

# **INFORME TÉCNICO**

## **DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

### **CARRERA**

## ***INGENIERÍA BIOQUÍMICA***

### **PRESENTA**

Brenda Berenice Pérez Hernández

Numero de control: 13270361

### **NOMBRE DEL PROYECTO**

Hongos entomopatógenos como potencial agente de control biológico  
contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

### **PERIODO DE REALIZACIÓN**

AGOSTO – DICIEMBRE 2017

## Contenido

Índice de cuadros	1
Índice de figuras	2
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. OBJETIVOS	8
3.1. Objetivo general	8
3.2. Objetivos específicos	8
4. DESCRIPCION DEL AREA DE TRABAJO	8
5. MARCO TEORICO	9
5.1 Aspectos generales del genero Fusarium	9
5.2 Aspectos biológicos y patológicos de la especie Fusarium oxysporum	9
5.3. Características y especificidad de plantas hospedantes de las formas especiales de Fusarium oxysporum	9
5.3.1. Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	10
5.3.1.1. Hospedero específico de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Fol)	11
5.3.2 Sintomas de la enfermedad	12
5.3.2.2 Modo de acción y desarrollo de la enfermedad	13
5.4. Microorganismos agentes de control biológico	14
5.5. Mecanismos de acción de los agentes de control biológico	15
5.5.1. Antagonismo	15
5.5.2 Fungistasis	15
5.5.3. Microparaistismo	15
5.5.4. Competencia	15
5.5.5. Antibiosis	16
5.5.5.1. Enzimas hidrolíticas	16
5.6. Microorganismos antagonistas como controladores biológicos de enfermedades	19
5.6.1. Beauveria bassiana	19
5.6.2. Paecilomyces spp.	20

5.6.3. <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
6. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	22
6.1. Microorganismos	22
6.2. Cultivo de hongos in vitro	22
6.3. Actividad antagónica	22
6.3.1. Confrontación dual	22
6.3.2. Producción de compuestos volátiles	23
6.4. Producción de enzimas hidrolíticas	23
6.4.1. Preparación de medios de cultivo enriquecidos.	23
6.4.2. Determinación de parámetros de desarrollo de los aislados de hongos entomopatógenos.	24
6.4.3 pH	24
6.4.4 No. De esporas	24
6.4.5 Obtención de Biomasa	24
7.RESULTADOS Y DISCUSION	25
7.1 pH	25
7.2 Número de Esporas	31
7.3 Biomasa	39
7.4 ANTAGONISMO	47
7.4.1 Confrontación dual	47
7.4.2 Antagonismo por compuestos volátiles.	48
8.CONCLUSIONES	49
9. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES	50
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
11. ANEXOS	58

## Índice de cuadros

Numero	Contenido	Página
1	Hongos entomopatógenos empleados en el control biológico	19
2	Clasificación de antagonismo con la técnica de confrontación dual.	23
3	Actividad de control biológico empleando la técnica de confrontación en cajas Petri con PDA incubadas a 28°C	47
5	Actividad de control biológico empleando la técnica de confrontación por volatilidad en cajas Petri con PDA incubadas a 28°C	48

## Índice de figuras

### Índice de figuras

Numero	Contenido	Página
1	Daños inducidos por <i>Fusarium oxysporum f. sp lycopersici</i> raza 3 en diferentes órganos de la planta de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum, Mill.</i> ). A) planta clorótica o amarilla. B) Raíz con necrosis y áreas color violeta y C) Frutos con necrosis en los tejidos vasculares.	13
2	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 37).	25
3	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 32.1).	26
4	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 33D).	27
5	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa xolol).	27
6	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>M. anisopliae</i> (cepa 122A).	27
7	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 12-11A2).	28
8	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 129A).	29
9	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 12.11A1).	29
10	Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>Paecilomyces</i> (cepa 128A).	30
11	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B.</i>	31

	bassiana (cepa 37).	
12	Comparación del número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 32.1).	32
13	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 33D).	33
14	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa Xolol).	33
15	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>M. anisopliae</i> (cepa 122A).	34
16	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 12-11A2).	35
17	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 129A).	36
18	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>B. bassiana</i> (cepa 12.11A1).	37
19	Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de <i>Paecilomyces</i> spp. (cepa 128A).	38
20	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa 37)	39
21	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa 32.1).	40
22	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa 33D).	40
23	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa Xolol).	41
24	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>M. anisopliae</i> (cepa 122A).	42

25	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa 12-11A2).	43
26	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa 129A).	44
27	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>B. bassiana</i> (cepa 12.11A1)	45
28	Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por <i>Paecilomyces</i> spp. (cepa 128A).	45

## RESUMEN

Uno de los problemas fitosanitarios limitantes de la producción del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) a nivel mundial y nacional es el marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), el cual tiene mayor incidencia en regiones de clima cálido, ocasionando grandes pérdidas económicas; La utilización de microorganismos antagonicos es una estrategia de manejo promisorio, pero se requiere de aislados eficaces contra el patógeno, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* bajo condiciones *in vitro*.

Para su desarrollo se utilizó cepas aisladas de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp. Proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), General Terán, Nuevo León para determinar su actividad antagonica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, empleando el método de confrontación dual *in vitro* y antagonismo por compuestos volátiles. Las cepas con mayor habilidad para disminuir el desarrollo de los hongos fitopatógenos fue *B. bassiana* (cepa 12-11A2) en el estudio de confrontación se clasificó como antagonista clase 3, para compuestos volátiles *M. anisopliae*(122A) se clasificó como antagonista clase 3 y *B. bassiana* (129A) clase 4.

Las cepas de Hongos entomopatógenos fueron inoculadas en medio liquido czapeck y como inductores enzimáticos, el medio se suplementó con quitina en polvo, 1% (p/v) y laminarina, 0.1% (p/v) para la producción específica de quitinasas y glucanasas, respectivamente. Todas las cepas presentaron mayor biomasa en el medio suplementado con quitina, suponiendo que en este medio se presentó mayor producción enzimática; los metabolitos pueden usarse para la inhibición del hongo patógeno.



## 1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es el segundo cultivo vegetal de la clase magnoliópsida más importante a nivel mundial después de la papa (*Solanum tuberosum*) (Nzanza et al., 2012), con una producción global de aproximadamente 160 millones de toneladas para el año 2011 (Vos et al., 2014). Debido al crecimiento y la productividad de las plantas de tomate, este cultivo enfrenta diferentes desafíos como son el brote de plagas y enfermedades (Highlands, 2015), siendo el marchitamiento vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), la enfermedad fúngica más destructiva tanto en el invernadero como en el campo, causando pérdidas económicas para este cultivo (Girhepuje y Shinde, 2011; Bawa, 2016) debido a la capacidad de este hongo para permanecer latente en el suelo en forma de esporas (Zeller et al., 2003).

El manejo de esta enfermedad a través de la aplicación de fungicidas puede causar varias complicaciones ambientales y también podría ser tóxico para organismos que no son el objetivo (Ramaiah y Garampalli, 2015). Lamentablemente, estos fungicidas químicos tienden a persistir durante mucho tiempo en el medio ambiente y numerosos hongos han desarrollado resistencia a ellos (Bajwa et al., 2003). Por esta razón, el control de fitopatógenos con microorganismos, representa para algunas enfermedades, una alternativa viable al uso de químicos sin perjudicar el medioambiente (Lindow y Wilson, 1998) la búsqueda de microorganismos antagonistas para el control biológico de patógenos en cultivos de importancia económica ha despertado especial interés debido a sus potencialidades y a la gravedad de los impactos ecológicos causados por la constante y creciente aplicación de agroquímicos en los agroecosistemas (Acebo et al., 2012; Suárez y Alba, 2013) esto debido a diferentes mecanismos de acción para contrarrestar el efecto nocivo de los fitopatógenos; uno de ellos es el efecto de antibiosis que se debe a la producción de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser volátiles o difusibles, pero que, en cualquiera de los casos, sin entrar en contacto físico con el patógeno pueden inhibir o restringir su crecimiento (Rodríguez et al., 2010). Las quitinasas, glucanasas y proteasas, son las enzimas más mencionadas involucradas en el control biológico de fitopatógenos.

Los microorganismos más usados en el control biológico han sido bacterias y hongos: en el caso de las bacterias, los géneros *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* y *Paenibacillus* son los más comunes; para el caso de los hongos se destaca *Trichoderma spp.* (González et al., 2004). Se ha sugerido que especies del género *Trichoderma* poseen buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por el hongo patógeno *Fusarium sp.* (Suárez et al. 2008). Los hongos antagonistas del género *Trichoderma* tienen la capacidad de actuar contra una amplia variedad de patógenos del suelo (*Fusarium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.* y *Sclerotinia sp.*) y del follaje (*Botrytis spp.* y *Peronospora*

sp.) (Hoyos et al., 2008; Reyes et al., 2008; Tchameni et al., 2011; Rodríguez et al., 2010; Acebo et al., 2012; Martínez et al., 2013). Sin embargo, nuevos estudios reportan a los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metharizhium anisopliae* como potenciales agentes de control biológico. Pucheta Díaz et al. (2006), reporta que los hongos entomopatógenos, constituyen un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos; Para López-Llorca y Hans-Börje (2001), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*, mientras que para la FAO (2003), los géneros de importancia son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium*.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Con la finalidad de reducir las pérdidas económicas debidas a esta enfermedad, los agricultores aplican un gran número de productos químicos por ciclo y en ocasiones sin tener un control adecuado sobre el número y momento de las aplicaciones, concentración e ingrediente activo, entre otros; lo que frecuentemente da lugar a mayores costos de producción y contaminación ambiental. Esto ocasiona mayores riesgos para el equilibrio ecológico y la salud humana (León y Arosamena, 1980).

Es por estas dos razones que se requieren nuevas estrategias para el control de plagas y enfermedades. La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y de enfermedades es una alternativa atractiva.

En los últimos años el empleo de bacterias y hongos antagonistas de enfermedades agrícolas ha cobrado una singular importancia, debido a que no solo actúan contra un grupo determinado de microorganismos fitopatógenos (como lo hacen los plaguicidas químicos), sino que se están utilizando para un grupo muy amplio de microorganismos fitopatógenos (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006). Varias investigaciones han demostrado que el control biológico a través del uso de hongos benéficos como *Trichoderma* es una alternativa potencial respecto al uso de fungicidas o fumigantes en la agricultura (Paredes-Escalante et al., 2009). 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.

Sin embargo, hay pocos estudios enfocados en otros hongos entomopatógenos (*B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces spp.*) para el control biológico de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad antagónica de aislados de hongos entomopatógenos contra *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici in vitro*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

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

### **4. DESCRIPCION DEL AREA DE TRABAJO**

El proyecto se realizó en su totalidad en los espacios destinados a investigación que comprende la línea de biotecnología vegetal en el laboratorio de Biotecnología vegetal ubicado en el edificio J del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en carretera panamericana kilómetro 1080, Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

## **5. MARCO TEORICO**

### **5.1 Aspectos generales del genero Fusarium**

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su ocurrencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Muchas especies del género *Fusarium* tienen una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas.

En el género *Fusarium* se han reconocido entre nueve y 78 especies, dependiendo del sistema taxonómico utilizado, el cual se basa principalmente en las características culturales de las colonias y de las esporas del hongo. La clasificación taxonómica del género es bastante controvertida según diversos taxónomos. Snyder y Hansen (1940) reconocen nueve especies, Gordon considera 26 especies, Booth 44 especies, Wollenweber y Reinking 65 especies y Gerlach reconoce 78 especies (Nelson; 1990). Esto muestra la complejidad taxonómica del género *Fusarium*.

### **5.2 Aspectos biológicos y patológicos de la especie Fusarium oxysporum**

*Fusarium oxysporum* es una de las especies de mayor importancia fitopatológica, una de las que cuenta con mayor número de plantas hospedantes y una de las especies que mayor daño económico ocasiona entre los patógenos de plantas. La especie tiene la capacidad de atacar un gran número de plantas de importancia agrícola y ocasiona principalmente marchitamientos vasculares, seguidos de la muerte de la planta (Nelson, 1981). Algunas especies pueden ocasionar también pudrición de la corona y de las raíces de algunas plantas (Farr et al., 1989; Jones et al., 1997). El hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas.

### **5.3. Características y especificidad de plantas hospedantes de las formas especiales de Fusarium oxysporum**

La especie *F. oxysporum* se caracteriza por producir distintas formas especiales, las cuales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, pero son fisiológicamente diferentes por su capacidad de parasitar y ocasionar enfermedades en plantas hospedantes específicas (Nelson, 1981). Snyder y Hansen (1940) reconoció 25 formas especiales de *F. oxysporum*, Booth (1971) registró 70 formas especiales y Armstrong (1981) reconocieron 72 formas especiales patógenas de cultivos de gran importancia económica; de acuerdo a otros autores, las formas especiales de la especie podrían pasar de un centenar. Farr et al. (1989) reconocieron 41 formas especiales causando enfermedades en plantas de

importancia económica en los Estados Unidos. Pardo (1995) registró la presencia en Colombia de diez formas especiales de *F. oxysporum*, pero además mencionó 21 tipos de plantas atacadas por *F. oxysporum*, pero sin especificar la forma especial que las afecta.

A pesar del gran número de plantas afectadas por diversas formas especiales de *F. oxysporum*, se observa una muy alta especialización en las plantas hospedantes que pueden atacar. Esta selectividad patogénica de las formas especiales de *F. oxysporum* se debe a que solamente las plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo y, por lo tanto, éste solamente puede crecer y desarrollarse en ese tipo de plantas (Nelson, 1981)

La especie *Fusarium oxysporum* ataca diversos tipos de plantas económicamente importantes en distintos países y en diferentes regiones, causando marchitamientos vasculares y muerte de las plantas. En hortalizas se registra atacando entre otras plantas al tomate (f.sp. *lycopersici*), apio (f.sp. *apii*), pepino cohombro (f.sp. *cucumerinum*), cebolla (f.sp. *cepae*), repollo (f.sp. *conglutinans*), espárrago (f.sp. *asparagi*) y remolacha (f.sp. *betae*).

### **5.3.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) produce marchitamiento vascular en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Esta forma especial fue descrita por Masee (1895) y se ha reportado en al menos 32 países. La enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate, y es una de las más destructivas.

Este patógeno entra a la planta a través de las raíces, ya sea por penetración en la punta de la raíz o por las de heridas naturales, por ejemplo, a través de los tejidos de la corteza de la raíz por la formación de raíces laterales (Mes et al., 2000), donde el micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de ésta (Agrios, 2007). Cuando se encuentra en los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidios en su interior, que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta por el flujo ascendente del agua del xilema. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente y el micelio penetra la pared superior del vaso, y ahí, el hongo produce más microconidios. El hongo también avanza a los vasos adyacentes de la misma manera. El hongo invade entonces en gran escala a los tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente. En ocasiones el hongo llega hasta los frutos de las plantas donde penetra y contamina las semillas, al igual que Forl. Esto sucede principalmente cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, condiciones que permiten a las plantas producir buenas cosechas, aunque

sean infectadas por el hongo. Sin embargo, es frecuente que estos frutos infectados se pudran y desprendan (Agrios, 2007).

El micelio de Fol es incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones se torna de una tonalidad rosa pálido o púrpura. Este hongo produce tres tipos de esporas asexuales al igual que Forl (Agrios, 2007).

1. Microconidios. Consisten de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Su forma es oval y lisa, mide de 5-12 micras de largo por 2.5-3.5 micras de ancho. Son frecuentes en el interior de los vasos de las plantas hospedantes que ha infectado.

2. Macroconidios. Son las esporas típicas de "Fusarium", están constituidos de tres a cinco células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. Son de forma alargadas, moderadamente curva en forma de hoz. Tienen un tamaño de 27-46 micras de largo por 3.0-4.5 micras de ancho. Aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno y por lo común se forman en grupos similares a los esporodocios, los cuales son estructuras fructíferas que consta de un racimo de conidióforos entrelazados en una masa de hifas.

3. Clamidosporas. Están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y forma redonda, tienen un tamaño de 5-15 micras de diámetro. Se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo, ó en los macroconidios del hongo.

Fol es un patógeno que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectadas que yacen en este sustrato en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, y con mayor frecuencia en forma de clamidospora (Agrios, 2007).

### **5.3.1.1. Hospedero específico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)**

El tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen. Mundialmente ocupa el segundo lugar en importancia entre las hortalizas debido a su nivel de producción, la cual es superada solamente por el cultivo de la papa (SAGARPA, 2005). En México, el tomate cultivado está considerado como la segunda especie hortícola más importante, debido a la superficie sembrada, y como la hortaliza de mayor importancia por sus niveles de producción (SAGARPA, 2005). Los principales países productores son: Estados Unidos, Canadá, Grecia, Italia, México, Turquía, Egipto, India y España (Jiménez,

2003). La producción anual mundial creció 9.5% en los últimos cuarenta años, siendo la hortaliza más cultivada. A nivel nacional se siembran alrededor de 81,000 ha donde se obtienen cerca de 2 millones de ton, siendo los principales estados productores: Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Nayarit, Morelos y Michoacán; y a menor escala: Jalisco, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo y Puebla (Jiménez, 2003). De los principales microorganismos fitopatógenos que pueden causar pérdidas considerables en el cultivo del tomate se encuentra *Fusarium* sp. agente causal de la pudrición del cuello y la raíz del tomate. Se sabe que las especies de *Fusarium* poseen alta capacidad de adaptación a condiciones desfavorables de temperatura, nutriente y pH, entre otras (Michel, 2001). Dichas características favorecen su reproducción e invasión a diferentes hospederos, por lo que su erradicación en algunos casos resulta muy difícil. Para detener la acción de este patógeno se han evaluado métodos de control físico, cultural, químico y biológico. La marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo, disminuye en un 60% el rendimiento y afecta la calidad del producto. Esta enfermedad, la cual se ha reportado en por lo menos 32 países (Jones et al., 1991), prospera en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Cai et al., 2003).

### **5.3.2 Síntomas de la enfermedad**

Los síntomas más notables de Fol ocurren al inicio de la floración, poco después de la formación de los primeros frutos (Beckman, 1987; Mendoza, 1993; Ramírez, 1998). Los síntomas inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un sólo lado de la planta, y en ocasiones sólo en la mitad de éstas (Cárdenas, 2000). Las hojas afectadas se marchitan y mueren, aunque pueden permanecer adheridas al tallo. Si se realiza un corte transversal del tallo, se observa una necrosis vascular de color café en forma de anillo, la cual se extiende hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad, marchitando y matando a las plántulas o plantas adultas (Sánchez, 1998). Las plantas más viejas pueden marchitarse y morir repentinamente; sin embargo, comúnmente muestran achaparramiento, epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez de las hojas y tallo jóvenes, defoliación, necrosis marginal de hojas y finalmente la muerte de la planta (Sánchez, 1998). Cuando las raíces y los tallos son colonizados, los síntomas se muestran como una pudrición necrótica, particularmente sobre las raíces laterales más pequeñas; lo cual acelera el marchitamiento del follaje. Después que la planta muere, el hongo fructifica sobre la superficie del tallo bajo condiciones de ambiente húmedo (Angulo, 1996; Valdez, 1999). El marchitamiento vascular del tomate por *Fusarium* fue primeramente descrito por Masse en 1885 en las Islas de Wight y Guernsey, situadas en el canal de la Mancha. En el año de 1899, la

enfermedad se encontraba ya en los Estados Unidos de América causando severas pérdidas en las áreas dedicadas al cultivo en el norte del estado de Florida (Smith, 1899)



Figura 1. Daños inducidos por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* raza 3 en diferentes órganos de la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). A) planta clorótica o amarilla. B) Raíz con necrosis y áreas color violeta y C) Frutos con necrosis en los tejidos vasculares

### 5.3.2.2 Modo de acción y desarrollo de la enfermedad

El proceso de colonización de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* en tomate ha sido estudiado con el empleo de cepas patogénicas y no patogénicas del hongo. En 1999, Olivain y Alabouvette (1999), utilizaron cepas transformadas con el gen de la glucuronidasa (GUS) como gen reportero, en raíces de tomate en cultivos hidropónicos donde compararon el proceso de colonización de ambas cepas. La tinción de GUS mostró que la cepa patogénica colonizó la raíz rápidamente observándose a las 24 horas las primeras imágenes de penetración de la raíz por el patógeno, y a las 48 horas, una densa red de hifas sobre la superficie de la raíz. Las reacciones de defensa en la planta se localizaron principalmente en la hipodermis y en la corteza. Las hifas formaron una densa red hacia el ápice de la raíz, pero el contacto directo entre las hifas y las células vivas se previno por la formación de



muchas capas de células desprendidas. En los pocos casos en los que se logró la penetración del patógeno, se produjo una rápida destrucción de las células apicales. Las únicas diferencias observadas entre el patrón de colonización de la raíz de una cepa patogénica y el observado en una no patogénica parecen ser la frecuencia de ápices muertos y la intensidad de la colonización fúngica en la corteza. Cuando el patógeno pasó alrededor de la barrera formada por la hipodermis, siempre llegó al xilema, aunque esta barrera y otras reacciones de defensa inducidas a diferentes niveles evitaron siempre que la cepa no patogénica llegara a la estela. Estas observaciones sugirieron que las principales diferencias entre los dos tipos de interacción, entre la planta y las cepas patogénicas o no, eran cuantitativas y no cualitativas (Olivain et al 1999). De forma general, a las 24 horas posteriores a la inoculación, las hifas del hongo crecen inter e intracelularmente en la corteza, apreciándose a las 72 horas un crecimiento micelial bastante denso en todo el tejido de la corteza de la raíz. A los seis días después de la inoculación, las células del parénquima de los haces vasculares y las células xilemáticas se hallan completamente invadidas por el micelio del hongo. Al noveno día, se puede observar una densa colonización de todo el tejido xilemático radical, extendiéndose el micelio a través del xilema de la parte inferior del tallo. A los 15 días de inoculación, el crecimiento del hongo abarca el tejido vascular a diferentes niveles del tallo (Noguera et al 1983). Los primeros síntomas de la enfermedad son el amarillamiento del follaje, comenzando con la caída de las hojas. Las hojas infectadas posteriormente muestran un encrespamiento bajo, seguidamente se oscurecen y se secan. La parte superior de la planta se marchita durante el día y se recupera en la noche, pero el marchitamiento empeora hasta que la planta se marchita completamente observándose el oscurecimiento vascular en los tallos y los pecíolos infectados de las hojas grandes. Las plantas afectadas y sus sistemas de raíces se atrofian. El patógeno puede estar en el suelo como saprófito durante muchos años sin un hospedante. La infección por nematodos formadores de agallas provoca cambios fisiológicos en la raíz. Esto trae como consecuencia que variedades de tomate resistentes a *Fusarium* se vuelvan susceptibles al hongo. Además, otros factores como las altas temperaturas (por ejemplo, 27-28 °C), el tiempo seco y el suelo ácido (pH 5,6) favorecen el desarrollo de la enfermedad (Cerkaukas, 2011).

#### **5.4. Microorganismos agentes de control biológico**

En los últimos años el control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura ha adquirido gran importancia frente a los problemas fitosanitarios ocurridos por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos en la agricultura, lo cual ha traído como consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente y ha generado la resistencia de plagas y enfermedades, así como la presencia de nuevas especies de microorganismos fitopatógenos con un grado de afectación más virulento (Bravo et al., 2006).

Pucheta Diaz et al. (2006), reporta que los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos; Para López-Llorca y Hans-Börje (2001), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*, mientras que para la FAO (2003), los géneros de importancia son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium*.

## **5.5. Mecanismos de acción de los agentes de control biológico**

### **5.5.1. Antagonismo**

Es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004).

### **5.5.2 Fungistasis**

Es la imposición por parte del controlador biológico de dormancia especialmente de esporas fungales por medio de la limitación de nutrientes. La más común de esta, es la relacionada con la disponibilidad de elementos nutritivos, el más estudiado hasta el momento el carbono (Pérez, 2004).

### **5.5.3. Micoparasitismo**

Es la acción antagónica entre dos hongos, el uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. Un antagonista puede utilizar a un hongo como fuente de alimento. Basado en el micoparasitismo se dividen en dos grupos: biotrópicos, tienen un rango restringido de hospedantes, y necrotrópicos, matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias tóxicas y utilizan sus nutrientes (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004).

### **5.5.4. Competencia**

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren para su funcionamiento del mismo alimento. El consumo de uno reduce la cantidad

disponible del otro; al final se impone uno de ellos. La competencia por nutrientes y espacio dentro de su nicho ecológico se realiza en la superficie de la hoja, es el principal mecanismo involucrado en el control de bacterias fitopatógenas; en el caso de hongos es variable. La competencia es un modo de acción indirecto (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

Un ejemplo claro de ese mecanismo de acción se encuentra representado en hongos filamentosos, donde la toma de hierro es esencial para la viabilidad de los mismos. Bajo condiciones de deficiencias de hierro, el hongo excreta agentes quelantes específicos de bajo peso molecular llamados sideróforos, que le permiten tomar el hierro de forma reducida (Eisendle et al., 2004), citado por (Chavez, 2004).

### **5.5.5. Antibiosis**

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1995) las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y  $\beta$ -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman et al., 1994). Entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagónico se incrementa (Pezet et al., 1999).

#### **5.5.5.1. Enzimas hidrolíticas**

Varias enzimas, principalmente proteasas y quitinasas, que degradan la proteína y quitina de la cutícula del insecto, han sido identificadas y caracterizadas en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (El-Sayed et al., 1989). Muchas investigaciones se han realizado con el fin de entender la función de estas enzimas durante eventos de patogenicidad, y aunque la mayoría de los estudios se han enfocado hacia la actividad de las proteasas existen evidencias de que las quitinasas también influyen en la patogenicidad fúngica (Brey et al., 1986; El-Sayed et al., 1989).

En la cutícula, la quitina constituye alrededor del 30 % (Bidochka y Khachatourians. 1992a), y se encuentra formando una barrera estructural que debe ser degradada por quitinasas extraedulares para que las hifas alcancen y se dispersen en la homocela (St. Leger et al., 1986b; Hayek and St. Leger. 1994). Por lo tanto, las quitinasas tienen un papel importante en la degradación de la cutícula y penetración del insecto (St. Leger et al., 1996a; Vanagita. 1980), y su actividad se ha relacionado con la virulencia del hongo (El-Sayed et al., 1989; Gupta et al., 1994).

### 5.5.5.2 Quitina y enzimas quitinolíticas

La quitina, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, tan sólo en el medio acuático se producen anualmente 1011 ton métricas (Tsuji et al., 1998), es componente estructural del exosqueleto de artrópodos, crustáceos, y pared celular de levaduras y hongos (Flach et al., 1991), se ha encontrado en nemátodos, protozoarios, diatomeas (Trudel y Asselin. 1989), en la cutícula y membrana peritrófica del intestino de insectos (Richards y Richards. 1977). Es un polímero lineal formado de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) unidos por enlaces (3(1,4) y es altamente resistente a solventes orgánicos (Nuero. 1995).

Las isoenzimas quitinasas, encargadas de degradar la quitina, son producidas por una amplia variedad de organismos, incluyendo hongos, virus, crustáceos y algas (Morimoto et al., 1997) y aún en aquellos que no poseen quitina, como bacterias, plantas y animales (Shen y Jacobs-Lorena. 1997). Estas enzimas cumplen varias funciones, p.e. en hongos, las quitinasas participan en la regulación del crecimiento, degradan la quitina de la pared celular durante la separación y origen de una célula hija (de Siqueira et al., 1997; Flach et al., 1991; Kuranda y Robbins. 1991), y en la obtención de nutrientes a partir de quitina. Las bacterias, plantas y animales producen quitinasas como parte de su sistema de defensa contra patógenos y plagas, lo cual es un ejemplo que resalta la significancia de las quitinasas en interacciones ecológicas entre organismos (Jones et al., 1986; Brurberg et al., 1994; Boller. 1987; Flach et al., 1991).

Por otro lado, las enzimas quitinasas son utilizadas artificialmente con varios propósitos: p.e. en el control biológico de hongos fitopatógenos, degradación de desechos de crustáceos, modificación química de quitina y quitosán (Young et al., 1985; Tronsno y Harman. 1993), y se han empleado para incrementar la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* (Sampson y Gooday. 1998; Kramer y Muthukrishnan. 1997; Rege et al., 1996; Wiwat et al., 1996).

### 5.5.5.3 Hidrólisis de quitina

El proceso de degradación de la quitina ocurre principalmente en dos pasos, primero una endoquitinasa (EC 3.2.1.14: quitinasa ó polí- $\beta$ -1,4-p-(2acetamida-2-desoxi-D-glucosido) glicanohidrolasa) realiza la hidrólisis del polímero  $\beta$ -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina, liberando oligómeros de longitud variable, posteriormente actúan las exoquitinasas: a), quitobiosidasa que liberan dímeros de NAG quitobiosa, y b). quitobiasa (EC 3.2.1.30; EC 3.2.1.52) ó *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa ó 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosido, acetamidodesoxiglucosa hidrolasa, que libera monómeros de

NAG, del extremo no reductor de los dímeros u oligómeros. Esas enzimas se expresan casi simultáneamente bajo patrones similares, indicando que están bajo un control regulatorio común y actúan sinérgicamente (El-Sayed et al., 1989; St. Leger et al., 1986b).

#### **5.5.5.4 Regulación de enzimas quitinolíticas**

La síntesis de enzimas quitinolíticas, y posiblemente de algunas proteasas, está regulada a través de un mecanismo inductor-represor (St. Leger et al., 1993; Bidochka y Khachatourians. 1988). Los principales sustratos que inducen la síntesis de quitinasas son la quitina, quitosán y glicol quitina (de Siqueira et al., 1997; St. Leger et al., 1986a), pero cuando el medio de cultivo no contiene sustrato inductor, la síntesis se mantiene en niveles basales. Por otro lado, la adición o presencia de carbohidratos, lípidos o proteínas (Bidochka y Khachatourians. 1992b; St. Leger et al., 1986a) y alta concentración de NAG en el medio de cultivo, reprimen la producción de quitinasas (Havukkala et al., 1993).

#### **5.5.5.5 Glucanasas**

De igual forma las glucanasas ( $\beta$ -1,3 glucanasas, así como las quitinasas actúan sinérgicamente, e inhiben la germinación de la espora y el crecimiento de algunos patógenos (Benitez, 1998; El-Katatny, 2001).

Se ha mostrado que 1,3-glucanasas inhiben la germinación de esporas o el crecimiento de patógenos en cooperación sinérgica con quitinasas (Benitez, et al., 1998) y antibióticos (Harman et al., 2004)

## 5.6. Microorganismos antagonistas como controladores biológicos de enfermedades

**Cuadro 1. Hongos entomopatógenos empleados en el control biológico.**

GENERO	ESPECIE
<i>Metarhizium</i>	<i>M. anisopliae</i> <sup>1</sup> <i>M. flavoviridae</i>
<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i> <sup>1</sup> <i>B. brongniartii</i> <sup>1</sup> <i>B. tenella</i>
<i>Aschersonia</i> <i>Entomophthora</i> <i>Zoophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Eryniopsis</i> <i>Akanthomyces</i> <i>Fusarium</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i>	<i>A. aleyrodis</i> <i>Entomophthora</i> spp. <i>Zoophthora</i> spp. <i>Erynia</i> spp. <i>Eryniopsis</i> spp. <i>Akanthomyces</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>H. thompsonii</i> <i>Hymenostilbe</i> spp
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. farinosus</i> <i>P. fumosoroseus</i> <sup>1</sup> ( <i>Isaria fumosoroseus</i> ) <sup>3</sup> <i>P. tenuipes</i> <i>P. lilacinus</i>
<i>Lecanicillium</i> <sup>2</sup> ( <i>Verticillium</i> )	<i>L. lecanii</i> <i>L. longispoum</i> <i>L. muscarium</i> ( <i>Verticillium lecanii</i> )
<i>Rhizopus</i> <i>Cordyceps</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Lagenidium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Gliocladium</i> <i>Pochonia</i>	<i>Rhizopus</i> spp. <i>Cordyceps</i> spp. <i>Culicinomyces</i> spp. <i>Lagenidium giganteum</i> <i>N. rileyi</i> <i>Gliocladium</i> spp. <i>P. chlamidiospora</i> <sup>4</sup> ( <i>Verticillium chlamidiosporium</i> ).

1Hongos de mayor utilización en el mundo según Tellez-Jurado et al. (2009).

2Actual clasificación taxonómica según Cortez-Madrigal (2006); Elósegui (2006); Eloségui y Elizondo (2010).

3Nueva denominación de *P. fumosoroseus* según Luangsa-Ard et al. (2005); Hoy et al. (2010).

4Según Elosegui (2006).

### 5.6.1. *Beauveria bassiana*

Las especies del género *Beauveria* actualmente son estudiadas por su importancia como agentes de control biológico de plagas de insectos y hongos fitopatógenos en diversos cultivos de importancia económica en aplicaciones a campo abierto (Rehner y Buckley, 2005).

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  $\mu\text{m}$  (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). A nivel laboratorio, existe riesgo de que características como crecimiento, esporulación y virulencia de una cepa disminuya o se pierda debido a la repetición de cultivos a la cual se somete para su conservación y/o manejo. Sin embargo, con un reaislado de las cepas después de atacar y reemerger del insecto es una manera adecuada de recuperar sus características (Hayden et al., 1992) .

*Beauveria bassiana* actúa como parásito oportunista de hábitos patogénicos y saprófitos sobre diversos fitopatógenos limitando su actividad mediante la producción de enzimas quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas que son importantes para la invasión y degradación del blanco fitopatógeno (Peteira et al., 2011; Flórez et al., 2005).

El hongo infecta el insecto u hongo patógeno por la penetración directa de la cutícula o pared celular empleando diferentes enzimas. Las quitinasas son importantes para facilitar cada etapa de la infección del hongo, desde el proceso de germinación de la conidia, crecimiento de la hifa y hasta la penetración de esta en el organismo afectado (Ownley et al., 2010; González et al., 2010).

### **5.6.2. Paecilomyces spp.**

Los conidióforos del genero *paecilomyces* son ramificados, agrupados o irregulares. Los conidios se encuentran agrupados en forma de cadena.

Presenta un rápido crecimiento de sus hifas. El conidióforo presenta grupos de ramificaciones laterales, cada uno de las cuales presenta de 2 a 4 divisiones ovaladas antes de los conidios. Estos últimos tienen una longitud de 2,5-3,0 $\mu\text{m}$  y de 2,0-0,2 $\mu\text{m}$  de ancho presentan coloración lila (Samson 1975). Las colonias crecen de 5-7 cm en 14 días a 25°C presentando un color lila.

*Paecilomyces fumosoroseuses* descrito como un patógeno natural que está siendo investigado para el control biológico de 41 especies de plagas pertenecientes a 25 familias de insectos. Dentro de las más importantes aplicaciones que se le han dado es para el control de la mariposa del fruto del durazno (*Carposina sasakii*Matsumura), termitas, escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*Say), mariposa gypsy (*Lymantria dispar*Gallería mallonella) (Samson, 1974) mariposa del dorso de diamante(*Plutella xy/fosteffa*),el áfido ruso del trigo (*Diuraphis noxia*) y por supuesto la mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*).

*P. fumosoroseus*, pertenece a la subdivisión deuteromicotina (hipomicetos), también conocidos como hongos imperfectos. Como todos los miembros de este grupo, carece de forma sexual. Se caracteriza por presentar hifas hialinas o amarillentas, septadas y de paredes suaves. Las estructuras conidiógenas son sinematosas o mononematosas, que consisten en conidióforos verticiliados o irregulares, presentan en cada una de las ramas acúmulos de células conidiógenas, las cuales pueden ser solitarias en las hifas fértiles. Las conidias se encuentran en cadenas basopetales divergentes o enredadas, son hialinas o ligeramente pigmentadas con paredes suaves o equinuladas de varias formas (Smith, 1993).

El género *Paecilomyces* contiene especies brillantemente coloreadas: amarillo, blanco, verde pálido, rosa, rojo o morado. Las colonias de *P. fumosoroseus* al esporular son al principio blancas, pero cambian a tonalidades de rosa, y podrían llegar a teñirse de gris con la edad (Smith, 1993).

Las propiedades de *Paecilomyces lilacinus* como entomopatógeno, la conservación de la virulencia en la preparación (antes de su aplicación y después de un período de almacenamiento) y la especificidad que presentan, han sido objeto de estudios en los últimos años. Otro aspecto estudiado, es con respecto a su actividad biocida reportándose que las enzimas proteolíticas y quitinolíticas de *P. lilacinus* están involucradas en el ataque a los huevos de los nematodos. (Gomez et al 2001).

*P. lilacinus* parasita huevos, juveniles y hembras de nematodos (Kunert et ál. 1987, Dackman et ál. 1989, Park et ál. 2004, Schenck 2004). Desde los estudios de Jatala et ál. (1979) a la fecha (Kiewnick et ál. 2011, Kiewnick y Sikora 2006a y b; Schenck 2004, Romero y Trabanino 2006, Mendoza y Sikora 2009) se ha demostrado el potencial de *P. lilacinus* para combatir varias especies de nematodos en varios cultivos alrededor del mundo.

### **5.6.3. *Metarhizium anisopliae***

El género *metarhizium* se caracteriza por presentar conidióforos que forman una capa de esporas: las fialides pueden ser solas, en pares o en manojos; los conidios se producen en cadenas de basipetalos compactados en columnas, son ovoides o cilíndricos, unicelulares. Los conidios pueden ser hialinos o ligeramente pigmentados de verde oliva con tamaño de 7-9µm de largo y 4,5-5µm de ancho (Domsch y Gams 1980). Las colonias crecen lentamente alcanzando hasta 2 cm en 10 días a 20°C sobre medio de cultivo sintético.

*M. anisopliae* tiene un óptimo crecimiento a una temperatura de 25°C y puede crecer in vitro en un rango de pH de 3,3-8,5; se requiere de una alta humedad para que se desarrolle conidios. La alta presencia de CO<sub>2</sub> y la deficiencia favorece la supervivencia de los aislamientos (Domsch & Gams 1980).



*M. anisopliae* es un patógeno facultativo que ataca más de 200 especies de insectos (Fargues 1976). La especie ha sido clasificada en dos variedades sobre la base del tamaño de los conidios: *M. anisopliae* var. *anisopliae* (conidios más pequeños 3,5-9 $\mu$  de largo) y *M. anisopliae* var. *Majus* (conidios más largos, en un rango de 9-18 $\mu$ ) (Tulloch 1976, Samsom et al. 1988). El modo de acción de *M. anisopliae* puede variar tanto en relación con el patógeno como con el hospedero (Ferron 1978).

Estudios relacionados con la penetración de la cutícula del huésped han demostrado que este hongo inicia la colonización del cuerpo de los insectos mediante la formación de estructuras de presión y la producción de enzimas extracelulares proteolíticas como subtilisina (PR1) Y metaloproteasas, así como también enzimas con actividad quitinolítica (Leal et al., 1997; St. Leger et al., 1998)

## **6. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

### **6.1. Microorganismos**

Los aislados de los hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp.) se obtuvieron del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), General Terán, Nuevo León. La cepa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue proporcionada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### **6.2. Cultivo de hongos in vitro**

Fueron inoculados por separado en cajas Petri conteniendo medio PDA durante 7 días para mantener el crecimiento activo hasta su utilización

### **6.3. Actividad antagónica**

#### **6.3.1. Confrontación dual**

La actividad de las 9 cepas de hongos entomopatógenos contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue evaluada usando el método de confrontación dual,. 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 inoculó en el margen de la caja Petri con medio PDA y en el margen equidistante con una separación de aproximadamente 5 cm, se transferiró un disco con crecimiento micelial del hongo fitopatógeno (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*). Las cajas se mantuvieron a 28  $\pm$ 2°C hasta el momento en que las hifas de ambos hongos entraron en contacto. Los experimentos se realizaron por trílizado. Los controles fueron cajas Petri sólo con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. El efecto supresor o inhibidor se evaluó empleando el Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento Radial (PICR) de *F.*

*oxysporum* f.sp. *lycopersici* acorde a las mediciones que se efectuarán cada dos días (Gaigole et al. 2011).

### 6.3.2. Producción de compuestos volátiles

Un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada una de las cepas antagonicas (entomopatógenos) con un crecimiento activo de 7 días, se inoculó en sentido opuesto al medio PDA (tapa de la caja Petri) mientras que el disco de 5 mm de diámetro de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue transferido al centro del medio PDA contenido en la caja Petri paralelo al disco micelial de las cepas antagonicas. Para los tramtamientos control se inocularon cajas Petri solo con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Las cajas Petri empleadas fueron selladas con parafilm e incubadas a 28 ±2°C durante siete días. El crecimiento radial del hongo se midió y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial posterior a los siete días empleando el mismo procedimiento que en el método de confrontación dual (Dubey et al. 2007).

**Cuadro 2. 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

### 6.4. Producción de enzimas hidrolíticas

#### 6.4.1. Preparación de medios de cultivo enriquecidos.

Con el propósito de cuantificar la producción específica de quitinasas y glucanasas de las cepas de entomopatógenas, se utilizó la metodología propuesta por Rajeswari, (2015). Matraces Erlenmeyer de 250 mL, se colocaron 50 mL de medio de cultivo. El medio empleado conformado por MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/l; KCl, 0.5g/l; NaNO<sub>3</sub>, 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 suplementó con quitina en polvo, 1% (p/v) ó laminarina, 0.1% (p/v) para la producción específica de quitinasas y glucanasas, respectivamente. Posteriormente, se inocularon con 4 discos miceliales (5 mm Ø) y se incubaron a 28°C, 12 h luz/oscuridad en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 8 días (Ahmed Idris et al. 2007).

#### **6.4.2. Determinación de parámetros de desarrollo de los aislados de hongos entomopatógenos.**

##### **6.4.3 pH**

Cada dos días se realizó la recolección de 15 ml del matraz sin filtrar para medir el pH del medio hasta finalizar el experimento.

##### **6.4.4 No. De esporas**

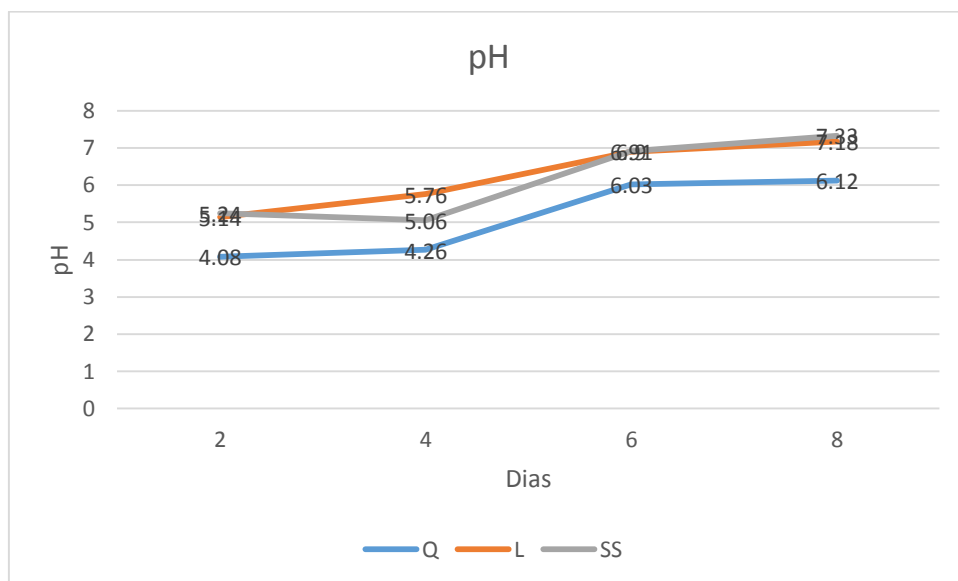
De la recolección de 15 ml del matraz que se tomaba cada dos días se preparó una dilución 1:5, posteriormente se depositó una gota en la cámara de Neubauer y se observó en el microscopio.

##### **6.4.5 Obtención de Biomasa**

Cada dos días se realizó el filtrado y obtención de la solución enzimática hasta finalizar los ocho días de duración del experimento. En el transcurso del periodo de incubación se separó la biomasa por filtración con papel filtro Whatman No.1; Se obtuvo peso de biomasa fresca e inmediatamente se colocó en estufa a 50°C para obtener peso seco.

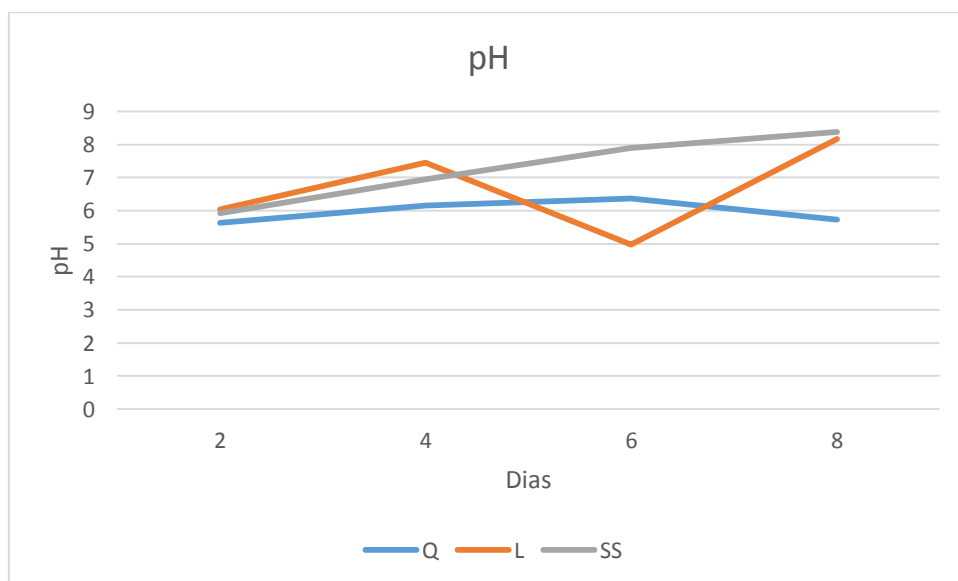
## 7.RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 pH



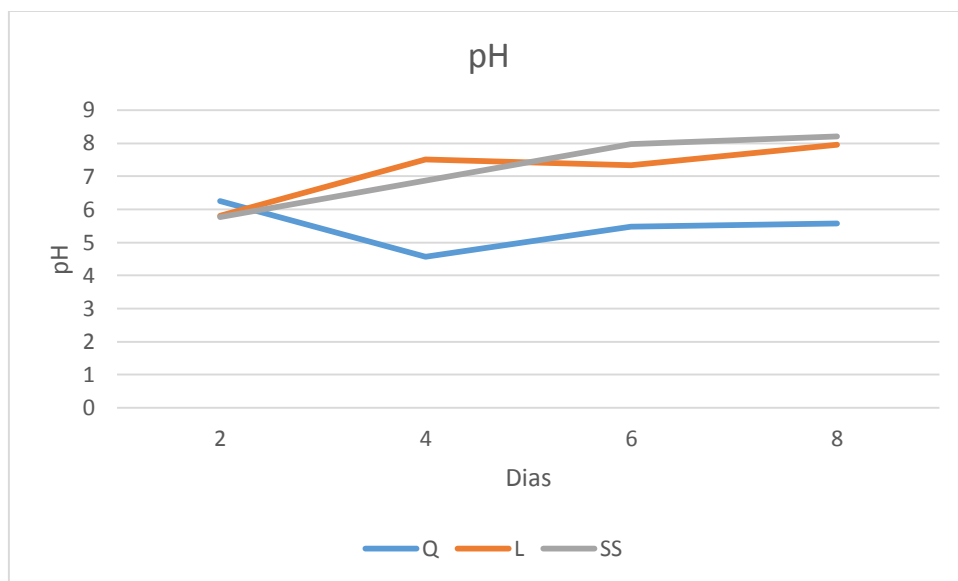
**Figura 2. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 37).**

En la Figura 2, se observa variaciones en el pH de los medios con diferentes fuentes de carbono. Podemos apreciar en los tres medios un aumento del pH a partir del cuarto día, y cómo el pH se mantiene es decir no cambia después del sexto día; mientras que los medios adicionado con laminarina y el medio sin sustrato permanecieron con valores similares al neutro, mientras que el medio adicionado con quitina el pH se clasificó como ácido durante toda su cinética.



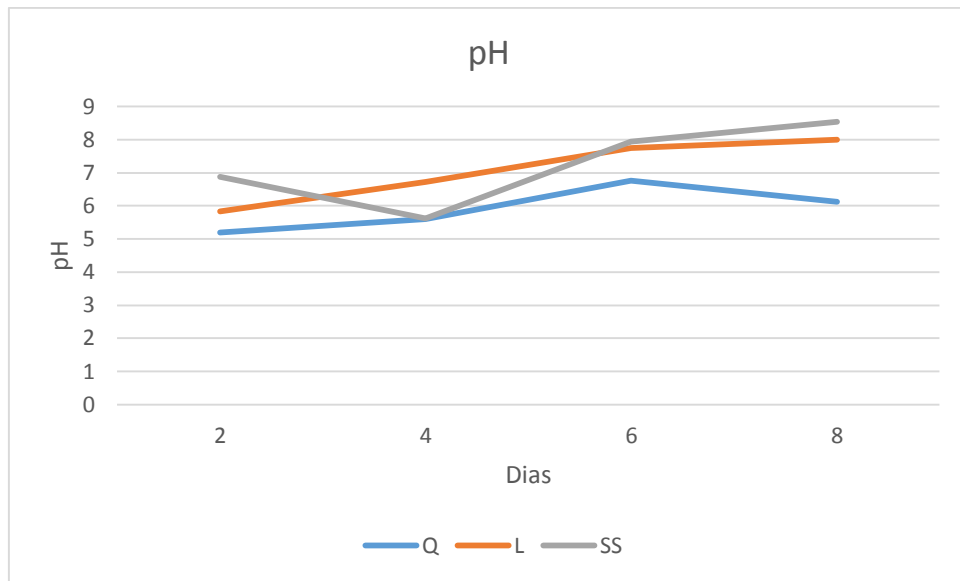
**Figura 3. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 32.1).**

En la Figura 3, se observa variaciones en el pH de los medios con diferentes fuentes de carbono. El pH en el medio sin sustrato aumentó durante el crecimiento de la cepa hasta pH alcalino, el pH del tratamiento con laminarina aumentó, y descendió en el cuarto y sexto día, finalmente al octavo vuelve a aumentar, el valor del pH en el medio adicionado con quitina aumentó al cuarto día donde se mantuvo hasta el sexto y nuevamente descendió.



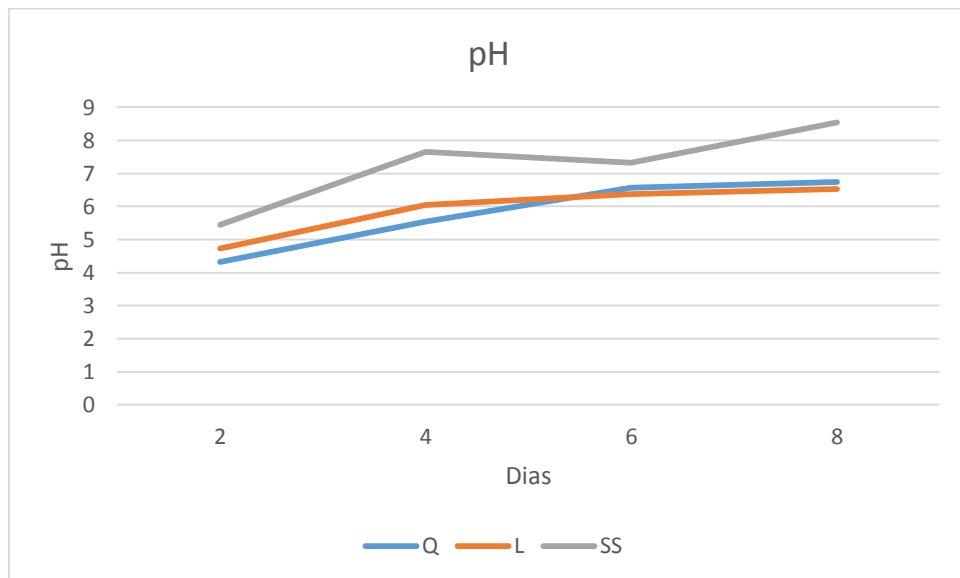
**Figura 4. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 33D).**

En la Figura 4 se observa variaciones de pH de los medios con diferentes fuentes de carbono, el pH del medio sin sustrato aumentó durante el crecimiento de ácido a alcalino, después del cuarto día hasta el octavo. El pH del medio con laminarina aumento al cuarto día de igual manera manteniéndose neutro hasta el día seis y finalmente cambió a básico al octavo día. El pH del medio con quitina disminuyó al cuarto día, y al sexto día subió y se mantuvo hasta así el octavo día; el crecimiento de la cepa en este medio fue ácido.



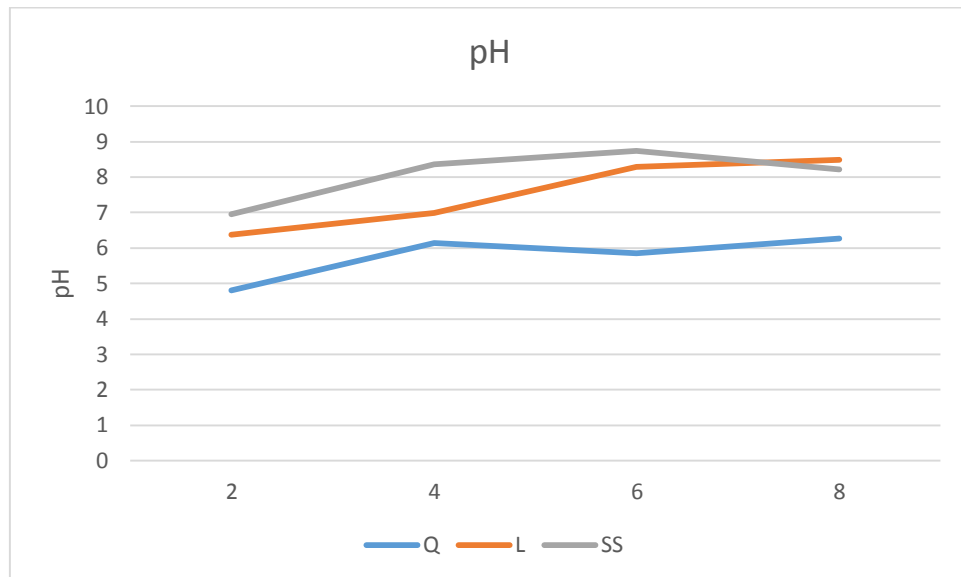
**Figura 5. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa xolo).**

En la Figura 5 se observa variaciones en el pH de los medios con diferentes fuentes de carbono, se aprecia un aumento del pH del medio con laminarina durante el crecimiento con valores de pH 6 a 8 que, similar al pH del medio sin sustrato en donde el pH descendió al cuarto día y continuó aumentando hasta el octavo día, mientras que el pH del medio con quitina sigue siendo ácido con una pequeña variación al sexto día donde aumentó casi a 7 durante todo el crecimiento.



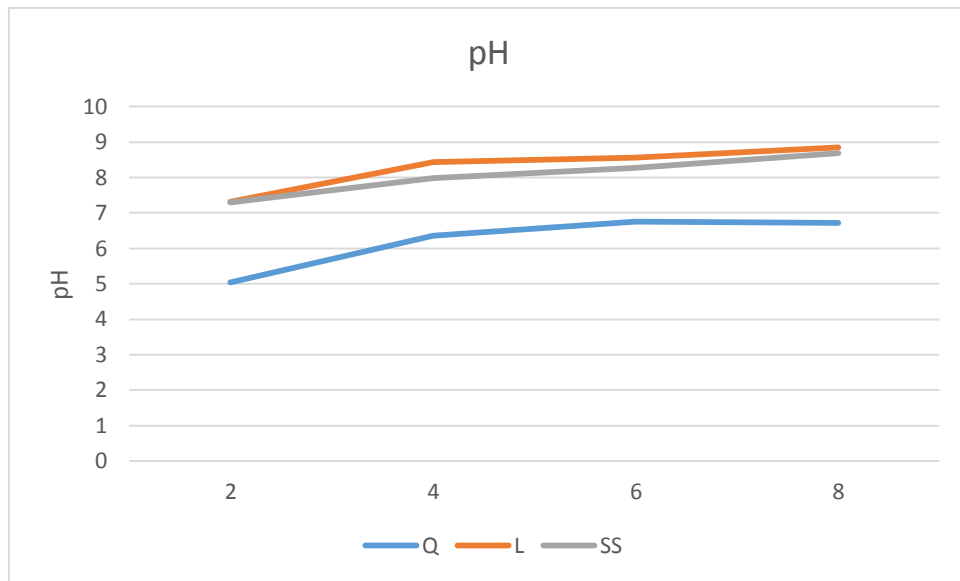
**Grafica 6. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *M. anisopliae* (cepa 122A).**

En la Figura 6 se observan las variaciones en los valores de pH de los medios con diferentes fuentes de carbono; el medio sin sustrato aumento al cuarto día al sexto se aprecia un leve descenso, pero nuevamente sube al octavo día, el ph en este medio se mantuvo neutro hasta el día seis terminando con ph básico, el ph del medio con laminarina y quitina se comportaron de manera similar, llegando casi a ser neutros al octavo día.



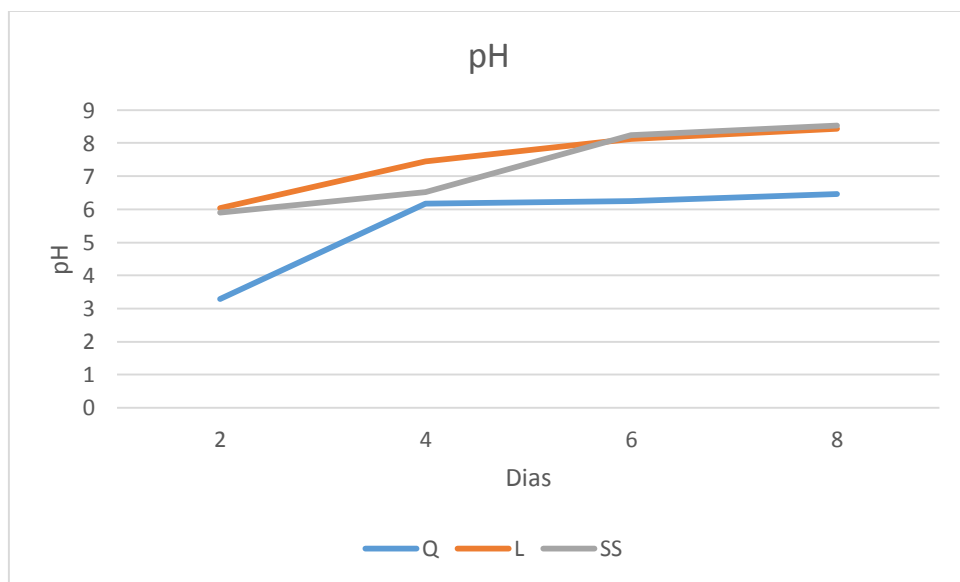
**Figura 7. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 12-11A2).**

En la Figura 7 se observa diferentes comportamientos en los valores de pH de los medios con diferentes fuentes de carbono; el pH del medio con quitina aumento de 5 a pH 6 el día cuatro y se mantuvo así hasta el octavo día, el pH del medio con laminarina fue aumentado desde el día dos con pH de 6 hasta pH cercano a 9 al octavo día; mientras que el pH del medio sin sustrato aumento del día dos al sexto su pH y disminuyendo al octavo día.



**Figura 8. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 129A).**

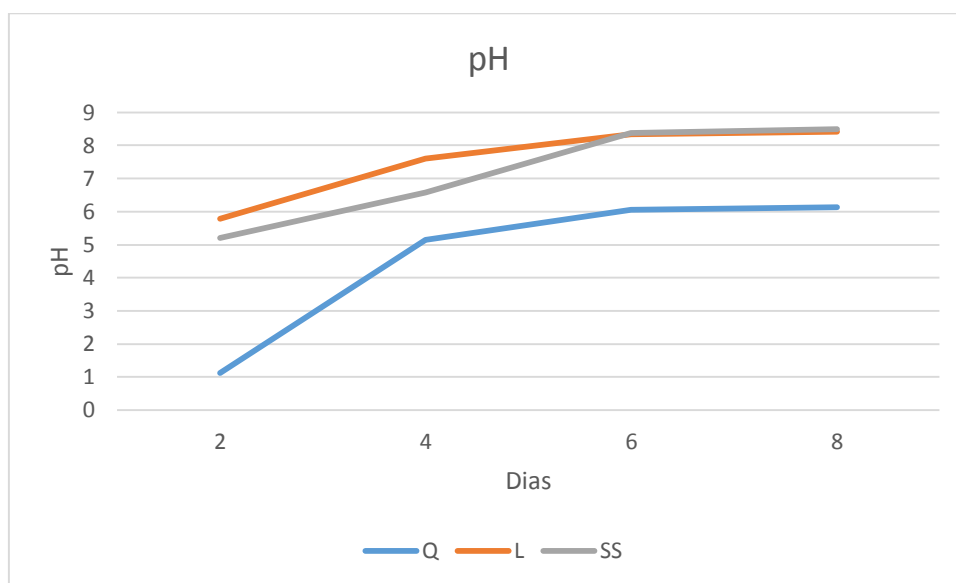
En la Figura 8 se observan las variaciones de pH de los medios con diferentes fuentes de carbono durante el crecimiento de la cepa 129A correspondiente a una *B. bassiana*; el pH del medio con laminarina es similar al pH del medio sin sustrato ambos aumentaron el pH durante su crecimiento como se observa el pH de ambos en el día dos era de 7 y finalizan al día 8 con un pH cercano a 9, mientras que el pH del medio con quitina se mantuvo a partir del cuarto día en valores cercanos a 7 puede apreciarse que en este medio la cepa creció con pH ácido desde el inicio.





**Figura 9. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 12.11A1).**

En la Figura 9 se aprecia la variación de pH de los medios con diferentes fuentes de carbono, el pH del medio con quitina registro el pH más bajo el día dos, al sexto día el pH era de 6 y se mantuvo así hasta el octavo día, la cepa en este medio se desarrolló en pH ácido mientras que en el medio con laminarina el pH aumento de 6 a alrededor de 9 cambiando de ácido a básico de manera similar al pH del medio sin sustrato.



**Figura 10. Comparación de los cambios de pH con los diferentes sustratos durante el crecimiento de *Paecilomyces* (cepa 128A).**

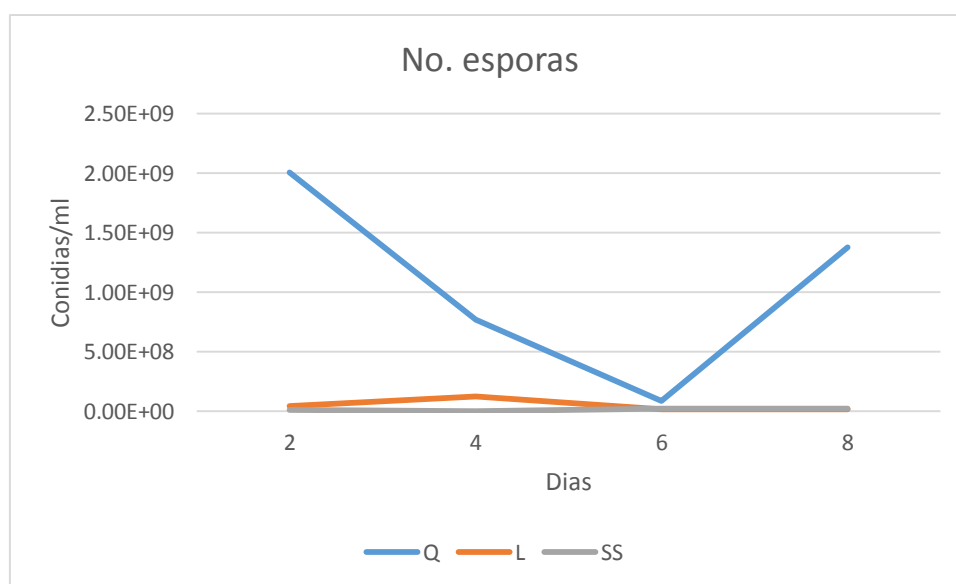
En la Figura 10 se observa las variaciones de pH de los medios con diferentes fuentes de carbono, el pH del medio con quitina presento al segundo día un pH de 1 y al cuarto día un drástico cambio a pH 5, la cepa se desarrolló en valores desde pH 6 hasta el octavo día, el pH del medio con laminarina aumento de pH 6 a pH cercano a 9 durante el crecimiento de la cepa, de la misma manera el medio sin sustrato presenta un comportamiento similar a este.

Todas las cepas de *B. bassiana* (cepas 37, 32.1, 33D, Xolol, 12-11A2, 129A, 12.11A1) tuvieron comportamientos similares en el pH del medio con quitina, los valores se registraron por debajo de 7, oscilando entre 5 y 7 por lo que el desarrollo de estas cepas fue en pH ácido de la misma manera para *M. anisopliae* (cepa 122A) y *Paecilomyces* spp. (cepa 128A) que crecieron en valores por debajo de pH 7 durante los 8 días en el que se desarrolló la cinética; el pH está estrechamente relacionado con la biomasa por lo que en este sustrato debió haber mayor

producción de biomasa, el ph del medio con laminarina aumentó durante el desarrollo de la cinética en todas las cepas de *B. bassiana* y en *M. anisopliae* presentó un comportamiento similar al medio con quitina; la cepa 32.1 que es una especie de *B. bassiana* presentó un aumento y descenso en el ph del medio con laminarina.

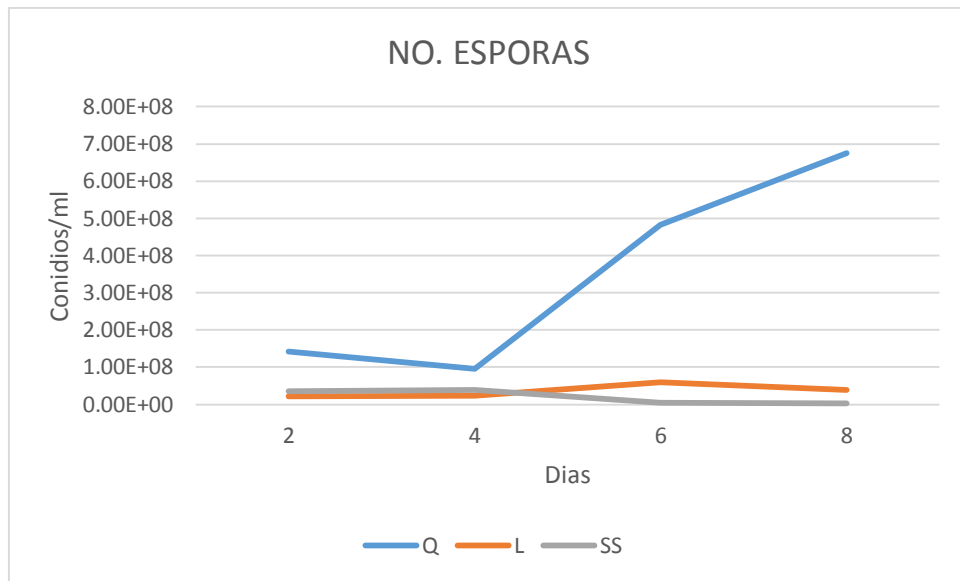
Se evidencia claramente que en general los hongos tienen un pH óptimo cercano a 5, especialmente fitopatógenos, que tienen un mejor funcionamiento de su maquinaria enzimática en esos ambientes; por lo que el pH ácido del medio con quitina indica mayor actividad enzimática según reportan algunos autores como (Cayrol y Col 2001) y esta a su vez favoreció el aumento de biomasa.

## 7.2 Número de Esporas



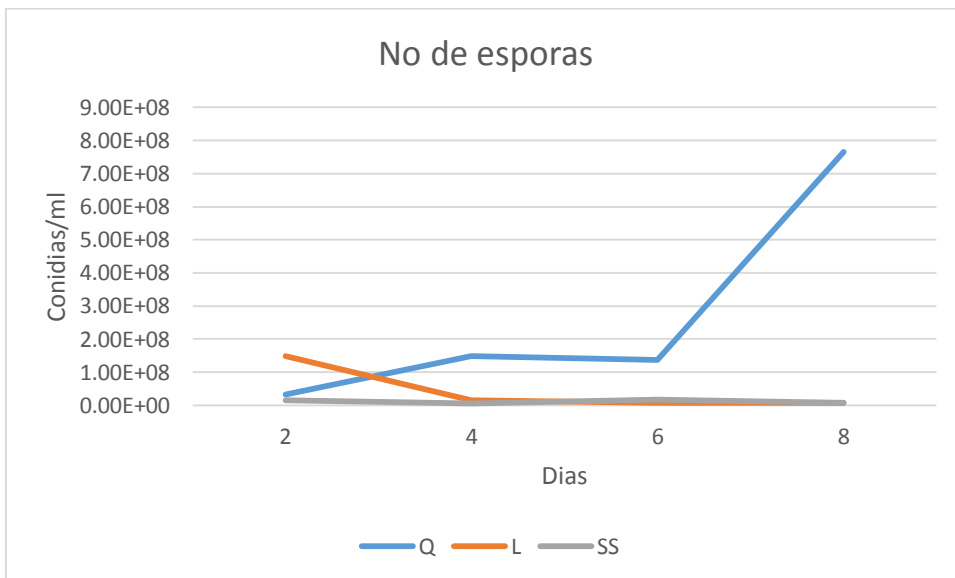
**Figura 11. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 37)**

En la Figura 11 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 37 (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, siendo mayor la del día dos y la menor el sexto día, se aprecia que los medios de laminarina y sin sustrato no sobrepasaron los  $5 \times 10^8$  conidias/ml durante toda la cinética y el comportamiento es similar.



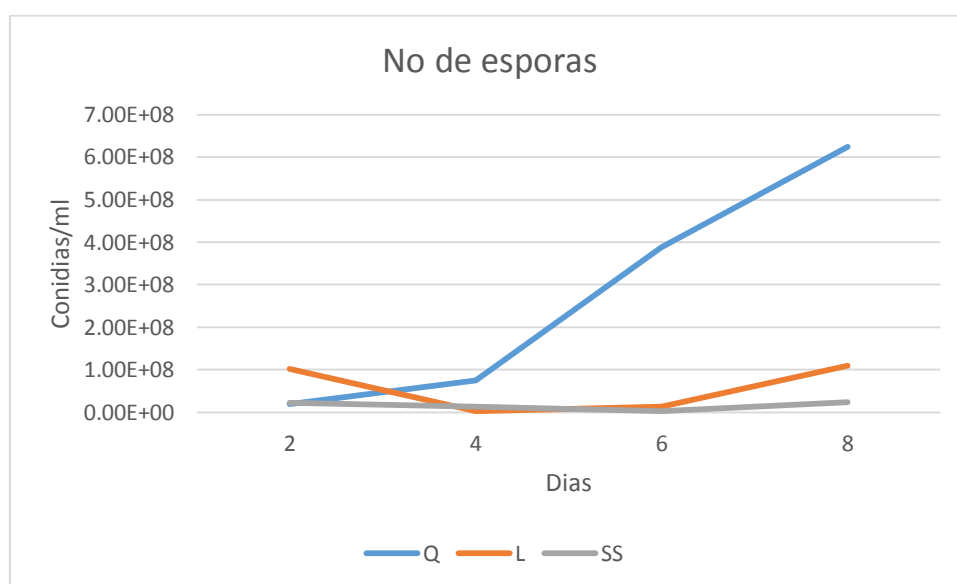
**Figura 12. Comparación del número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 32.1).**

En la Figura 12 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 32.1 (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidias aumentó cada día siendo mayor la del octavo día, se aprecia que los medios de laminarina y sin sustrato no sobrepasaron los  $1 \times 10^8$  conidias/ml durante toda la cinética y el comportamiento es similar.



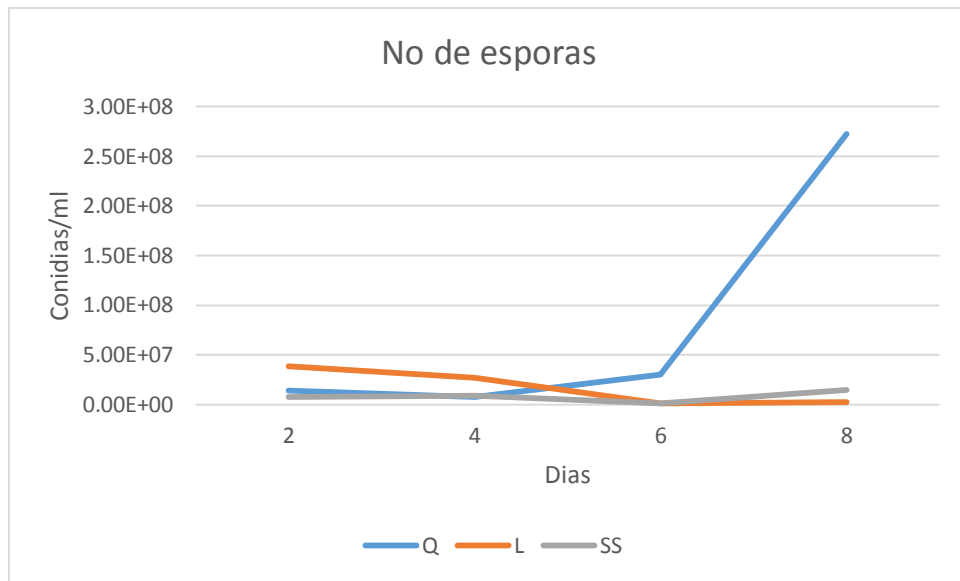
**Figura 13. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 33D).**

En la figura 13 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 33D (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó al cuarto día, manteniéndose así hasta el sexto día y aumentando al octavo, se aprecia que el medio de sin sustrato no sobrepasó los  $1 \times 10^8$  conidios/ml durante toda la cinética, y del medio de laminarina desciende drásticamente después del segundo día en donde a partir del cuarto día su comportamiento es similar al medio sin sustrato.



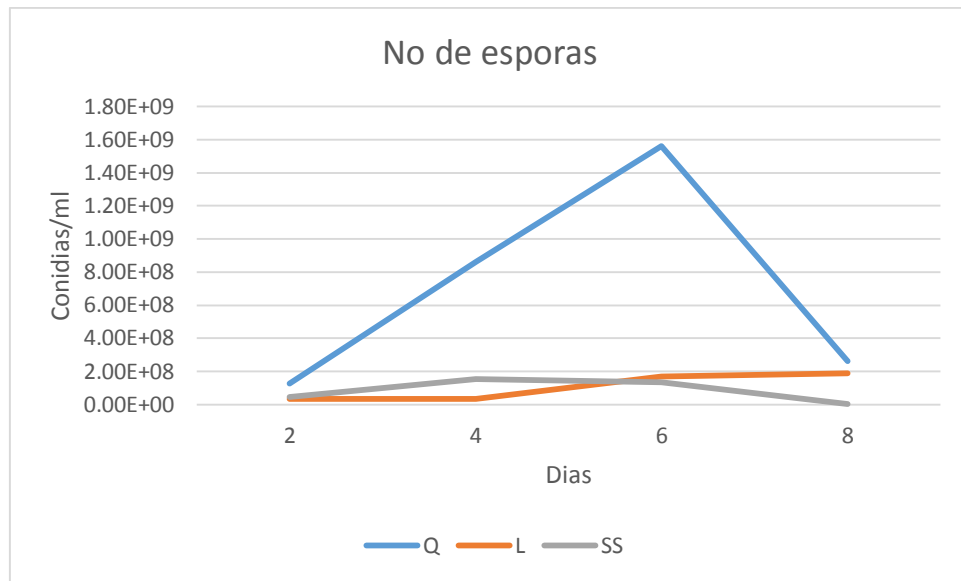
**Figura 14. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa Xolol).**

En la Figura 14 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa Xolol (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó cada día siendo mayor la del octavo día, se aprecia un aumento y descenso de esporas durante la cinética del medio con laminarina, el medio sin sustrato fue el más bajo en número de esporas ya que se encuentra por debajo de las  $1 \times 10^8$  conidios/ml.



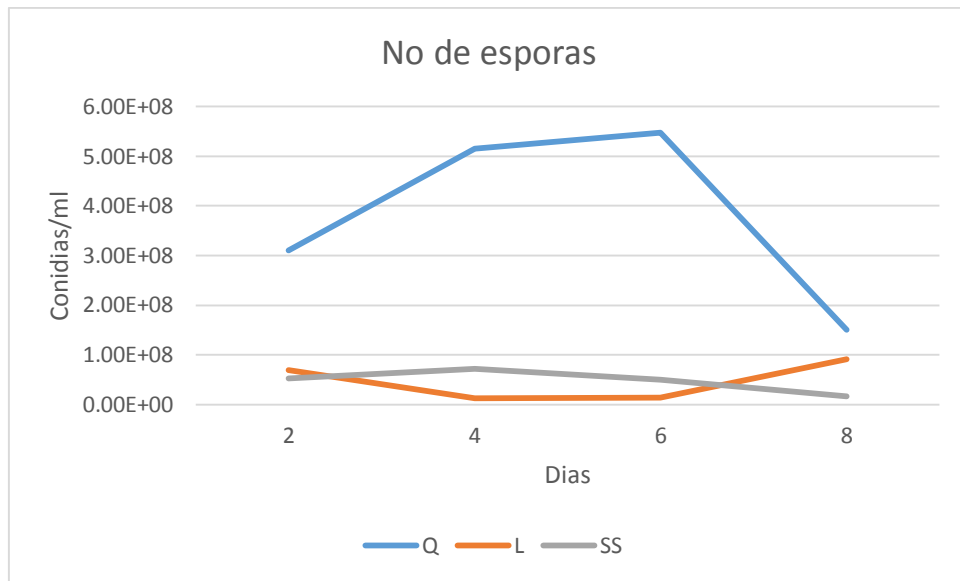
**Figura 15. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *M. anisopliae* (cepa 122A).**

En la Figura 15 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 122A (*M. anisopliae*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó del sexto al octavo día, se aprecia un descenso de esporas durante la cinética del medio con laminarina después del cuarto día, el medio sin sustrato fue el más bajo en número de esporas ya que se encuentra por debajo de las  $5 \times 10^7$  conidias/ml.



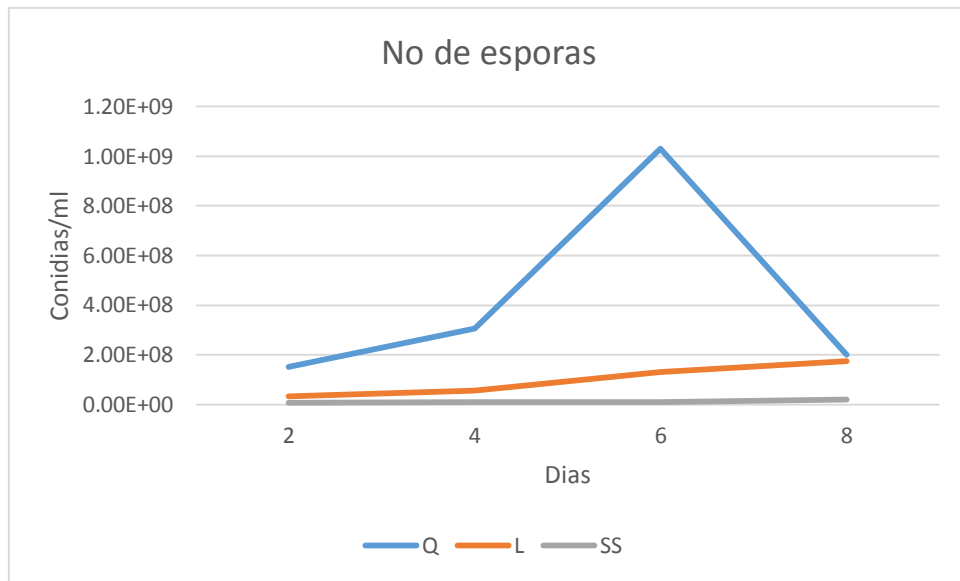
**Figura 16. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 12-11A2).**

En la Figura 16 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 12-11A2 (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó cada día siendo mayor al sexto día, se aprecia un descenso del número de esporas al octavo día. Las esporas en el medio con laminarina aumentaron al sexto día donde el número se mantuvo cerca de las  $2 \times 10^8$  conidias/ml, el medio sin sustrato fue el más bajo en número de esporas ya que se encuentra por debajo de ésta.



**Figura 17. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 129A).**

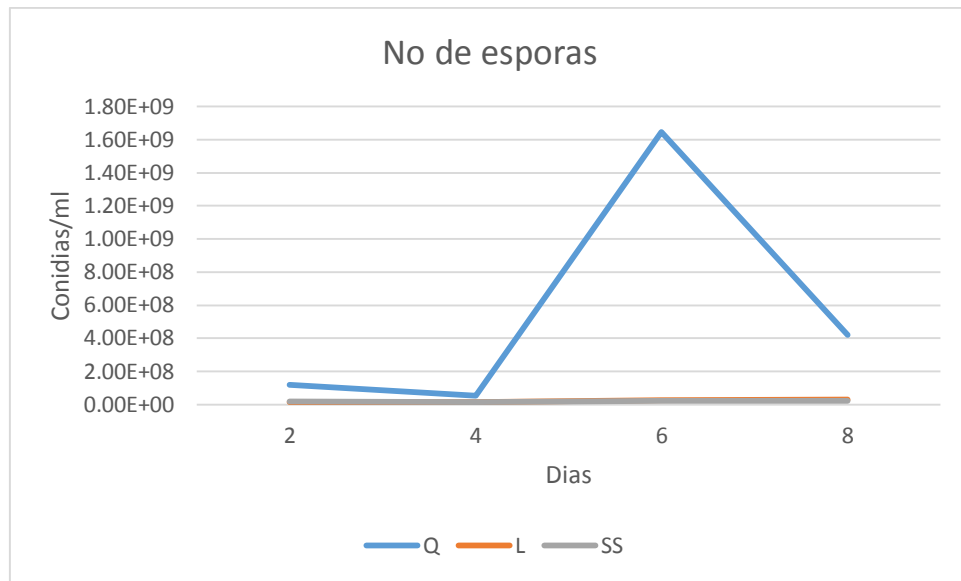
En la figura 17 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 129A (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó cada día siendo mayor al sexto día, se aprecia un descenso del número de esporas al octavo día. Las esporas en el medio con laminarina descendieron después del segundo día y aumentaron al octavo día donde el número se mantuvo cerca de las  $1 \times 10^8$  conidias/ml, el medio sin sustrato aumento al cuarto día y después fue descendiendo hasta al octavo día, el número de esporas de ambos medios se mantuvo dentro de este rango.



**Figura 18. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de *B. bassiana* (cepa 12.11A1).**

En la figura 18 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 12.11A1 (*B. bassiana*) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó cada día siendo mayor al sexto día, se aprecia un descenso del número de esporas al octavo día. Las esporas en el medio con laminarina aumentaron después del cuarto día donde el número se mantuvo cerca de las  $2 \times 10^8$  conidias/ml, el medio sin sustrato fue el más bajo en número de esporas ya que se encuentra por debajo de ésta.



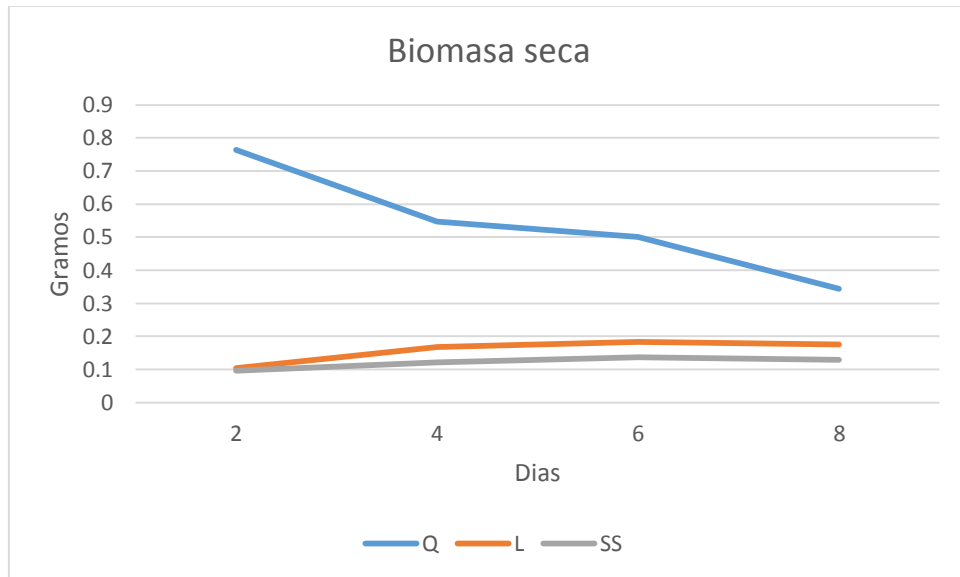


**Figura 19. Comparación número de esporas en los diferentes sustratos durante el crecimiento de Paecilomyces spp. (cepa 128A).**

En la figura 19 se observan las variaciones del número de esporas de la cepa 128A (*Paecilomyces* spp.) durante su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que el número de esporas fue mayor en el medio adicionado con quitina, el número de conidios aumentó cada día siendo mayor al sexto día, se aprecia un descenso del número de esporas al octavo día. Las esporas en el medio con laminarina y el medio sin sustrato permanecieron debajo de las  $2 \times 10^8$  conidias/ml siendo estas iguales ya que no se aprecia diferencia entre estos dos.

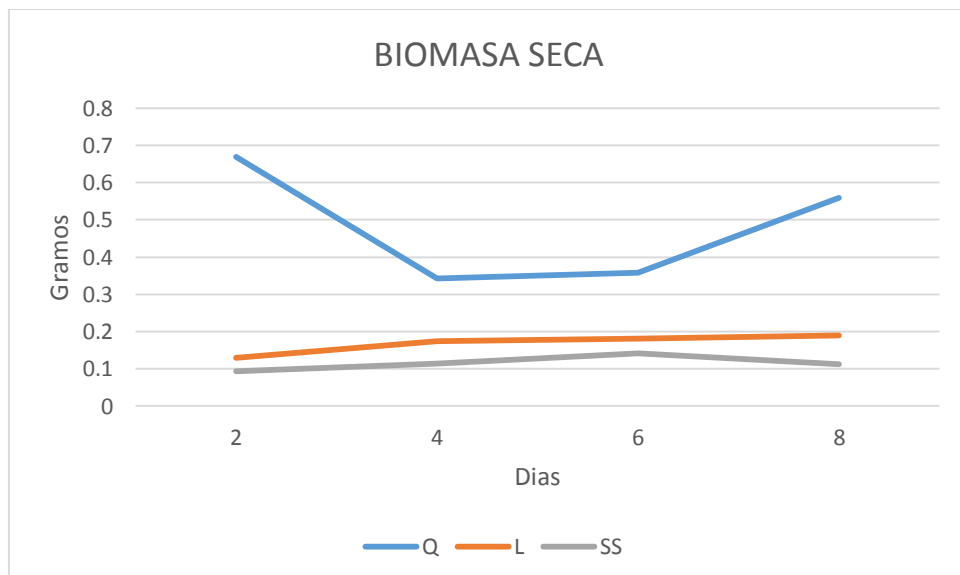
De las 7 especies de *B. bassiana* (37, 32.1, 33D, Xolol, 12-11A2, 129A, 12.11A1) el mayor número de esporas se presentó en el medio con quitina al igual que los géneros *M. anisopliae* (cepa 122A) y *Paecilomyces* spp. (cepa 128A) sin embargo estas tenían un solo día en el que incrementaron; siendo el sexto u octavo día de cinética que aumentaban, las esporas de la cepa 37 fue la única que aumento y disminuyó durante su crecimiento, algunos estudios demuestran que hay una correlación negativa entre producción de esporas y de biomasa (Gessner 1997) por lo que los días que se mantuvieron en bajas proporciones la biomasa debió ser mayor y cuando esta disminuyó el número de esporas se vio afectado.

### 7.3 Biomasa



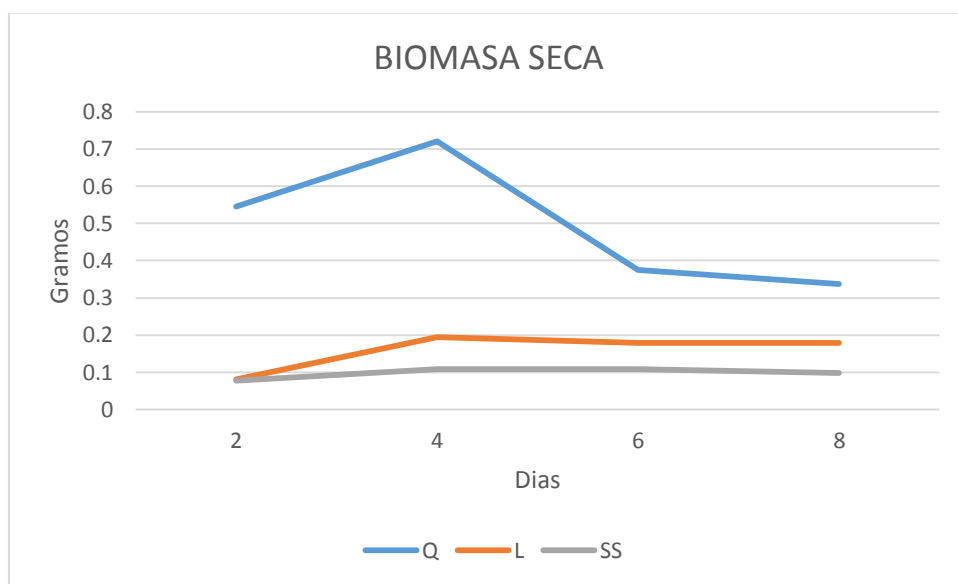
**Figura 20. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *B. bassiana* (cepa 37)**

En la figura 20 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 37 creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina mientras que la biomasa del medio con laminarina se comportó de manera similar con el medio sin sustrato, se aprecia que ambos mantuvieron un peso desde el cuarto día; la biomasa del medio con quitina fue disminuyendo durante su crecimiento siendo el más alto el del segundo día.



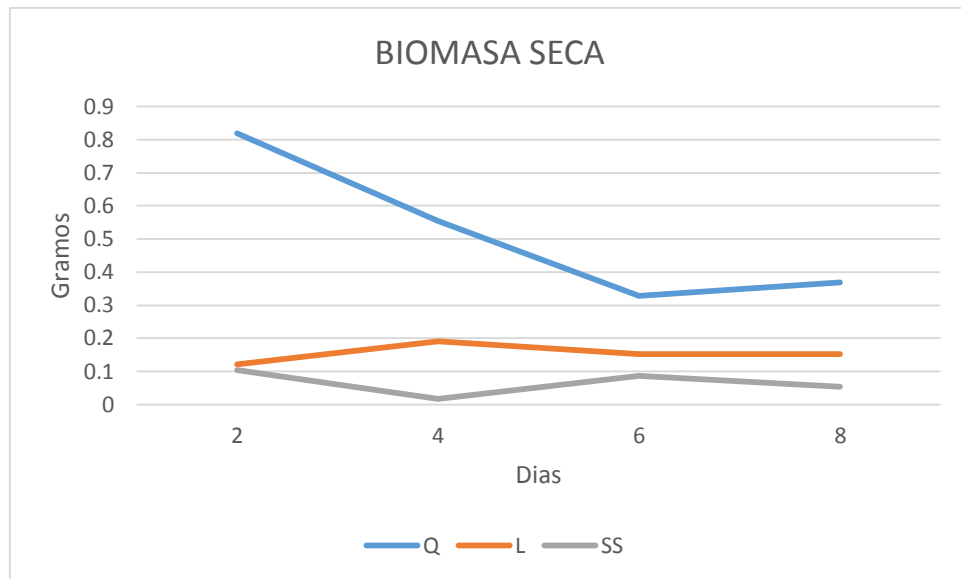
**Figura 21. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por B. bassiana (cepa 32.1).**

En la figura 20 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 32.1 (*B. bassiana*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, disminuyendo al cuarto día en donde su peso se mantuvo hasta el sexto día y nuevamente sube al octavo día, mientras que la biomasa del medio con laminarina se comportó de manera similar con el medio sin sustrato, se aprecia que ambos mantuvieron un peso desde el cuarto día.



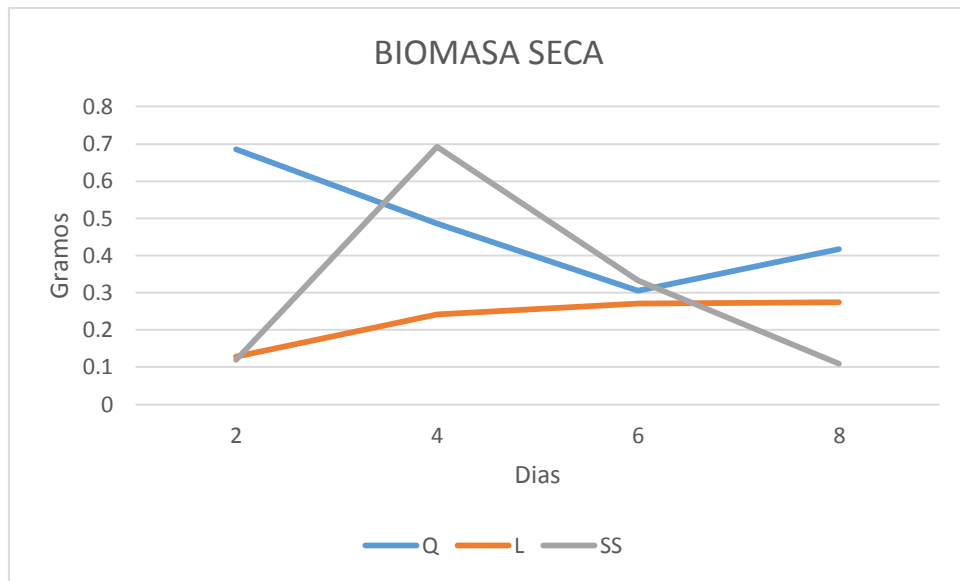
**Figura 22. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por B. bassiana (cepa 33D).**

En la figura 22 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 33D (*B. bassiana*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, aumentando al cuarto día y disminuyendo al sexto día hasta al octavo día, mientras que la biomasa del medio con laminarina se comportó de manera similar con el medio sin sustrato, se aprecia que ambos mantuvieron un peso desde el cuarto día; siendo el medio sin sustrato que presento menor biomasa.



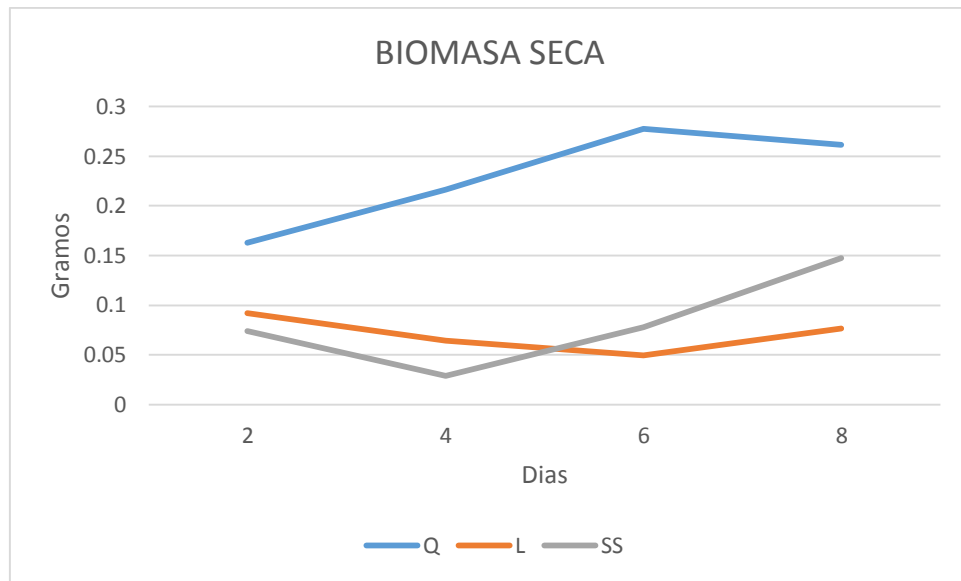
**Figura 23. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *B. bassiana* (cepa Xolol).**

En la figura 23 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa Xolol (*B. bassiana*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, siendo la más alta el del segundo día y disminuyendo del cuarto al sexto día, mientras que la biomasa del medio con laminarina fue más alta al cuarto día, disminuyó al sexto donde se mantuvo así hasta el octavo día; siendo el medio sin sustrato que presentó menor biomasa, se aprecia que este medio tuvo menor producción de biomasa durante el cuarto día y aumentó al sexto pero siendo el que menos biomasa produjo de los medios adicionados con quitina o laminarina.



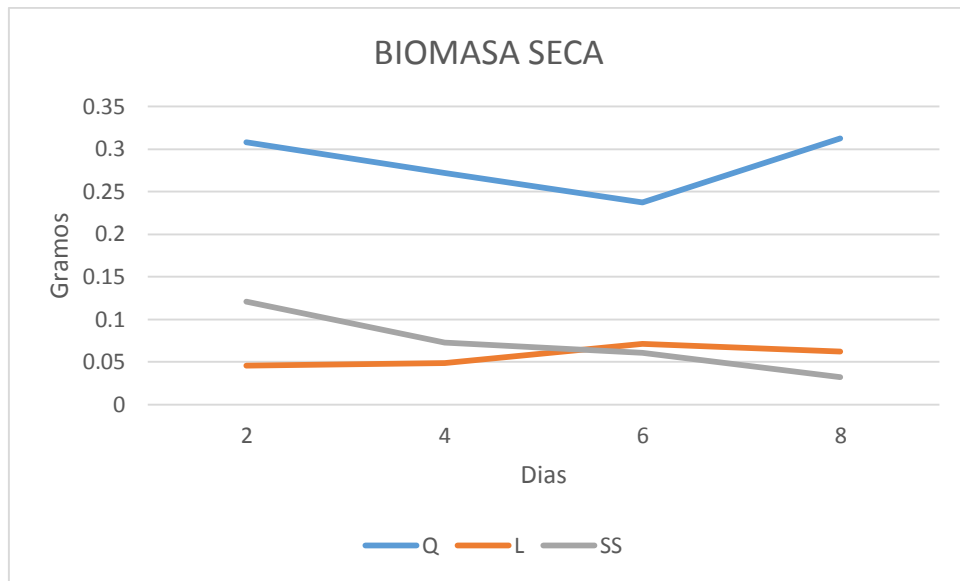
**Figura 24. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *M. anisopliae* (cepa 122A).**

En la figura 23 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 122A (*M. anisopliae*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor al segundo día en el medio adicionado con quitina, y mayor al cuarto día en el medio sin sustrato, la biomasa en el medio con quitina descendió al sexto día al igual que el medio sin sustrato y este siguió descendiendo hasta el octavo, mientras que la biomasa del medio adicionado con quitina nuevamente subió al octavo día, la biomasa del medio con laminarina fue menor que las anteriores mencionadas, su peso aumentó al cuarto día hasta el octavo.



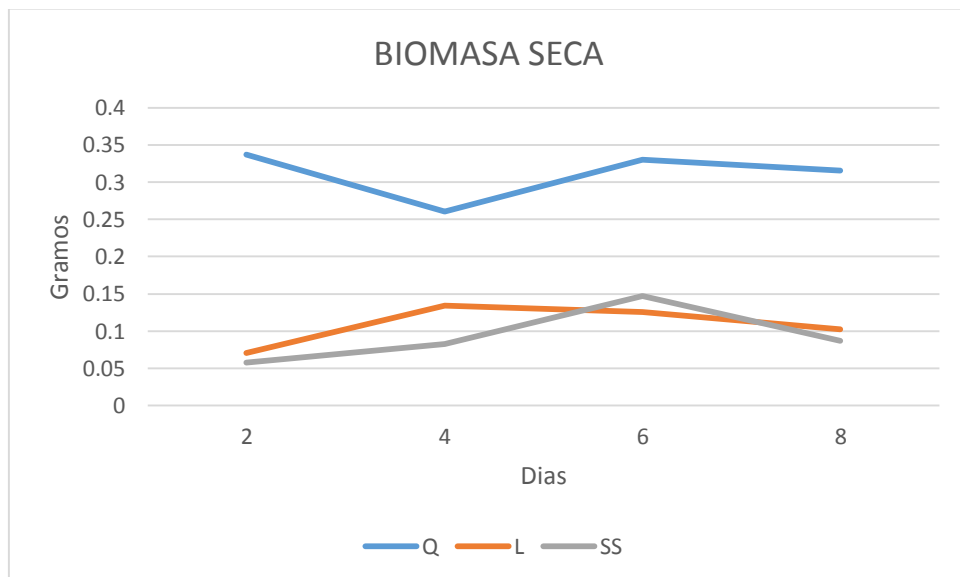
**Figura 25. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *B. bassiana* (cepa 12-11A2)**

En la figura 25 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 12-11A2 (*B. bassiana*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, siendo la más alta el del sexto día y disminuyendo al octavo día, mientras que la biomasa del medio con laminarina fue más alta al segundo día, disminuyendo al sexto día y aumentando nuevamente al octavo día, el medio sin sustrato tuvo una biomasa más alta que el medio de laminarina al octavo día, y siendo menor al cuarto día, el comportamiento fue similar ya que presentaron aumento de biomasa a partir del sexto día.



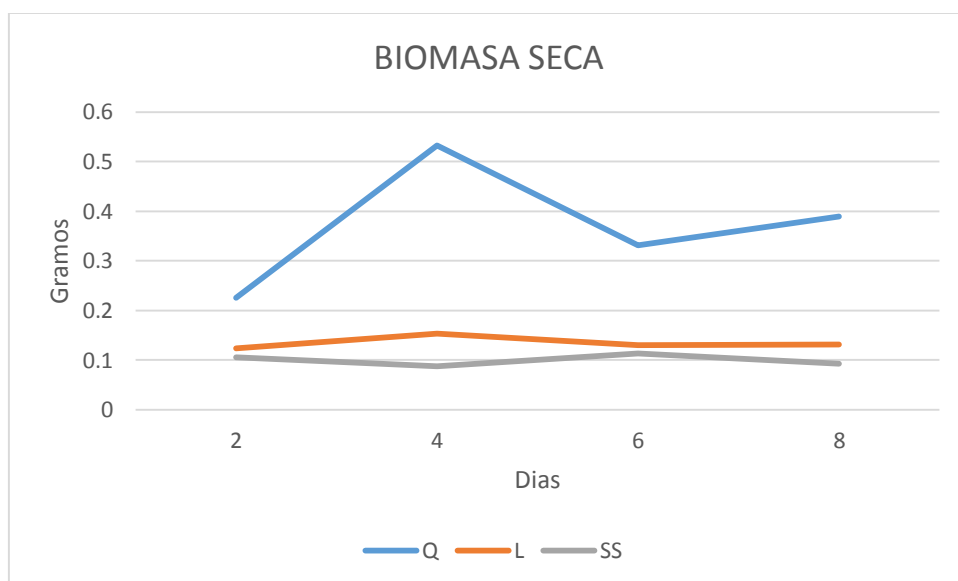
**Figura 26. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *B. bassiana* (cepa 129A).**

En la figura 26 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 129A (*B. bassiana*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, siendo la más alta el del octavo día y disminuyendo del cuarto al sexto día, mientras que la biomasa del medio con laminarina fue más alta al sexto día; el medio sin sustrato que presentó su mayor biomasa al cuarto día y descendiendo hasta el octavo, la biomasa del medio sin sustrato disminuyó con los días mientras que la biomasa del medio con laminarina aumentó.



### Figura 27. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *B. bassiana* (cepa 12.11A1)

En la figura 27 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 12.11A1 (*B. bassiana*) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, siendo la menor la del cuarto día y nuevamente aumento al sexto día, la biomasa del medio con laminarina fue más alta al cuarto día mientras que la biomasa del medio sin sustrato fue más alta al sexto día en ambos se aprecia el descenso al octavo día.



### Figura 28. Comparación de la Biomasa producida con diferentes sustratos por *Paecilomyces* spp. (cepa 128A).

En la figura 28 se observan las variaciones de los pesos de biomasa seca de la cepa 128A (*Paecilomyces* spp.) creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono, se observa que la biomasa fue mayor en el medio adicionado con quitina, siendo la más alta al cuarto día y disminuyendo al sexto día, mientras que la biomasa del medio con laminarina se comportó de manera similar al medio sin sustrato siendo este el que menor biomasa produjo de los tres.

De los sustratos adicionados al medio czapeck en donde se inocularon 7 especies de *B. bassiana* (cepas 37, 32.1, 33D, Xolol, 12-11A2, 129A, 12.11A1) tuvieron mayor producción de biomasa con el medio adicionado con quitina y ello se debe a la estructura del sustrato (quitina coloidal), cuyas unidades estructurales están compuestas de Nacetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc), las cuales por molécula tiene una relación carbono/nitrógeno de 8/1, y estas además de ser fuente de carbono para la energía necesaria de los procesos metabólicos del hongo es también fuente de



nitrógeno que parte fundamental para el desarrollo de hifas, sin embargo el sustrato de laminarina que es un polímero de la glucosa y manitol con uniones 1:6 glucosídicas, para su asimilación el hongo aunque creció la relación C/N en el medio no fue mayor para el desarrollo de su biomasa, si no que puede haber mayor producción de glucanasas para su asimilación; aunque se observó crecimiento similar al medio sin sustrato.

De los dos géneros diferentes estudiados como lo son *M. anisopliae* y *Pacilomyces* spp, la cepa 122A fue la única en tener la biomasa más baja en el medio adicionado con laminarina y su biomasa en medio con quitina fue similar al medio sin sustrato, puede deberse a mayor producción de enzimas o productos y estas pudieron afectar el crecimiento de las hifas, la cepa 128A fue similar a las especies de *B. bassiana*. La disminución de la biomasa se explica porque las enzimas que hidrolizan este sustrato (quitinasas) son inhibidas por altas concentraciones de GlcNAc, que se deben estar liberando al medio. Además, que otras investigaciones han demostrado que estas enzimas inhiben el alargamiento del tubo germinativo (Manjula et al. 2004) y produce lisis en los extremos de las hifas (Ordentlich et al. 1988).

## 7.4 ANTAGONISMO

### 7.4.1 Confrontación dual

**Cuadro 3. Actividad de control biológico empleando la técnica de confrontación en cajas Petri con PDA incubadas a 28°C**

Cepa	Área de crecimiento cm	% de inhibición
37	24.2328625	25
32.1	32.6916205	18.3544304
33D	28.321524	18.9189189
Xolol	37.784285	12.2362869
122A	26.1924355	24.3421053
12-11A2	8.4698845	56.0810811
129A	23.369577	26.5765766
12.11A1	32.296957	18.9873418
128A	32.0057045	19.1983122

**\*Datos obtenidos de tres réplicas**

Todas las interacciones detuvieron el crecimiento del hongo fitopatógeno al encontrarse en contacto con las hifas de las diferentes cepas antagonicas de *B. bassiana*; *Metarrizum* (Cepa 122A) y *Paecilomyces* (128A), De las 9 cepas, una *baeuveria* (12-11A2) se ubicó en la clase 3 de antagonismo, todas las demás cepas se encuentran en la clase 5.0 de antagonismo; algunas de ellas no se tocaron, pero el patógeno dejó de crecer.

#### 7.4.2 Antagonismo por compuestos volátiles.

**Cuadro 4. Actividad de control biológico empleando la técnica de confrontación por volatilidad en cajas Petri con PDA incubadas a 28°C**

Cepa	Área de crecimiento cm	% de inhibición
37	24.901107	25.5033557
32.1	27.3682448	21.1409396
33D	28.6877168	19.1275168
Xolol	21.5680658	30.5369128
122A	13.3841978	51.3422819
12-11A1	27.3682448	21.1409396
129A	18.7563338	35.2348993
12.11A1	33.7034775	12.0805369
128A	21.743799	29.5302013

**\*Datos obtenidos de dos réplicas**

Todas las interacciones detuvieron el crecimiento del hongo fitopatógeno al encontrarse en contacto con las hifas de las diferentes cepas antagonicas de *B. bassiana*; *M. anisopliae* y *Paecilomyces* spp; De las 9 cepas, una *B. bassiana* (Cepa 129A) se ubicó en la clase 4 de antagonismo, *Metarizum* (Cepa 122A) se ubicó en la clase 3 de antagonismo, todas las demás cepas se encuentran en la clase 5.0 de antagonismo.

## **8.CONCLUSIONES**

Se observó una mayor producción de Biomasa en todas las cepas de *B. bassiana* y *Paecilomyces* spp inoculadas en medio con quitina.

Se observó una relación negativa entre el número de esporas y Biomasa en los medios con quitina, laminarina y sin sustrato.

Se observó que el pH fue ácido durante el desarrollo de todas las cepas en el medio que contenía quitina.

El hongo entomopatígeno *B. bassiana* posee un lento crecimiento y su potencial para controlar a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue deficiente durante la confrontación dual; solo la cepa 12-11A2 se clasificó como antagonismo clase 3 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; para ello se sugiere lo mismo para las cepas 122A y 128A.

Por compuestos volátiles *M. anisopliae*(122A) y *B. bassiana* (129A) fueron las más destacadas siendo la cepa 122A que se clasificó como antagonista clase 3.

## **9. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES**

El laboratorio necesita ser equipado con una centrifuga en la que se pueda controlar la temperatura, debido a que se recupera filtrado enzimático y estas se desnaturalizan si se exponen mucho tiempo a una temperatura ambiente.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agrios, G. N. 2006. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. p. 123, 425-432, 510.

Angulo, M.J.H. 1996. Efecto de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en materiales silvestres de tomate. Tesis de Licenciatura en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 39 p.

Bajwa R, Khalid A, Shahid CT. 2003. Antifungal Activity of Allelopathic Plant Extracts III: Growth Response of Some Pathogenic Fungi to Aqueous Extract of *Parthenium hysterophorus*. *Plant Pathology Journal.*, 2; 145-156.

Baker, R.; Griffin, G., J. 1995. Novel approaches to Integrated pest management, pp. 153-182. In: *Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Plant Pathogens*. Reuveni, R. (ed.). CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA

Beckman, C.H. 1987. *The Nature of the Wilt Diseases of Plants*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 80 p.

Booth, C. 1984. *The Fusarium problem: historical, economic, and taxonomic aspects*. *The applied mycology of Fusarium*, pp. 1-13. Moss, M. O. and Smith, J. E. (eds.). Press Syndicate of the University of Cambridge.

Bravo Alejandra; Ibarra J.; María Cristina del Rincón Castro; Galindo E.; Patiño M.; Serrano L.; García R.; Pereyra Alférez B.; Andrea Alcázar Pizaña; Luna Olvera H.; Galán Wong L.; Liliana Pardo; Muñoz Garay C.; Isabel Gómez y Soberón M. (2006): *Los microorganismos en el control de insectos y patógenos*. Cuernavaca, México. *Revista, Latinoamericana de Microbiología*. 48(2). 113 -120 pp.

Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S., and Miyao, E.M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* 93:1014-1022.

Cárdenas, V.J.O. 2000. Eficacia en el control químico de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* en los cultivos de tomate, chile y sandía. Tesis de Maestría de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 156 p.

Cerkauskas R. *Fusarium Wilt*. 2005. (En línea) Disponible en <http://www.avrdc.org/pdf/tomato/fusarium.pdf>. (Consulta: 30 de agosto 2011).

Chavez, D 2004. Caracterización molecular de especies de *Trichoderma*. Trabajo de grado, Microbiología Agrícola y Veterinaria 57 pp.

Domsh, H;Gams, W. 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic press ltd. New York, U.S.A. 859P.

Eisendle M, Oberegger H, Buttinger R, Illmer P and Haas H. 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell* 3:561-563.

FAO. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Roma: Dirección de producción y sanidad animal de la FAO, 2003. p. 33-35

Fargues, J. 1976. Etude des conditions d'infection des larves de doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say, Par *Beauveria bassiana* (Bals) Vuele (Fungi imperfecti) *Entomophaga* 17:319-337 pp.

Farr,D.F.,G.F.Bills,G.P.Chamuris YA.Y. Rossman. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota.

Ferron,P . 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review Entomology* 23:409-442 pp.

Flórez, M.; López, J.; Valencia, A. 2005. Actividad de  $\alpha$ amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido. *Revista Colombiana de Entomología* 31 (2):123 – 126.

Girhepuje PV, Shinde GB. 2011. Transgenic tomato plants expressing a wheat endochitinase gene demonstrate enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *Lycopersici*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 105; 243-251

Goldman, G. H.; Hayes, C.; Harman, G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Biotech. Tibtech.* 12: 478-482.

González, I.; Infante, D.; Peteira, B.; Martínez, B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, I. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. expresión de actividad quitinasa. *Revista Protección Vegetal [online]* 25(1): 58-63

González, R., J. Montealegre, R Herrera, 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria* 31: 21-28.

Hoyos-Carvajal, L., G. Duque, S. Orduz, 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2: 76-86.

Jiménez, D.F., 2003. *Enfermedades del Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)* Ed. Limusa. México, D.F. 102 p.

Jones, IB., IP. Jones, RE. Stall y T.A. Zitter. 1997. *Compendium oftomato diseases.* The American Phytopathological Society Press. St. Paul.

Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. 1991. *Compendium of Tomato Diseases,* American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 46 p.



Leal, S. C. M., Bertiolo, D. J., Butt, T. M., Carder, T. H., Burrows, P. R. and Peberdy, J. F. 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium anisopliae* strains. *Mycol. Res.* 101:257-265.

López-Llorca, L. V.; Hans-Börje, J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad*, v. 3, n. 6, p. 12 – 15. Disponible en: <<http://www.ua.es/es/informacion/biodiversidad/cuadbiod06.pdf>>. Acceso en: junio 2011

Mendoza, Z.C. 1993. Diagnóstico de Enfermedades Fungosas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Edo. de México. 111 p

Michel Aceves A.; Otero Sánchez M.; Martínez Rojero R.; Ariza Flores R.; Barrios Ayala A. y Rebolledo Martínez A. (2008): Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. Guerrero, México. *Revista, Avances en Investigación Agropecuaria*, 12(3). 55-68 pp.

Michel Aceves A. C. (2001): Cepas nativas de *Trichoderma* spp Eufungi (Eufungi: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Eufungi: Hyphales). Tesis presentada en opción al Título Académico de Doctor en Ciencias: Área Biotecnología. Universidad de Colima, México. 152 pp.

Mondino, P., Silvana Vero (2006): Control biológico de patógenos en plantas. Editorial. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158 pp.

Nelson, P.E. 1981 Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En M.E. Mace, A.A. Bell and e.H. Beckman (eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York p. 51-80.

Nelson, P.E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. p. 27-35. In Re. Ploetz(ed.). *Fusarium wilt of banana*. American Phytopathological Society Press. St. Paul.

Noguera R. 1983. Influencia de *Meloidogyne incognita* en la colonización de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate. *Agron Trop*. 33(1-6):103-109.

Nzanza, B., D. Maraisa, P. Soundy, 2012. Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. *Scientia Horticulturae* 144: 55-59.

Olivain C, Alabouvette C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol*; 141(3): 497-510.

Ownley, B.H.; Gwinn, K.D.; Vega, F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113128.

Pardo, V.M. 1995. Hongos fitopatógenos de Colombia. Centro de Publicaciones. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Paredes Escalante J.; Carrillo Fasio J.; García Estrada R.; Allende Molar R.; Josefa Adriana Sañudo Barajas y Valdez Torres J. (2009): Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista, Mexicana de Fitopatología*, 27(1). 27-35 pp.

Pérez Consuegra Nilda (2004): Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127 – 284 pp.

Peteira, B.; Gonzáles, I.; Arias, Y.; Fernández, A.; Miranda, I.; Martínez, B. 2011. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (BALSAMO) Vuillemin. *Revista de Protección Vegetal* 26(1): 16 – 22.

Ramaiah AK, Garampalli RK. 2015. In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*,1; 22-27.

Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.

Rehner, S.; Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97 (1): 84 – 98

Pezet, R.; PonT, V.; Tabacchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentylalpha-pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytoch. Anal.* 10: 285-288.

Pucheta Diaz, M.; Flores Macias, A.; Rodriguez Navarro, S.; De la Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI*, v. 31, n. 12, p. 856-860.

SAGARPA. 2005., *Análisis Agropecuario del Tomate*. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.

Sansom, R. A. 1975. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*. Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn. 6 :1-119 pp.

Sánchez, C.M.A. 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. pp. 17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p

Smith, E.F. 1899. *Wilt Diseases of Cotton, Watermelon and Cowpea*. U.S. Department Agricultural Burman Plant Industrial Bulletin 17.

Snyder, W.e. y H.N. Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal of Botany 27: 64-67.

Suárez, C.L., R.J. Fernandez, N.O. Valero, R.M. Gamez, A.R. Paéz, 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología 10: 35-43.

Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society 66:407-411 pp.

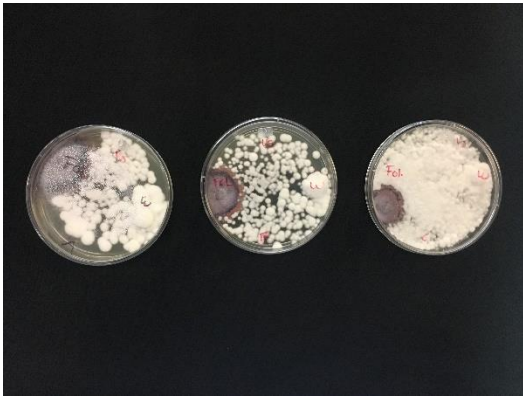
Valdez, L.J.D. 1999. Determinación de la raza tres de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causante de la marchitez en tomate, en el Valle de Culiacán, Sinaloa. Tesis de Licenciatura, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México. 39 p.

Vos, C.M., Y. Yang, B. De Coninck, B.P.A. Cammue, 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. Biological Control 74: 65-81.

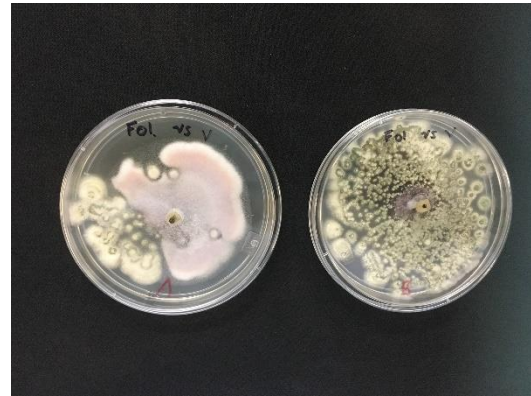
Zeller KA, Summerell BA, Leslie JF. *GibberellaKonza* (*Fusarium konza*) sp. Nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberellafujikuoroi* species complex. Mycologia., 2003, 95; 943-954.

## 11. ANEXOS

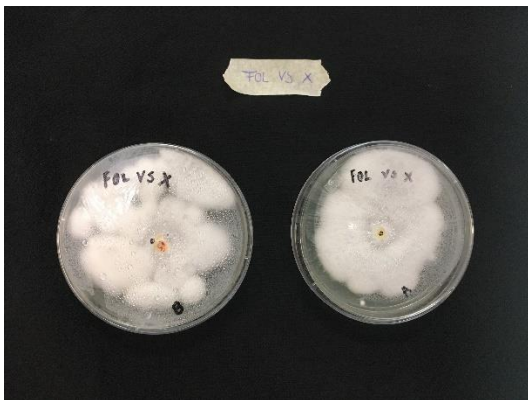
Fotos de antagonismo



Antagonismo de la cepa 12-11A2 (*B. bassiana*) método de confrontación dual.



Antagonismo de la cepa 122A (*M. anisopliae*) compuestos volátiles.



Antagonismo de la cepa 129A (*B. bassiana*) compuestos volátiles.