jugo V8.

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio Czapeck con jugo V8, se realizó la cuantificación de pH producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. Todas las cepas tuvieron un incremento de pH al finalizar el experimento. Oscilando entre 7.33×10^6 a 8.68×10^6 . Excepto la cepa BB 12-11A1 en el cual tuvo un pH menor en la última muestra.



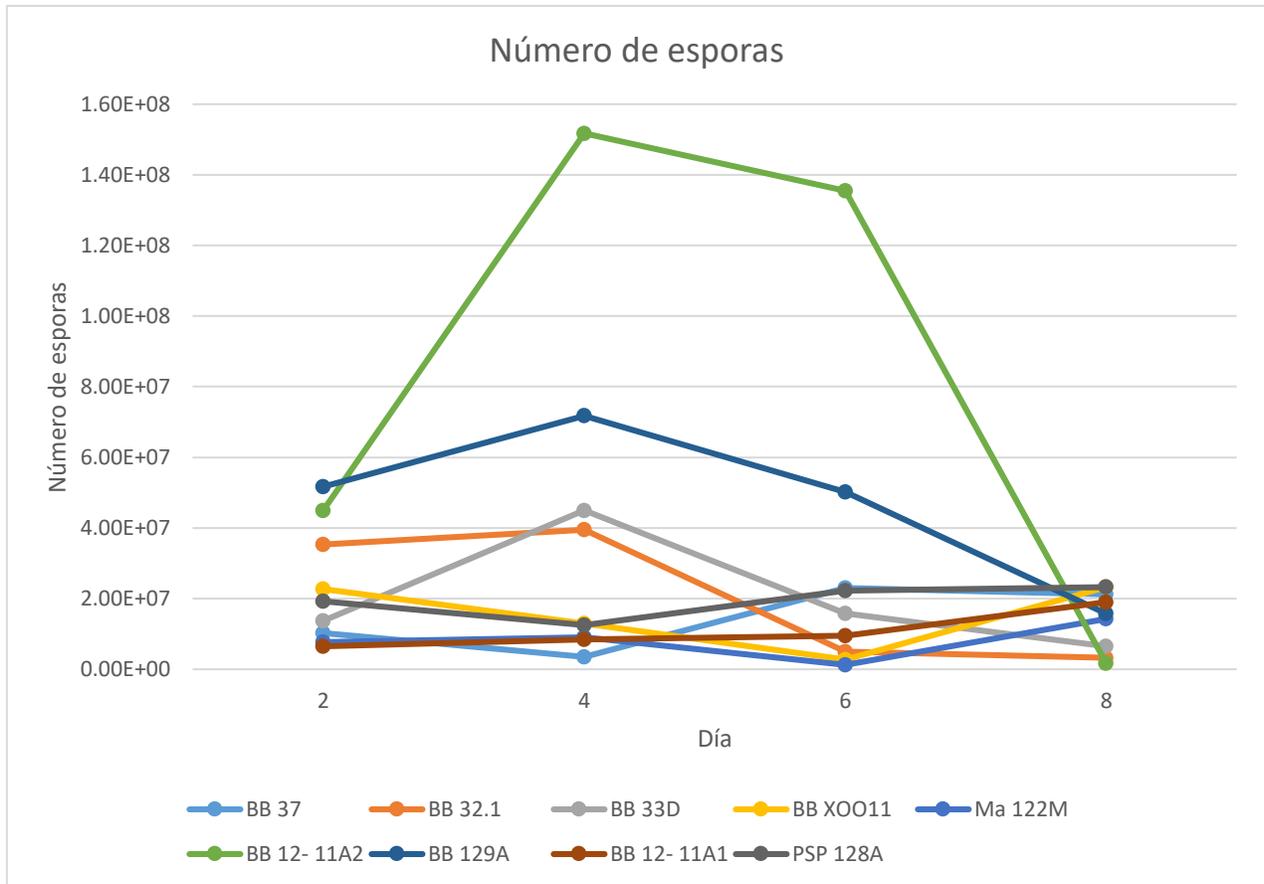
Grafica 2 cuantificación de pH con medio de cultivo Czapeck adicionada con Laminarina.

En la gráfica 2 se observó diferentes tipos de pH en todas las cepas, pero todas tuvieron el mismo comportamiento ya que todas las cepas tuvieron un crecimiento exponencial conforme al tiempo, excepto en la cepa BB 32.1. Se notó que en el día 6 hubo una disminución de pH llegando a los 4.98 pero en el día 8 incremento llegando a los 8.17



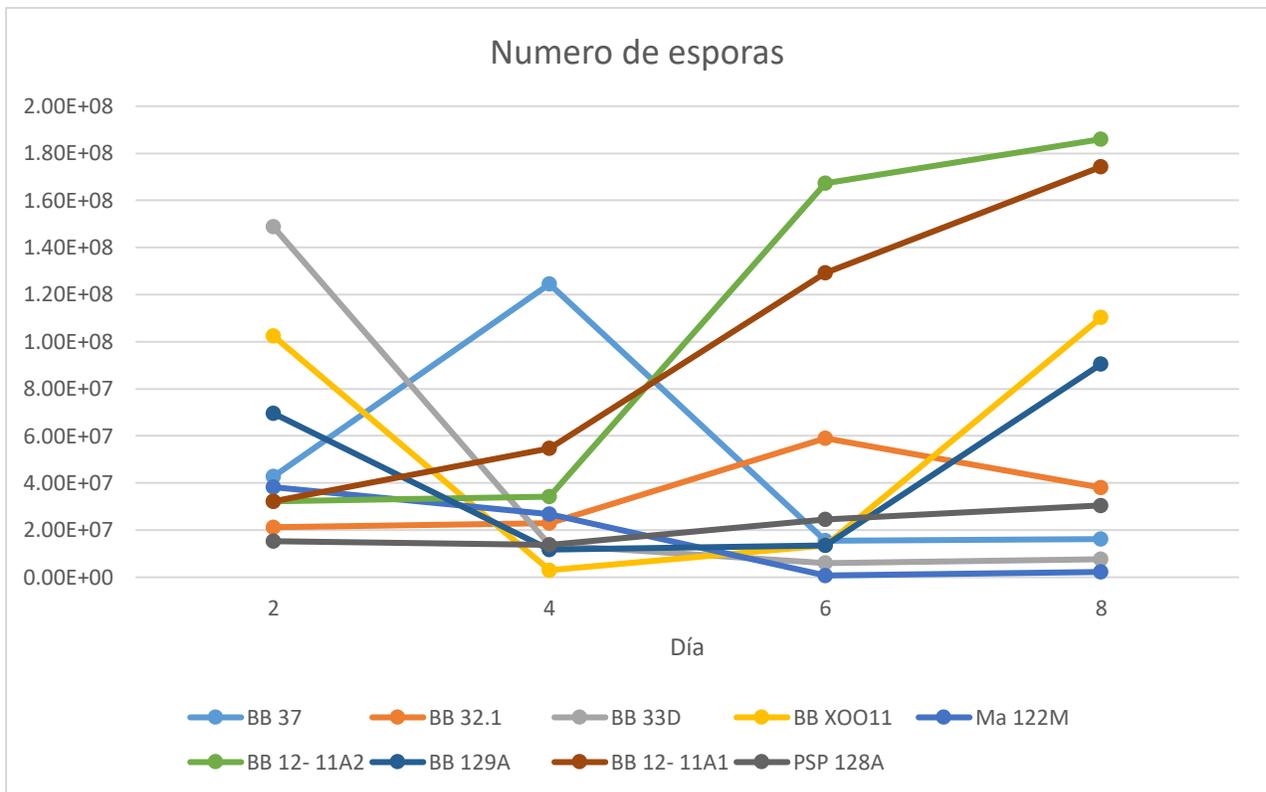
Grafica 3 cuantificación de pH con medio de cultivo Czapeck adicionada con quitina.

En la tabla 3 se observó que la cepa BB 32.1 y BB XOO11 tuvieron un mismo comportamiento ya que en el sexto día de incubación las cepas empezaron a tener un pH menor, la cepa BB 33D presento un crecimiento diferente a las demás cepas ya que su pH inicial fue de 6.24×10^6 y al segundo día de incubación bajo hasta los 4.57×10^6 , para el sexto día de incubación subió el pH manteniéndose entre los 5.47×10^6 y 5.58×10^6



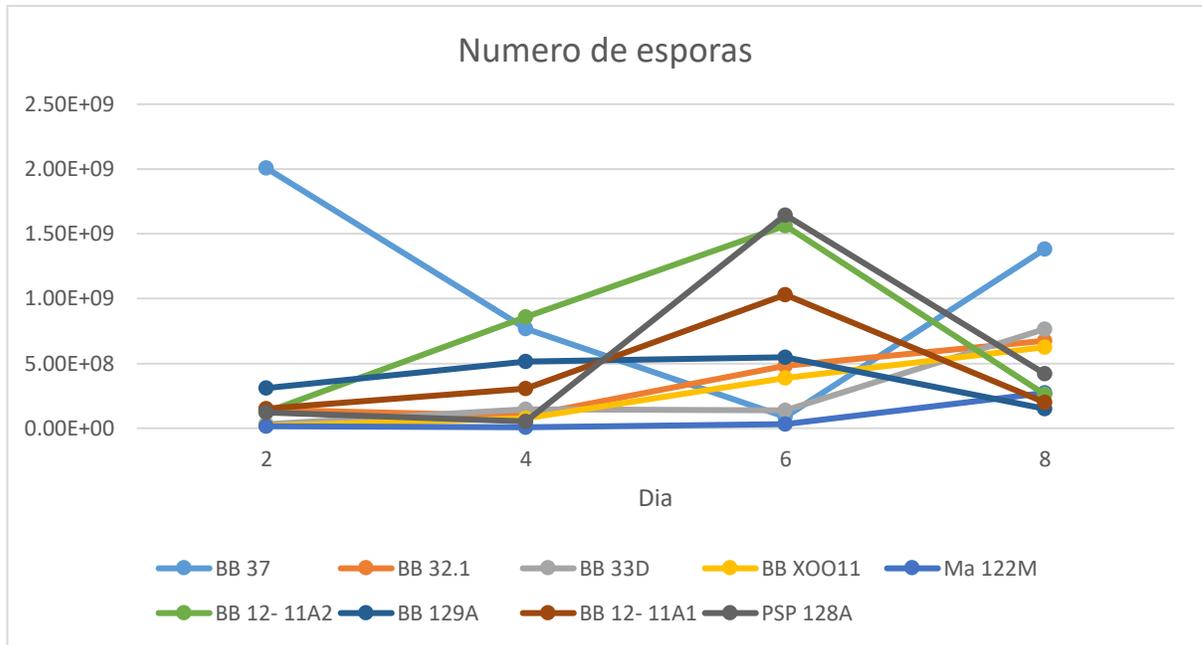
Grafica 4 cuantificación de esporas con medio de cultivo Czapeck con jugo V8

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio Czapeck con jugo V8, se realizó la cuantificación de esporas producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa BB 12- 11A2 fue la que presentó un mayor número de esporas mientras que la cepa BB 37 presentó un menor número de esporas (gráfica 4). Las cepas presentaron un mayor número de esporas en diferentes tiempos; BB 32.1 (39.5×10^6), BB12-11A2 (151.75×10^6), se observó en el cuarto día de incubación, BB 37 (23×10^6), BB 33D (15.75×10^6), su mayor número de esporas se observó en el sexto día de incubación, BBXO1O1 (23.25×10^6), Ma 122M (14.25×10^6), BB 12- 11A1 (19×10^6), PSP 128A (23.25×10^6) se observó en el octavo día de incubación.



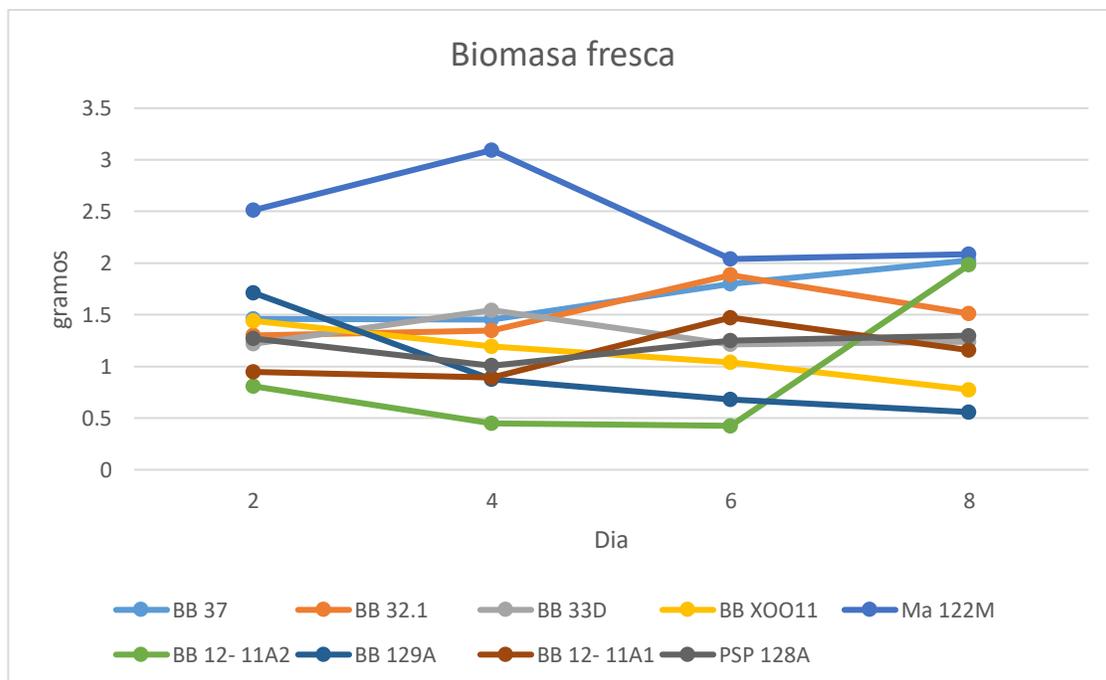
Grafica 5 cuantificación de esporas con medio de cultivo Czapeck con jugo V8 Adicionada con Laminarina.

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio adicionado con laminaria como fuente de carbono, se realizó la cuantificación de esporas producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa W fue la que presentó un mayor número de esporas, mientras que la cepa V presentó un menor número de esporas (grafica 5). Las cepas presentaron un mayor número de esporas en diferentes tiempos; BB 33 D (148.75×10^6), Ma 122M (38.25×10^6) se observó en el segundo día de incubación, BB 37 (124.05×10^6), se observó en el cuarto día de incubación, BB 32.1 (59×10^6), su mayor número de esporas se observó en el sexto día de incubación, UBBXO1O1 (110.25×10^6), BB 12- 11A2 (167.25×10^6), BB 129 A (90.5×10^6), BB 12-A1 (174.25×10^6), PSP 128A (30.5×10^6) su mayor concentración se observó en el octavo día de incubación.



Grafica 6 cuantificación de esporas con medio de cultivo Czapeck con jugo V8 adicionada con quitina.

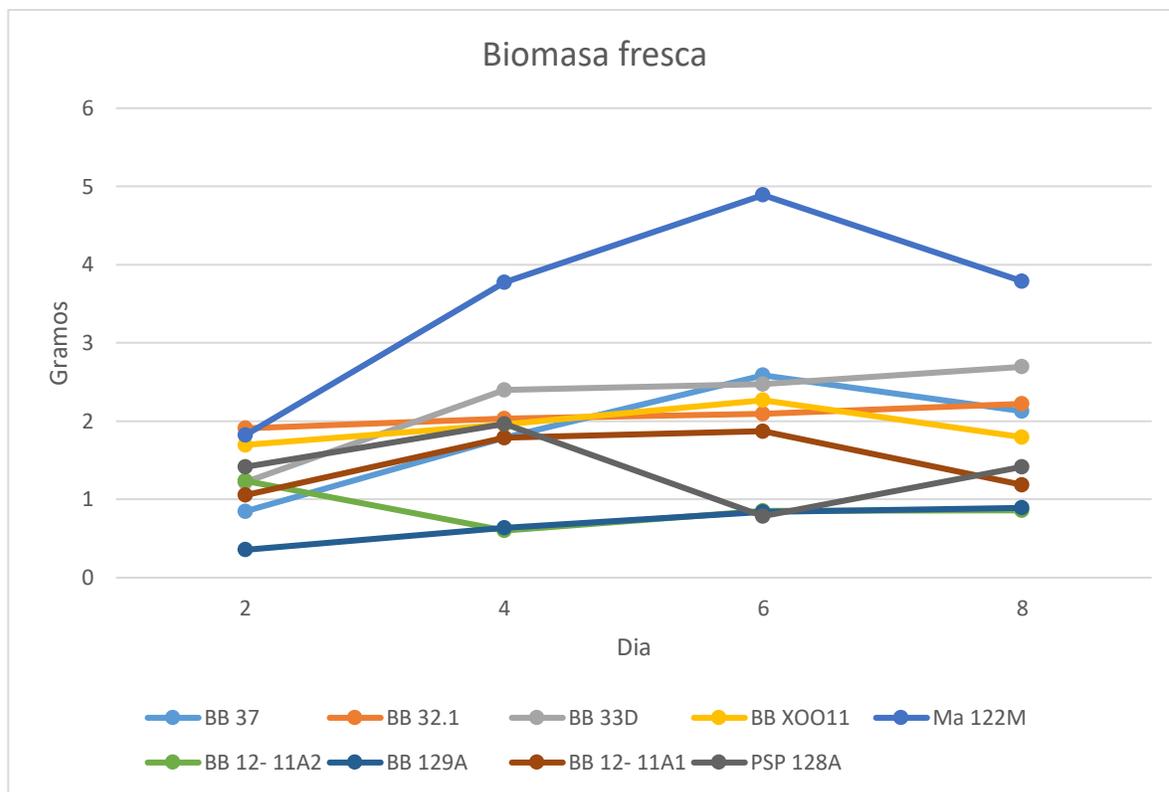
A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio adicionado con quitina como fuente de carbono, se realizó la cuantificación de esporas producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa BB 37 fue la que presento un mayor número de esporas, mientras que la cepa Ma 122 M fue la que presento un menor número de esporas (grafica 6). Las cepas presentaron un mayor número de esporas en diferentes tiempos; BB37 (2006.2×10^6) se observó en el segundo día de incubación, se observó en el cuarto día de incubación, BB 12- 11A2 (1563×10^6), BB129A (547.5×10^6), BB 12-11A1 (1030×10^6), PSP 128A (1645×10^6) su mayor número de esporas se observó en el sexto día de incubación, BB 32.1 (675×10^6), BB 33D (765×10^6), BBXO1O1 (625×10^6), V (272.5×10^6) su mayor concentración se observó en el octavo día de incubación



Grafica 7 Producción de biomasa fresca de hongos entomopatógenos con medio de cultivo Czapeck con jugo V8.

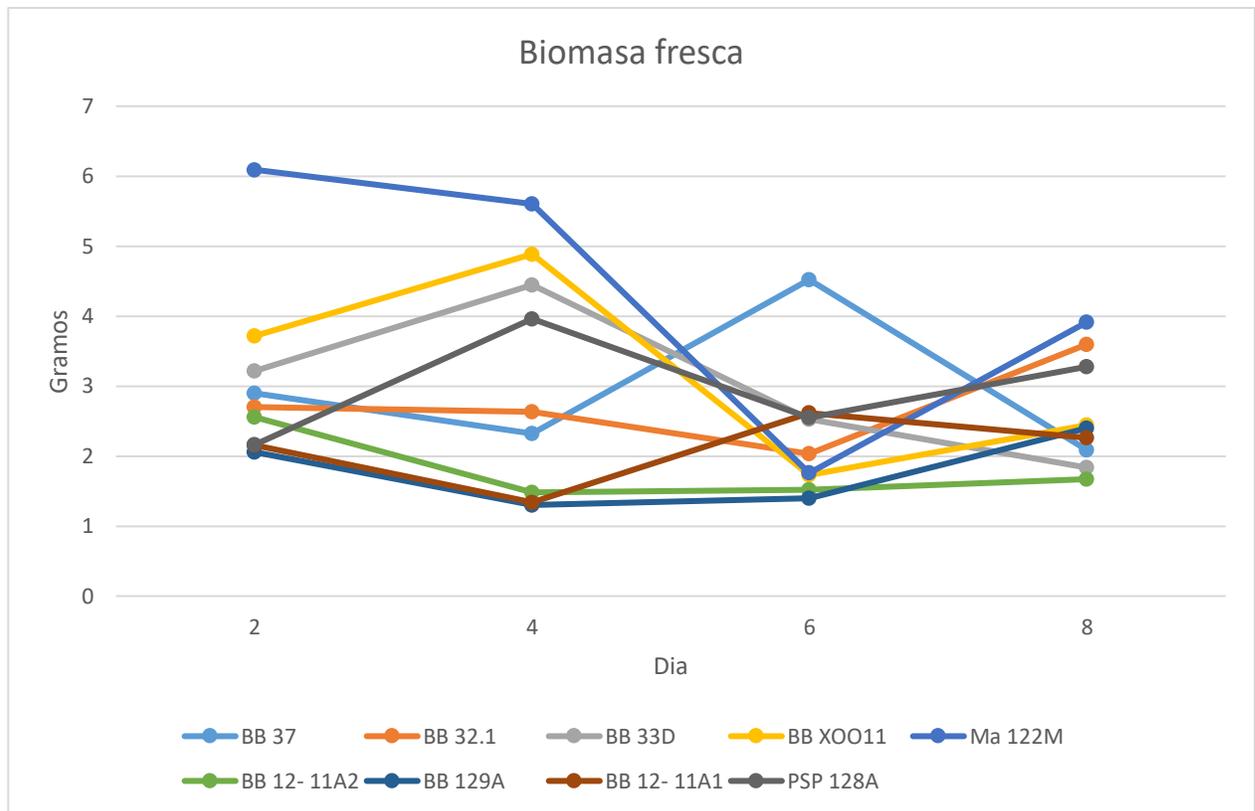
Producción de biomasa fresca de hongos entomopatógenos.

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio Czapeck con jugo V8, se realizó el pesado de la biomasa fresca producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa BB 37 es la que presentó una mayor biomasa mientras que la cepa BB 129A fue la que tuvo una menor biomasa (grafica 7) Las cepas presentaron una mayor biomasa en diferentes tiempos; con la cepa BB X0101 (1.4413 g), BB 129A (1.7129 g) se observó en al segundo día de incubación, BB 33D (1.5443 g) se observó al cuarto día de incubación, Ma 122M (1.5093 g), BB 12-11A1 (1.1563 g) su mayor biomasa se observó en el sexto día de incubación, BB 37 (2.0274 g), BB 12- 11A2 (1.9833 g) su mayor concentración se observó en el octavo día de incubación.



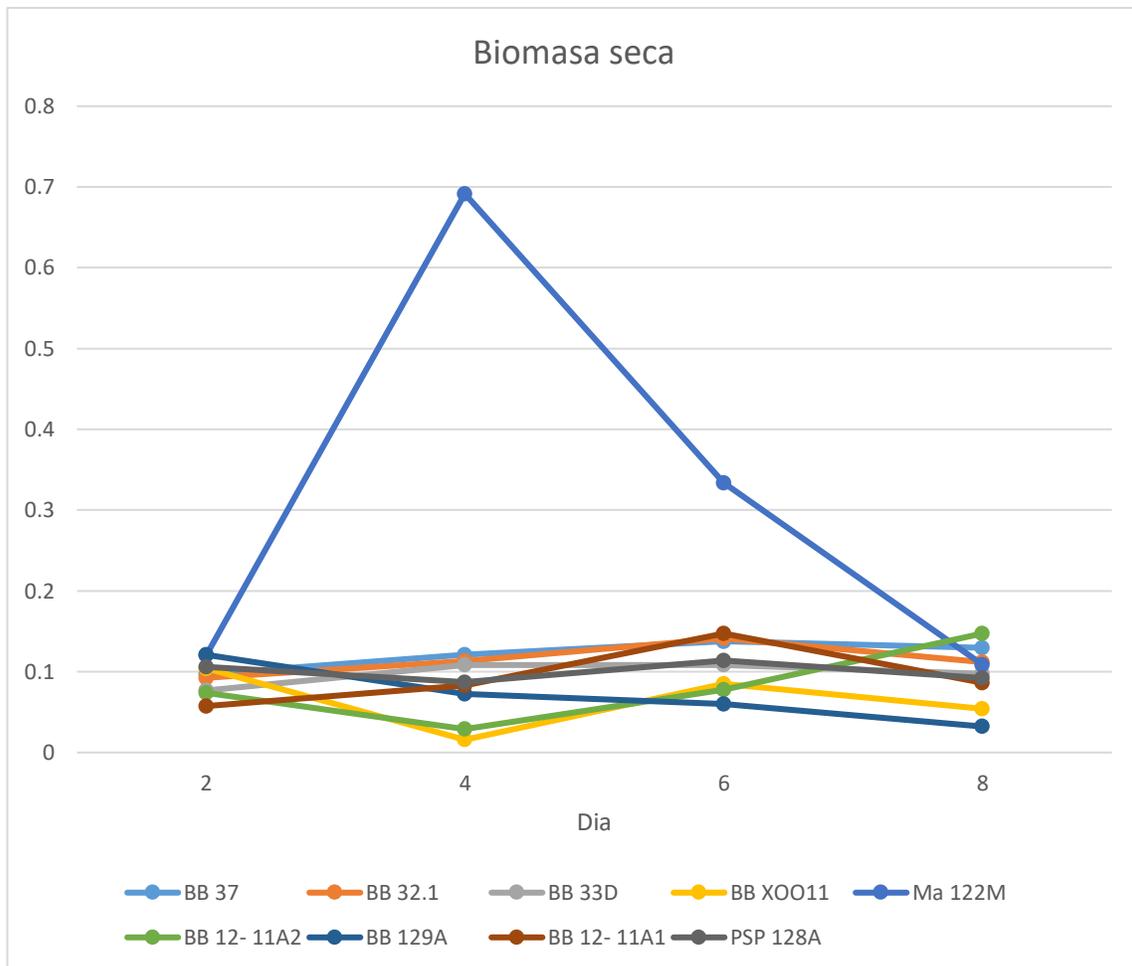
Grafica 8 Producción de biomasa fresca con medio de cultivo Czapeck con jugo V8 adicionada con laminarina

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio adicionado con laminarina como fuente de carbono, se realizó el pesado de la biomasa producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa Ma 122M es la que presentó una mayor biomasa mientras que la cepa BB 12- 11A2 presentó una menor biomasa (grafica 8). Las cepas presentaron una mayor biomasa en diferentes tiempos; con la cepa BB 12-11 A2 (1.2368 g) se observó al segundo día de incubación, PSP 128A (1.9654 g) se observó al cuarto día de incubación, BB 37 (2.586 g), BB XO1O1 (2.2677 g), Ma 122M (3.7896 g), BB 12-11A1 (1.8722 g), BB 32.1 (2.2211 g), su mayor biomasa se observó al sexto día de incubación, BB 33D (2.6947 g), BB 129A (0.8913 g), se observó al octavo día.



Grafica 9 Producción de biomasa fresca con medio de cultivo Czapeck con jugo V8 adicionada con Quitina.

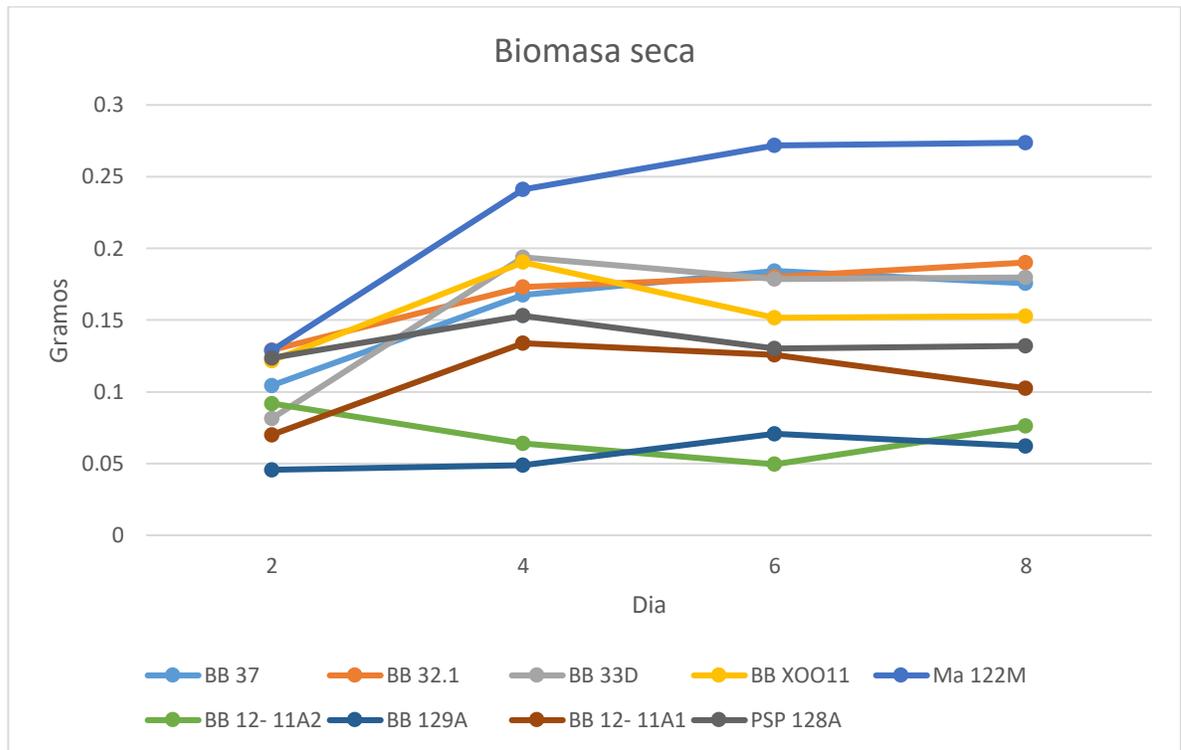
A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio adicionado con quitina como fuente de carbono, se realizó el pesado de la biomasa producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa Ma 122M es la que presento una mayor biomasa, mientras que la cepa BB 12- 11A2 presento una menor biomasa (grafica 9). Las cepas presentaron una mayor biomasa en diferentes tiempos; la cepa Ma 122M (6.092 g), BB 12- 11A2 (2.5568 g), se observó al segundo día de incubación, BB 33D (4.446 g), BB XO1O1 (4.8861 g), PSP 128A (3.9618 g) su mayor biomasa se observó al cuarto día de incubación, BB 37 (4.5214 g), BB 12- 11A1 (2.6144 g) su mayor concentración se observó al sexto día de incubación, BB 32.1 (3.5969 g), PSP 128A (2.3993 g) su mayor biomasa se observó al octavo día.



Grafica 10 Producción de biomasa seca con medio de cultivo Czapeck con jugo V8.

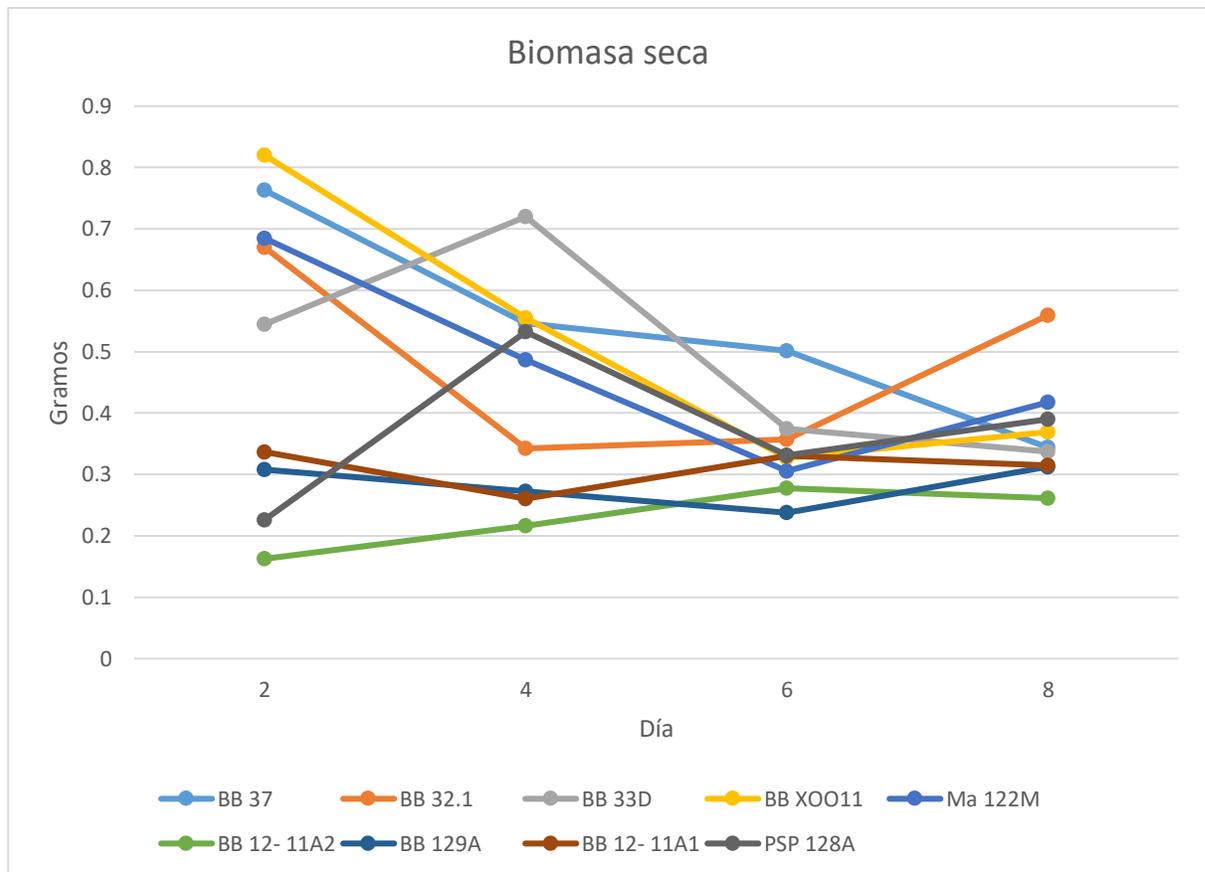
A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio Czapeck con jugo V8, se realizó el pesado de la biomasa seca producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa Ma 122M presento una mayor biomasa, mientras que la cepa BB 129 A presento una menor biomasa (grafica 10). Las cepas presentaron una mayor biomasa en diferentes tiempos; la cepa BB 129 A (0.1209 g) se observó al segundo día de incubación, BB 33D (0.1083 g), Ma 122M (0.6916 g) se observó al cuarto día de incubación, BB 37 (0.1377 g), BB 32.1 (0.1413 g) BB X0101 (0.0853 g), BB 12-11A1 (0.1473 g), PSP 128A

(0.1139 g), su mayor biomasa se observó al sexto día, BB 12-11A2 (0.1473 g) se observó al octavo día.



Grafica 11 Producción de biomasa seca con medio de cultivo Czapeck con jugo V8 adicionada con laminarina

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio adicionado con laminaria, se realizó el pesado de la biomasa seca producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa Ma 122M presento una mayor biomasa mientras que la cepa BB 129A presento una menor biomasa. Las cepas presentaron una mayor biomasa en diferentes tiempos; BB 12-A2 (0.0919 g) se observó al segundo día de incubación, BB 33 D (0.1938 g), BB XO1O1 (0.1903 g), BB 12- 11A1 (0.1339 g), PSP 128A (0.153 g) su mayor biomasa se observó al cuarto día, BB37 (0.1843 g), X (0.0708 g) su mayor concentración se observó al sexto día, BB 32.1 (0.1902 g), MA 122M (0.2737 g) se observó su mayor biomasa al octavo día.



Grafica 12 Producción de biomasa seca con medio de cultivo Czapeck con jugo V8 adicionada con quitina.

A lo largo del experimento para la producción de enzimas hidrolíticas en un medio adicionado con laminaria, se realizó el pesado de la biomasa seca producida en los diferentes tiempos de incubación para determinar si había una relación con la concentración de enzimas. La cepa BB XOO11 presento una mayor biomasa, mientras que la cepa BB 12- 11A2 presento una menor biomasa (grafica 12). Las cepas presentaron una mayor biomasa en diferentes tiempos; BB 37 (0.763 g), BB 32.1 (0.67 g), BB XOO11 (0.8201 g), Ma 122M (0.6848 g) su mayor biomasa se observó al segundo día de incubación, BB 33D (0.545 g), BB 12- 11A2 (0.2777 g), BB 12- 11A1 (0.33 g), PSP 128A (0.5325 g) su mayor concentración se observó al sexto día de incubación, BB 129A (0.3127 g) se observó al octavo día de incubación.

Hongos	Día 7 (cm)	Área de crecimiento	PICR
F.V	8.5	56.74515	-----
FV+BB 37	4.9166	18.9854393	42.1576471
FV+BB 32.1	6.6166	34.3843373	22.1576471
FV+BB 33D	6.3666	31.835086	25.0988235
FV+BB XO1O1	6.8333	36.6734589	19.6082353
FV+Ma 122M	5.5166	23.9019805	35.0988235
FV+BB 12-11A2	5.6333	24.9239377	33.7258824
FV+BB 129 ^a	5.3	22.061886	37.6470588
FV+BB 12-11A1	6.4	32.169984	24.7058824
FV+PSP 128A	3.4333	9.2579409	59.6082353

Tabla 2 área de crecimiento y porcentaje de inhibición por confrontación dual *in vitro*.

En la tabla 1 se puede observar al área de crecimiento del hongo patógeno y el porcentaje de inhibición con cada hongo antagonista. De las 9 cepas antagonistas, 6 se ubicaron en la clase 4 de antagonismo; y otras 2 en la clase 3.5 y una en la clase 3.

Resultados

7.1 pH de hongos entomopatógenos *in vitro*.

Los hongos entomopatógenos tienden a tener un crecimiento de pH exponencial conforme al tiempo esto se debe a que mayor producción de biomasa más alto es el número de pH. Ya que los hongos modificaron el pH inicial del medio dado que los hongos tienden a crecer en pH de 6 a 9. Es por esto que los hongos modificaron el pH para un crecimiento óptimo. En el caso del tratamiento con quitina se observaron pH más ácidos en comparación a los demás tratamientos esto se debe por el tipo de sustrato que se le añadió al medio.

7.1.1 cuantificación de esporas.

En la cuantificación de esporas en hongos entomopatógenos se notó que el crecimiento de esporas tiende a tener relación con la biomasa ya que se observó mayor número de esporas en los primeros días de incubación esto se debe a que si tiende a subir el número de biomasa baja el número de esporas presentes en el medio.

7.1.2 Producción de biomasa fresca y seca de hongos entomopatógenos.

Con la biomasa producida de los hongos entomopatógenos se obtuvieron datos con mucha diferencia entre cepas esto se debe a la capacidad que tiene el hongo para adaptarse al medio, al tipo de sustratos, entre otras condiciones. En el tratamiento con quitina se notó un mayor número de crecimiento de las cepas en comparación a los demás tratamientos esto se debe a que los hongos biosintetizan más fácil mente este sustrato ya que las paredes celulares del hongo están formadas por este carbohidrato.

7.1.3 Antagonismo *in vitro*.

Las interacciones entre hifas de especies de *Beauveria* y hongos fitopatógenos han sido escasamente estudiadas. En el presente estudio, los resultados en los cultivos duales o apareados indican que el principal mecanismo de acción de las cepas es la competencia por espacio y nutrientes; el micoparasitismo, uno de los principales mecanismos de las cepas del género *Trichoderma* (Benhamou y Chet, 1993), no se presentó en alguna de las cepas estudiadas. Se presentaron diferente antagonismo en las confrontaciones, en la tabla 1 se observa que redujeron significativamente la población.

8 Conclusiones.

Los hongo entomopatógenos posee un lento crecimiento y para incrementar su potencial para controlar a *Fusarium verticillioides* se requiere que las condiciones de espacio y nutrimento estén disponibles al menos durante 24 horas en ausencia de un microorganismo competidor que tiene una mayor rapidez de crecimiento.

El mecanismo de acción de las cepas de hongos entomopatógenos sobre el hongo fitopatógeno reside en su capacidad para competir por espacio y nutrimentos, además de producir complejos enzimáticos y liberar antibióticos y/o toxinas.

9 Recomendaciones y limitaciones.

El equipamiento aparatos de trabajo de laboratorio como centrifugas con control de temperatura, medidores de pH, congelador para guardar muestras, micro pipetas.

10 Bibliografía

Harman GE. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Dis. 2004;84:377-393.

Rodríguez. I. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana, 1990.

Stefanova M, Leiva A, Larriganaga L, Coronado MF. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía. 1999;16:509-516.

Agrios, G., 1989. Fitopatología. Editoria Limusa. México, LIMUSA. 756 p.

Agrios, G., 2005. Plant pathology. Quinta Edición. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

Agrios, G.N., 1991. Manual de Enfermedades de las Plantas. Impreso en México. Editorial Limusa. S.A.. 201-218

Bacon, C.W., Hinton, D.M., 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. Canadian Journal of Botany. 74:1195-1202

Casadevall, A., 2007. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. Fungal Biology Reviews. 21:130-132.

Casadevall, A., Pirofski, L., 1999. Host–pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 67:3703-3713.

Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., Bello, A., 2000. *Patología Vegetal*. Segunda Edición. Phytoma-Sociedad Española de Fitopatología-Grupo Mundi-Prensa. Madrid España.

Luchini, L.C., 2000. Agroquímicos: comportamiento no solo agua e planta. *Summa Phytopatologica*. 26 (1):170-171.

Nelson, P.E., 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29–36.

Nelson, P.E., Desjardins, A.E. Plattner. R.D., 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathology*.31:233–252.

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M., Caracuel, Z., Roncero, M.I., Mayayo, E., Di Prieto, A., 2004. *Fusarium Fusarium sp* as a multihost 117 model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and Immunity*. 72:1760-1766.

Abdul-Wahid, O.A. 2006. Improving control of *Fusarium* wilt of leguminous plants by combined application of biocontrol agents. *Phytopathology Mediterranean* 45:231-237.

Adams, P.B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 28: 59-72.

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 4 ed. Amsterdam Academic. P 635.

Lee, S., Yeo, W., Jee, H., Shin, S., Moon, Y. 1999. Effect of entomopathogenic fungi on growth of cucumber and *Rhizoctonia solani*. *Journal of Forestry Science* 62: 118-125.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23.

