

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**Determinación *in vitro* de las Propiedades Fungicidas de los Ácidos Fúlvicos en
Fusarium moniliforme (Sheldon) y *Trichoderma harzianum* (Rifai)**

Por:

JESÚS JORGE VÁZQUEZ VÁZQUEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre de 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

**Determinación *in vitro* de las Propiedades Fungicidas de los Ácidos Fúlvicos
en *Fusarium moniliforme* (Sheld) y *Trichoderma harzianum* (Rifai)**

Por:

JESÚS JORGE VÁZQUEZ VÁZQUEZ

**Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de Ingeniero en Agrobiología**

Aprobada por:



DRA. LEILA MINEA VÁSQUEZ SILLER

Asesor Principal



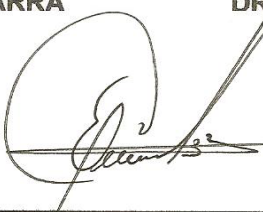
DR. MANUEL DE LA ROSA IBARRA

Sinodal



DR. RUBÉN LÓPEZ CERVANTES

Sinodal



DR. MARIO ERNESTO VÁSQUEZ BADILO

Coordinador de la División de Agronomía

**Coordinación
División de Agronomía**



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida, salud, bienestar, conocimiento de las cosas buenas y por permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios.

A mi “**ALMA TERRA MATER**” **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por la oportunidad de superación que me brindó y por todos los gratos momentos que en ella viví durante mi formación profesional.

A la **Dra. Leila Minea Vásquez Siller** por la confianza brindada, apoyo y valiosa asesoría en la conducción del presente trabajo.

Al **Dr. Manuel de la Rosa Ibarra** por su generosa colaboración, disposición y apoyo incondicional para la realización del presente trabajo.

Al **Dr. Rubén López Cervantes** por su aportación en los comentarios y sugerencias en el proceso de revisión de este trabajo.

Al **M.C. Miguel Agustín Carranza Pérez** por su contribución y orientación durante el proceso de mi formación profesional.

Al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi)** en particular al cuerpo de investigadores que conforman el área de fitopatología, el **Dr. Roberto Montes Belmont**, la **M.C. Hilda Elizabeth Flores Moctezuma**, la **M.C. Leticia Bravo Luna** y a la **Ing. Arely Ruíz Rosales**, por las facilidades y recursos otorgados, además del apoyo brindado en la parte estadística, por su cariño y amistad.

A las **Técnicas Académicas Sandra Luz García Valdéz** y **Martina de la Cruz Casillas**, por su apoyo y facilidades prestadas en el laboratorio, sus sugerencias y amistad sincera.

DEDICATORIAS

Con gran cariño dedico el presente trabajo a mis padres:

Sra. *Amada Vázquez Gutiérrez*

Sr. *Pedro Elías Vázquez Ruíz*

Por el gran esfuerzo, sacrificio y fé depositada en mí, como fuente de inspiración y ejemplo de lucha a seguir a delante, hoy en día he llegado a realizar uno de mis anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, que en mi se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el beneficio más grande que pudiera recibir y por lo cual les estaré eternamente agradecido.

A mis hermanos, **Andersi, Pepe y Amada** por el gran cariño y respeto que me han brindado, por los gratos momentos cuando juntos solíamos estar, aún en tiempos difíciles.

A la familia **Vázquez Ruíz y Vázquez Gutiérrez** por el gran apoyo incondicional en todo momento y por depositar en mí la confianza de llegar hacer un hombre de bien.

A mis queridos amigos, **Antonio, Rubí, Crescenciano, Francisco, Merino, Abelardo, Roberto y Naín** por su gran apoyo moral y por estar conmigo en todo momento.

A mis amigos de la carrera de Ing. en Agrobiología, **Eleuterio, Carlitos, Marcelo, Eliseo, Edgar, Laura, Abigail**, a todos ellos por su amistad incondicional y por su gran apoyo, por los momentos inolvidables cuando se convivía.

A **Ceci** por darme la oportunidad de formar parte de tu vida, por el gran cariño y comprensión y por estar siempre en todo momento.

RESÚMEN

El proyecto de investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” en el Laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación en Desarrollo y Tecnología de Semillas, perteneciente al Departamento de Fitomejoramiento, en coordinación con el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, en el Laboratorio de Fitopatología, ubicado en Yautepec, Morelos.

En el bioensayo se determinó el efecto diferencial de los ácidos fúlvicos como agente de protección vegetal contra microorganismos fitopatógenos y por otra parte como inductor de la supresibilidad de los suelos respetando las poblaciones de microorganismos benéficos. La cepa del hongo fitopatógenos *Fusarium moniliforme* fue aislada de semillas de maíz, se identificó mediante sus características morfológicas. En la prueba con *F. moniliforme*, se utilizó dosis de 0, 1000, 2000 y 3000 ppm de AF concentrados al 14%, aplicadas en diferentes diluciones de inóculo 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} ufc/mL, expuestos a diferentes tiempos de 30, 60 y 90 minutos. Los resultados del análisis de varianza presentaron diferencia altamente significativa en los tratamientos de los factores evaluados. Esto indicó que los ácidos fúlvicos ejercen efecto fungicida al emplear 3000 ppm de ácidos fúlvicos en concentración de inóculo de 12,153 ufc/mL a los 30 minutos de exposición, se observó una reducción de 91% en la viabilidad de las ufc/mL. El crecimiento micelial del fitopatógeno se ve afectado al emplear 0, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 ppm de ácidos fúlvicos, se observó inhibición hasta en un 85% en 4000 ppm de ácidos fúlvicos con 10.33 cm^2 de proliferación a las 240 horas de evaluación.

El bioensayo con *Trichoderma harzianum* Tc74, consistió en sembrar discos del hongo en medio de cultivo PDA adicionado con dosis de 0, 500, 750, 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm de ácidos fúlvicos, se determinó que los ácidos fúlvicos afectan el crecimiento micelial de *T. harzianum* al inhibir de 61% a 99% su desarrollo cuando se aplicó 4000 ppm, presentó 0.518 cm² de crecimiento en un tiempo de 96 horas. El análisis de varianza en esta prueba presento diferencias altamente significativas entre los tratamientos observados, sin embargo, *T. harzianum* mantuvo su actividad parasítica en aquellas dosis donde hubo crecimiento micelial, ya que al confrontarse con las dos cepas del hongo fitopatógeno *S. rolfsii* C1 y C12, *T. harzianum* creció completamente sobre el fitopatógeno. En el caso de antibiosis *T. harzianum* inhibió el crecimiento micelial de *S.rolfsii* C1 y C12 de un 40 a 88%; en la dosis 2000 ppm de ácidos fúlvicos, el crecimiento micelial de *T. harzianum* fue mínimo. Los resultados indicaron que los ácidos fúlvicos a diferentes dosis de 2000, 3000 y 4000 ppm afectan el desarrollo de hongos incluso al hongo benéfico *T. harzianum*, sin embargo, en este último no afectaron sus características de parasitismo y antibiosis debido a que se originó la producción de antibióticos y enzimas degradadores de la pared celular. Los resultados establecen que los ácidos fúlvicos inhiben la viabilidad de las esporas y el crecimiento micelial debido a la acción del efecto fungicida en hongos fitopatógenos del suelo como *Fusarium moniliforme* y benéficos como *Trichoderma harzianum* pero en este último no daña su potencial para ejercer control biológico.

Palabras clave: ácidos fúlvicos, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma harzianum*, fungicidas orgánicos

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
RESÚMEN.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
1.1 La Agricultura Ecológica u Orgánica.....	5
1.1.1 Alternativas Factibles en la Producción de Alimentos sin Agroquímicos.....	7
1.1.2 Producción Orgánica en México.....	9
2.1 Impacto de los Pesticidas Sintéticos en los Agroecosistemas.....	9
2.1.1 Fungicidas para Tratamiento de Protección Vegetal a Semillas.....	11
3.1 Las Sustancias Húmicas.....	15
3.1.1 Ácidos Fúlvicos.....	16
3.1.1.1 Composición Físico-Química de los Ácidos Fúlvicos.....	17
3.1.1.2 Importancia de los Ácidos Fúlvicos en la Agricultura.....	17
4.1 Hongos Fitopatógenos Asociados a Semillas.....	18
4.1.1 Etiología de <i>Fusarium moniliforme</i>.....	20

4.1.1.1 Clasificación Taxonómica de <i>Fusarium moniliforme</i>	24
4.1.2 Hongos Antagonistas de Suelos Supresivos.....	24
4.1.2.1 Etiología de <i>Trichoderma harzianum</i>	25
4.1.2.2 Clasificación Taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i>	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	66
LITERATURA CITADA.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Página
1. Clasificación de antagonismo de <i>Trichoderma</i> según Bell <i>et al.</i> (1982) con algunas modificaciones.....	39
2. Análisis de varianza para la variable ufc/mL viables de <i>Fusarium moniliforme</i> tratadas con ácidos fúlvicos.....	42
3. Comparación de medias de los tratamientos evaluados para determinar el efecto fungicida de los ácidos fúlvicos en inóculo de <i>Fusarium moniliforme</i>	45
4. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo de <i>Fusarium moniliforme</i> a diferentes diluciones de ufc/mL tratadas con ácidos fúlvicos a los 30 minutos de exposición.....	46
5. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo de <i>Fusarium moniliforme</i> a diferentes diluciones de ufc/mL tratadas con ácidos fúlvicos a los 60 minutos de exposición.....	48
6. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo de <i>Fusarium moniliforme</i> a diferentes diluciones de ufc/mL tratadas con ácidos fúlvicos a los 90 minutos de exposición.....	49

7.	Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de <i>Fusarium moniliforme</i>	52
8.	Comparación de medias en el crecimiento micelial de <i>Fusarium moniliforme</i> tratado con ácidos fúlvicos.....	53
9.	Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i>	56
10.	Comparación de medias en el crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> tratado con ácidos fúlvicos.....	56
11.	Análisis de varianza para la variable antibiosis de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> cepa C1.....	60
12.	Análisis de varianza para la variable antibiosis de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> cepa C12.....	61
13.	Comparación de medias en la antibiosis de <i>Trichoderma harzianum</i> en el crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> cepa C1 y C12.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Página
1. Morfología de <i>Fusarium moniliforme</i> . A, morfología colonial. B, conidióforos y microconidios (izquierda); microconidios formando cadenas (derecha).....	41
2. Valores medios de los tratamientos con ácidos fúlvicos en inóculo de <i>Fusarium moniliforme</i>	43
3. Valores medios de las diluciones con inóculo de <i>Fusarium moniliforme</i> tratadas con ácidos fúlvicos.....	44
4. Número de unidades formadoras de colonias viables (ufc/mL) en diferentes concentraciones de inóculo con ácidos fúlvicos a los 30 minutos de exposición.....	47
5. Número de unidades formadoras de colonias viables (ufc/mL) en diferentes concentraciones de inóculo con ácidos fúlvicos a los 60 minutos de exposición.....	48
6. Número de unidades formadoras de colonias viables (ufc/mL) en diferentes concentraciones de inóculo con ácidos fúlvicos a los 90 minutos de exposición.....	50
7. Dinámica de crecimiento micelial de <i>Fusarium moniliforme</i> tratado con ácidos fúlvicos.....	52

8.	Dinámica de crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> tratado con ácidos fúlvicos.....	55
9.	Confrontación de <i>Trichoderma harzianum</i> (<i>T.h.</i>) y <i>Sclerotium rolfsii</i> (<i>S.r.</i>) cepa C1 y C12. A , Inhibición del crecimiento vegetativo de <i>S. rolfsii</i> C1 por la actividad parasítica de <i>T.harzianum</i> . B , Inhibición del crecimiento vegetativo de <i>S. rolfsii</i> C12 por la actividad parasítica de <i>T.harzianum</i> , invadió totalmente la superficie de la colonia C1 y C12 en el medio PDA.....	57
10.	Capacidad de la actividad antagónica de <i>Trichoderma harzianum</i> en el crecimiento micelial sobre dos cepas de <i>Sclerotium rolfsii</i> C1 y C12.....	59

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola y de la calidad de las cosechas lo constituyen las plagas y enfermedades, las cuales atacan a los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento hasta la recolección y aún en los almacenes. En el caso de ataques por enfermedades el daño es causado principalmente por microorganismos fitopatógenos tales como los hongos, bacterias, virus y nemátodos.

La utilización de agroquímicos sintéticos como bactericidas y fungicidas, ayudan a controlar enfermedades en la planta, manteniéndose como principales agentes de protección contra los fitopatógenos de los cultivos agrícolas. No obstante, la utilización en exceso de agroquímicos sintéticos ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes, por lo que se requiere aplicar cada vez dosis más alta, esta acción a originando severa contaminación al medio ambiente.

Una nueva forma de hacer agricultura, vinculada con la producción es mediante la agricultura orgánica ó ecológica. Esta agricultura ha adquirido gran importancia en las últimas décadas, ya que dicha importancia se basa en la producción de alimentos libres de residuos tóxicos que ponen en riesgo a la salud humana, así como a la mayor concientización que ahora se tiene de la necesidad de proteger al medio ambiente. Por ello, la producción orgánica se caracteriza por la no utilización de productos de síntesis química en los sistemas de producción agrícola, sino sólo insumos naturales y prácticas agroecológicas.

En la actualidad se ha demostrado que el empleo de las sustancias húmicas de origen orgánico como los ácidos fúlvicos estimulan el crecimiento vegetal de los cultivos y por otra parte su constitución molecular que incluye ácido carboxílico y compuestos fenólicos, presupone que pueda tener un efecto fungicida contra hongos fitopatógenos como *Fusarium moniliforme*.

Por otra parte, poco que se sabe sobre el efecto fungicida que los ácidos fúlvicos puedan tener sobre la micoflora benéfica del suelo como *Trichoderma harzianum*; estos cuestionamientos se intentan responder con los objetivos que a continuación se establecen.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto diferencial de los ácidos fúlvicos como agentes de protección vegetal contra microorganismos fitopatógenos, y como inductor de la supresibilidad de los suelos respetando las poblaciones de microorganismos benéficos como *Trichoderma harzianum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensayos *in vitro* para determinar el efecto fungicida e inhibitorio de los ácidos fúlvicos en esporas y crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme*.
- Evaluar el efecto fungicida de los ácidos fúlvicos en el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* Tc74.

HIPÓTESIS

Ha: Los ácidos fúlvicos tienen efecto fungicida sobre hongos fitopatógenos y estimulan el desarrollo de microorganismos benéficos.

Ho: Los ácidos fúlvicos no tienen efecto fungicida sobre hongos fitopatógenos y no estimulan el desarrollo de microorganismos benéficos.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 La Agricultura Ecológica u Orgánica

A partir de la Segunda Guerra Mundial, el modelo modernizador del sector agropecuario en muchos países impulsó la producción de alimentos. Sin embargo el costo social y ecológico fue muy alto. Por un lado, muchos campesinos tenían que abandonar el campo (Cerisola, 1989). Por otro, los procedimientos modernos de producción agrícola, principalmente el clareo de la naturaleza, el monocultivo, la tecnificación, los fertilizantes y pesticidas sintéticos provocaron la pérdida de la fertilidad y la erosión de los suelos. Además de la aparición de nuevas plagas y enfermedades a consecuencia de un uso indiscriminado de dichos procedimientos (Queitsch y Dromundo, 1999).

En la actualidad la agricultura busca la transformación de un nuevo modelo de producción que asegure a largo plazo la producción de alimentos, para ofrecer productos sanos a los consumidores y proteger el medio ambiente. En este contexto, la agricultura ecológica en México cobra cada vez más importancia, como alternativa para una producción con menos contaminantes (Lampkin, 2001; Queitsch y Dromundo, 1998).

El origen de la agricultura orgánica surge desde una concepción integral, donde se involucran elementos técnicos, sociales, económicos y agroecológicos. No se trata de la mera sustitución del modelo productivo o de insumos de síntesis artificial por insumos naturales. La

agricultura orgánica es una opción integral de desarrollo capaz de consolidar la producción de alimentos saludables en mercados altamente competitivos (Amador *et al.* 1999).

Es importante señalar que la agricultura orgánica u ecológica rescata las prácticas tradicionales de producción, pero no descarta los avances tecnológicos no contaminantes, sino más bien los incorpora. Dicha agricultura es la conjunción de prácticas ancestrales, como el uso de terrazas por los incas, con la agricultura tradicionalmente biodiversa de nuestros campesinos, sujeta a nueva tecnología apropiada (Queitsch y Dromundo, 1998; Gliessman, 2002).

La “agroecología”, “agricultura ecológica”, “agricultura orgánica” o “agricultura sostenible” debe tomar en cuenta lo siguiente, como el logro de buenos rendimientos con un mínimo impacto en la fertilidad del suelo, la viabilidad económica, la aceptación social y la obtención de satisfactores sin la contaminación del ambiente ni la destrucción de los ecosistemas, entre otros. Cuya finalidad sea la obtención de productos con valor agrícola, respetando la armonía energética de la naturaleza (Gliessman, 2002; Altieri, 1999; Lampkin, 2001).

La agricultura orgánica se define como un sistema de producción que promueve y mejora la salud del agroecosistema, incluyendo la biodiversidad, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo. Esto se logra utilizando en lo posible métodos culturales, biológicos y mecánicos en oposición a materiales sintéticos para satisfacer cualquier función específica dentro del sistema (FAO, 1999).

1.1.1 Alternativas Factibles en la Producción de Alimentos sin Agroquímicos

La aplicación de principios ecológicos en la producción, se basa en el conocimiento local de los agricultores a través actividades como la diversificación de los cultivos con el fin de fomentar el reciclaje de los nutrimentos, el mantenimiento de la fertilidad del suelo, la protección de la biodiversidad, la conservación y uso eficiente del agua y la capacidad de autorregulación de las poblaciones de patógenos e insectos-plaga de un agroecosistema (Albert *et al.* 1991). Entre las técnicas diseñadas en función del ambiente físico, cultural y socioeconómico destacan la rotación de cultivos, los cultivos asociados, las cubiertas vegetales y los distintos métodos para incorporar nutrimentos al suelo, o bien para evitar la aparición de plagas y enfermedades (N. A. S., 1987).

La rotación de cultivos. Es un método de sucesión de cultivos que tiene como objetivo el desarrollo de sistemas diversificados de producción que incrementen los rendimientos, reduzcan los niveles de erosión, mejoren el contenido de materia orgánica y renueven la fertilidad del suelo para consolidar el establecimiento ininterrumpido de cultivos alternantes en una localidad. De este modo, la posibilidad de aparición de plagas, enfermedades y arvenses (especies vegetales que conviven con los cultivos) disminuye de modo notable (Toledo *et al.* 1993; Wilson y Richer, 1969).

Los cultivos asociados. Es una técnica en la que dos o más especies vegetales se siembran simultáneamente con el objeto de conseguir ventajas de complementación, porque prestan apoyo o sostén a otras plantas (como sucede en la siembra simultánea de maíz y frijol de guía), o bien porque estimulan el crecimiento cuando se asocian gramíneas con

leguminosas fijadoras de nitrógeno en el suelo. Con este arreglo de cultivos muchas veces se consigue el control natural de las poblaciones de patógenos e insectos-plaga y la supresión de arvenses, así como el uso más eficiente de los nutrientes del suelo (Zulueta *et al.* 1995).

Las cubiertas vegetales. Durante los periodos de descanso de un terreno en cultivo, la conservación de cubiertas verdes es una práctica común que no sólo favorece la diversidad biológica dentro del sistema de producción, sino que incrementa los volúmenes de materia orgánica, propicia la actividad microbiológica y la disponibilidad de los nutrientes, y mejora el drenaje y la aireación del suelo (Mainardi, 1998).

La fertilización. Se realiza mediante la implementación de técnicas ecológicas que activan los procesos de mineralización y humidificación de los desechos orgánicos, mejoran la estructura del suelo y promueven el rendimiento sostenible de las cosechas, entre las que sobresalen el aporte de estiércol, compuestos biológicos o abonos verdes, humus de lombriz o preparados vegetales (Albert *et al.* 1991).

El control de poblaciones de patógenos y de insectos-plaga. Una de las ventajas que se desprenden del manejo ecológico de los cultivos es que la siembra de dos o más especies en una parcela y la conservación de fauna e insectos nativos no sólo mantienen el equilibrio natural entre las poblaciones de patógenos e insectos que impiden la aparición de plagas y enfermedades, sino que también aseguran el buen desarrollo de las plantas y la formación de biomasa con valor agrícola (Zulueta *et al.* 1995; Agrios, 1996).

1.1.2 Producción Orgánica en México

En México la producción orgánica ha aumentado significativamente, al igual que la superficie cultivada. En el período de 1996 al 2000 el número de productores aumentó de poco más de 13 mil a más de 27 mil, con una tasa de crecimiento anual de 21 por ciento; la superficie creció de 23 mil hectáreas a más de 85 mil. Actualmente existen 262 zonas de producción orgánica, ubicadas principalmente en zonas campesinas e indígenas de Chiapas, Oaxaca, Michoacán y Guerrero, Jalisco, Sonora y Sinaloa (Gómez *et al.*, 1999).

El cultivo de productos orgánicos ha significado para muchas comunidades y organizaciones campesinas una alternativa ante la caída de los precios internacionales de sus productos convencionales. Se calcula que 85 por ciento de los productos orgánicos mexicanos se destinan a la exportación, principalmente a Estados Unidos, Europa y Japón (Martínez, 1997).

2.1 Impacto de los Pesticidas Sintéticos en los Agroecosistemas

Desde el final de la Segunda Guerra Mundial ha habido una tremenda expansión en el uso de herbicidas químicos. Los primeros herbicidas como el arsenito de sodio soluble, los dinitrofenoles DNOC y el dinoseb fueron muy peligrosos para la vida silvestre, incluyendo al hombre. Estos herbicidas tienen un alto grado de toxicidad para los mamíferos, y los residuos tóxicos permanecen en el suelo por mucho tiempo (Cremlyn, 1990).

A partir de los años cuarenta el uso de los plaguicidas ha aumentado de una manera continua, llegando a 5 toneladas en 1995 a escala mundial. Se ha establecido que sólo el 0.1 por ciento de la cantidad de plaguicidas aplicado llega a la plaga, mientras que el restante circula por el medio ambiente, contaminando el suelo, agua y la biota (Carvalho *et al.* 1998).

La aplicación masiva de plaguicidas fue considerada, como una revolución de la agricultura. Su aplicación llegó a ser una práctica común como medida preventiva aun sin ningún ataque visible. Desde entonces, la experiencia ha demostrado que este método no sólo perjudica el medio ambiente, sino que a la larga es también ineficaz (Agrios, 1996). Donde se han utilizado los plaguicidas de manera indiscriminada, las especies de las plagas se han vuelto resistentes y difíciles o imposibles de controlar. En algunos casos se ha creado resistencia en los vectores principales de las enfermedades, o han surgido nuevas plagas agrícolas (Miller, 2004).

El uso de pesticidas crea una serie de problemas para el medio ambiente. Más del 98 por ciento de los insecticidas fumigados y del 95 por ciento de los herbicidas llegan a un destino diferente del buscado, incluyendo especies vegetales y animales, aire, agua, sedimentos de ríos, mares y alimentos (Cornell, 2007).

La aplicación constante de fungicidas de cobre y azufre conducen a la formación de residuos estables, que permanecen en el suelo por largos periodos y que este afecta su fauna como son los hongos encargados de la descomposición de la materia orgánica, de manera que presenta un peligro a largo plazo para la fertilidad del suelo, además ser también drenados a las sequías y los ríos, como consecuencia la muerte de algas y peces (Cremlyn, 1990).

Estudios realizados entre los años 1973 a 1994 en Waimea, Nueva Zelanda, arrojó que luego de un proceso de colmatación en un estuario de la región de Mapua, los niveles de contaminación encontrados, estaban ligados a liberaciones constantes de pesticidas organoclorados (Hendi y Peake, 1996). Otras investigaciones en el área constatan la gravedad del problema, por ejemplo, un estudio realizado en la India por Dua *et al.* (1996), reportó niveles de DDT de 2.26 ppm en suelo y 0.18 ppm en el agua, en una zona aledaña a un centro poblado donde se encontró malaria.

Por otra parte muchos plaguicidas se eliminan en los suelos mediante un proceso de mineralización y el resultado es la conversión del plaguicida en compuestos más simples, como H₂O, CO₂ y NH₃. Algunos productos químicos, por ejemplo, el (2,4-D) se descomponen muy rápidamente en el suelo, mientras que otros resisten durante más tiempo (2,4,5-T). Otros productos químicos son muy persistentes y tardan mucho tiempo en descomponerse "(atrazina)" (Stephenson y Solomon, 1993).

2.1.1 Fungicidas para Tratamiento de Protección Vegetal a Semillas

Los compuestos químicos que se utilizan para tratar las semillas, comprenden algunos compuestos inorgánicos hechos a base de cobre y cinc; pero en su mayor parte son compuestos orgánicos de azufre protectores como el captan, cloroneb, cloranil, diclone, hexaclorobenceno, maneb, zineb, mancozeb, thiram, pentacloronitrobenzoceno (PCNB) y los compuestos sistémicos carboxina, benomhyl, thiabendazole, metalaxyl, triadimenol y

estreptomycin (Agrios, 1996; Cremllyn, 1990). A continuación se enuncia el uso de los principales fungicidas para tratamiento de semillas, como fue descrito por Agrios (1996), Carvalho *et al.* (1998), Cremllyn (1990) y Cremllyn, (1982).

El *captán* es un fungicida foliar persistente muy eficaz, especialmente para el control de la sarna de los manzanos y los perales, mancha negra de rosas, y para el recubrimiento de semillas contra enfermedades que se origina en el suelo y en las semillas (Agrios, 1996; Cremllyn, 1990).

El *thiram* consiste en dos moléculas unidas de ácido ditiocarbámico. Se utiliza principalmente en el tratamiento de bulbos y semillas de hortalizas, flores y pastos, pero también para el control de algunas enfermedades del follaje, como royas del césped, frutos y hortalizas (Agrios, 1996; Cremllyn, 1990).

El *zineb* es un fungicida excelente, seguro y de gran versatilidad que se aplica en el follaje y en el suelo para controlar las manchas foliares y pudriciones del fruto. Se utiliza para el control de una gran variedad de hongos fitopatógenos, tales como mildius vellosos y los tizones de la papa y tomate (Cremllyn, 1990).

El *maneb* contiene manganeso, es un excelente fungicida y de amplio espectro que se utiliza en el control de enfermedades del fruto y follaje de muchas hortalizas, en particular del tomate, la papa y de los viñedos. La adición de zinc a este compuesto disminuye la fitotoxicidad y mejora sus propiedades fungicidas (Cremllyn, 1990; Cremllyn, 1982).

El *cloranil* se utiliza para tratamiento de semillas y bulbos de algunas flores, hortalizas. Se utiliza también como aspersiones en el suelo y como espolvoreaciones de algunas enfermedades del follaje, como es el caso del ahogamiento y los mildius de los melones (Cremllyn, 1990; Cremllyn, 1982).

El *diclone* se utiliza para el tratamiento de semillas de algunos pastos y hortalizas, además se utiliza también como aspersión protectora o erradicante de algunos tizones, pudriciones, canchros de frutos y hortalizas (Carvalho *et al.* 1998; Cremllyn, 1990).

El *hexaclorobenceno* se usa en el tratamiento de semillas de trigo y de otros granos para el control del añublo adquirido en el suelo o a través de semillas (Cremllyn, 1990).

El *metalaxyl* se utiliza para controlar oomicetos. También se utiliza ampliamente para el tratamiento de suelos y semillas para controlar el ahogamiento de las plántulas y de la pudrición de las semillas causadas por hongos *Phytium* y *Phytophthora* y como tratamiento del suelo para controlar los canchros y las pudriciones del tallo causado por *Phytophthora* (Agrios, 1996; Cremllyn, 1990).

El *benomyl* es un fungicida que controla gran variedad de pústulas y manchas foliares, tizones, pudriciones, roñas y enfermedades de semillas, presenta gran efecto inhibitorio de las infecciones ocasionadas por *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis*, *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium* (Carvalho *et al.* 1998; Cremllyn, 1990).

El *thiabendazole* actúa contra enfermedades que aparecen después de la recolección de manzanas y peras, y en los recubrimientos de semillas contra la caries del trigo (*Tilletia caries*) cuando el fungicida deba persistir en la planta por varios meses, se ha usado también contra la pudrición de los tallos de los plátanos, el moho verde y azul en los cítricos (Carvalho *et al.* 1998; Cremlyn, 1990).

El *carboxin* se prepara por reacción de la α -cloroa-cetoacetanilida y el 2-tioetanol, es un material utilizado para el recubrimiento de las semillas con organomercuriales, ya que el micelio del hongo se encuentra muy adentro de la semilla, muestra también efecto contra carbones de la avena. El añublo de los retoños del trigo, el rayado de la hoja de cebada (Cremlyn, 1990).

El *oxicarboxin* tiene actividad sistémica contra las enfermedades llamadas royas en los cereales y en las hortalizas, y el tratamiento de semillas. Los compuestos activos inhiben fuertemente el metabolismo oxidativo de la glucosa y del acetato, así como la síntesis del ARN y ADN, además de que daña a las mitocondrias y a la membrana vacuolar de los hongos (Cremlyn, 1990).

El *tridiamenol* este fungicida muestra una actividad curativa y protectora en enfermedades foliares, de plántulas y raíces, como manchas foliares, tizones, cenicillas, royas y carbones ocasionada por ascomicetes, hongos imperfectos y basidiomicetos. Se aplica

mediante aspersiones foliares y para tratamiento de semillas y suelos (Agrios, 1996; Cremlyn, 1982; Cremlyn, 1990).

3.1 Las Sustancias Húmicas

La materia orgánica es la suma de todas las sustancias orgánicas que contienen carbón química y físicamente, proviene a partir de una mezcla de residuos de plantas y animales en estado de descomposición, sustancias sintetizadas microbiológica y/o químicamente (Schnitzer y Schulten, 1992; Citado por, Aza, 2001).

La materia orgánica en el suelo se divide en sustancias no húmicas y húmicas. Las sustancias no húmicas lo constituyen plantas y microorganismos, las cuales fueron caracterizadas relativamente. Estas son: carbohidratos, proteínas, grasas, ceras, resinas, pigmentos y compuestos de peso molecular (Felbeck, 1965; Schnitzer y Schulten, 1995; Citado por, Aza, 2001).

Las sustancias húmicas son mezclas heterogénea de macromoléculas orgánicas, con estructura química compleja, distinta y más estables que su forma original; provienen de la degradación de residuos de plantas y animales, así como de la actividad de la síntesis de microorganismos (Stevenson, 1982).

La formación de sustancias húmicas vía lignina, se derivan al no ser completamente mineralizadas por los microorganismos del suelo, que da lugar a un residuo transformado por

pérdida de grupos metoxilo (OCH₃) y oxidación de cadenas laterales alifáticas que dan origen primero a ácidos húmicos y luego a ácidos fúlvicos. Esto es para suelos mal drenados. Se deriva de múltiples reacciones, en la mayoría de los suelos, la vía más importante es la que implica reacciones de condensación a partir de polifenoles y quinonas, dando origen un material muy heterogéneo ((Boul *et al.* 2004; FitzPatrick, 1985; Porta *et al.* 2003).

Las sustancias húmicas se caracterizan por ser de color oscuro, ácidas predominantes cromáticas, hidrofílicas, químicamente complejas, polielectrolíticas, con amplio rango de peso molecular. Las sustancias húmicas se encuentran unidas, en diversas formas, con fracción mineral del suelo. Estas uniones están basadas en su disolución en medio líquida, básica y ácida, lo cual dan origen a los ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas residuales (HR) (Labrador, 1996; FitzPatrick, 1985; Schnitzer y Schulten, 1992; Stevenson, 1982).

3.1.1 Ácidos Fúlvicos

Los ácidos fúlvicos son mezclas de sustancias orgánicas, a diferencia de los ácidos húmicos no son homogéneos ya que cada uno contiene sustancias de una amplia gama de pesos moleculares. El peso molecular del ácido fúlvico por lo general es menor de 10 000 moléculas/gramo y el del ácido húmico de mas de 5000 moléculas/gramo, llegando hasta varios millones (FitzPatrick, 1985).

Los ácidos fúlvicos se le denomina al material coloreado que permanece en solución después de eliminar el ácido húmico por acidificación, es de bajo peso molecular, de color amarillento, es soluble, mantiene un incremento en el peso molecular de 2000 a 300000 KDa, además de un 45% y 48% de carbono y oxígeno (Bohn *et al.*, 1993). Los ácidos fúlvicos, son extraíbles con reactivos alcalinos y solubles a todos los valores de pH (Labrador, 1996).

3.1.1.1 Composición Físico-Química de los Ácidos Fúlvicos

Los ácidos fúlvicos son de color amarillo a pardo, con un peso molecular bajo, de 40-50% de carbono, contiene < 4% de nitrógeno, 44-48% de oxígeno, además de grupos funcionales como son los carboxílicos (COOH) de 8-9 meq/g, metoxilicos (OCH₃) < 0,5 meq/g, alcohólicos (OH) de 3-6 meq/g, fenólicos (OH) de 3-6 meq/g y carbonil (C=O) de 1-3 meq/g. Además de presentar una unidad nuclear estructuras aromáticas de carbono- poco pronunciada, habiendo un predominio mayor de constituyentes O-alquílicos-carbohidratos- y de grupos funcionales oxigenado (FitzPatrick, 1985; Labrador, 1996).

3.1.1.2 Importancia de los Ácidos Fúlvicos en la Agricultura

Los ácidos fúlvicos son de gran interés para productores del campo, ya que entre sus múltiples beneficios, posibilitan un mejor aprovechamiento de fertilizantes foliares y radiculares, además de estimular el crecimiento de la planta, como resultado un alto

rendimiento en la cosecha, mejoramiento y recuperación de la estructura del suelo al favorecer la formación de agregados y la reproducción exponencial de microorganismos benéficos (Anónimo, 2009, Camacho, 2001).

La aplicación de los ácidos fúlvicos a cultivos, por ejemplo: en cereales y hortalizas, bajo condiciones controladas, estimulan el crecimiento vegetal de las plantas, interviene en forma directamente en varios mecanismos, como la formación de raíces adventicias, respiración de raíces, síntesis de proteínas, división celular e indirectamente en la disponibilidad de iones y su traslocación dentro de la planta, es decir, actúan como suplidores y reguladores de la nutrición de la planta, cuando se aplican concentraciones bajas de ácidos fúlvicos (Aza, 2001; Camacho, 2001; Frías, 2000; Ovalle, 2005).

La complejación y/o quelatación de cationes, es el papel más importante de las sustancias húmicas con respecto a los seres vivos (vegetales), por que al quelatar los iones, se facilita la disponibilidad de estos para algunos mecanismos, principalmente el prevenir su precipitación además de la influencia directamente en la disponibilidad de los iones (López, 2002).

4.1 Hongos Fitopatógenos Asociados a Semillas

Las enfermedades de las plantas aparecen por la infección que llevan las semillas, inicialmente, las pérdidas acontecen en el periodo pre-emergente y por muerte de plántulas,

sin embargo, la dispersión de la enfermedad puede causar la pérdida total o parcial de la cosecha. Entre los organismos fitopatógenos que pueden ser transportados por las semillas, el grupo de los hongos es el más numeroso. Dichos fitopatógenos pueden localizarse en los diferentes tejidos de los recursos fitogenéticos (Moreno, 1978; Vásquez, 2008).

La dispersión de un número grande de hongos patógenos es dependiente de la transmisión de las esporas a través del aire en largas o cortas distancias y su depósito en huéspedes adecuados. Los hongos pueden penetrar la membrana de las semillas y depositarse en los tejidos del cotiledón, rara vez se le encuentra en el embrión (Moreno, 1978). La posición del patógeno en o dentro de la semilla puede afectar la sobrevivencia de ésta una vez que se den las condiciones adecuadas, como la baja temperatura y humedad que son favorables para el mantenimiento del vigor de la semilla prolongan también el periodo de vida del hongo patógeno (Agrios, 1996; Moreno, 1978;).

Los hongos filamentosos son los que causan más problemas, siendo el filum Ascomycota y Deuteromycota los más numerosos. Dentro de Basidiomycota, los agentes causales de carbones se destacan por su importancia en la sanidad de semillas. Respecto a eustramenopilos (chromistas), antes considerados como hongos inferiores, están representados por aquellos organismos que producen tizones, ahogamientos y cenicillas vellosas, los cuales se transportan como oosporas, principalmente pertenecientes al orden Peronosporales, a las familias Pythiaceae y Peronosporaceae, los cuales se transmiten a través de semillas o materiales de propagación vegetativa de diversos hospedantes (Agrios, 1996; Neergaard, 1977; Vásquez, 2008).

Los hongos reducen la calidad de los alimentos y de las semillas, esto se debe a la producción de sustancias tóxicas y la baja capacidad de la germinación; siendo los responsables de la producción de metabolitos conocidos como micotoxinas, las especies que corresponden a los géneros de *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus flavus*, (Agrios, 1996; Campos, 1987; Castillo, 1987).

4.1.1 Etiología de *Fusarium moniliforme*

El género *Fusarium* produce micelio extenso de forma algodonosa en la estructura colonial, presenta color rosa, morado o amarillo, en el micelio; conidióforos alargados en forma de botella reunidos en una almohadilla, con ramas a intervalos regulares o verticiladas, septados, individuales o agrupados en esporoquios; conidios de dos tipos: microconidios elípticos o piriformes, unicelulares o bicelulares, no curvados, en cabezuelas o en cadenas; macroconidios falcados, en forma de media luna o elípticos, 2 a 9 septas, ápice puntiagudo, roma o en forma de gotero, base puntiaguda, roma o en forma de pie; clamidosporas, si se producen, globosas, ovales o piriformes, individuales o en grupos, intercalares o terminales, uni o bicelulares, lisas o rugosas y generalmente de color café (Agrios, 1996; Barnett y Hunter, 1972; Romero, 1993).

El género *Fusarium* resiste tanto la desecación como un suelo saturado de agua. Es capaz de asimilar azúcares muy complejos. Es buen colonizador de la materia orgánica. Resiste bien en condiciones asfixiantes incluso del 100 por ciento de CO₂, de ahí su localización en profundidad (Bigre *et al.* 1987), es un hongo muy común que produce

macroconidios en forma de hoz, con septos poco evidentes, y microconidios que en las preparaciones *in situ* aparecen formando cadenas de hasta veinte elementos. Puede vivir como organismo saprótrofo, pero también como parásito de un gran número de plantas alejadas entre sí. El estado sexual se encuentra más difícilmente; aparece sobre residuos vegetales muertos formando peritecios y pared rugosa de color azul oscuro, de 250-350 μm de diámetro (Muntañola, 1999; Smith, 1963).

Fusarium moniliforme (Sheldon) presenta microconidios en cadenas persistentes o unidos en cabezuelas falsas, con el tiempo se esparcen sobre el micelio aéreo amarillo brillante o rosa claro, como un polvillo transparente brillante, unicelular o bicelulares, fusiformes, oviformes (Booht, 1971). Macroconidios delicados en forma de lezna o punzón ligeramente en forma de media luna o casi rectos, puntiagudos en ambos extremos, frecuentemente constreñidos en el ápice y algunas veces en forma de gancho, con célula verdadera o aparente, esparcidos o agrupados en esporodoquios brillantes en masa, de color isabelino o salmón al deshidratarse, rojo-ladrillo a café canela o pálidos, con 3 a 5, excepcionalmente 6 a 7 septas. Clamidosporas ausentes. Pueden presentarse esclerocios azul oscuros, esféricos, 0.08 x 0.1 mm, estroma más o menos plectenquimatoso, amarillo, café, violeta. (Alexopoulos, 1962; Gilman, 1963; Smith, 1963).

F. moniliforme, es uno de los hongos más bien no especializados y muy extendidos en los suelos, su distribución es amplia, así como su importancia económica, ataca principalmente a las raíces y plántulas, pues entre sus hospedantes comunes figuran el maíz, el arroz, el sorgo, la caña de azúcar y el plátano, a los que ocasiona ahogamiento y pudriciones.

En maíz, es bien conocida la pudrición del tallo y de la mazorca, en la caña de azúcar la pudrición del tallo o Pokkah-bong y en arroz la enfermedad de Bakanae o gigantismo, provocado por la giberelina que en esta planta produce *F. moniliforme*, especialmente en las áreas tropicales (Romero, 1993; Smith *et al.* 1992).

Entre los agentes patógenos del suelo mas importante se encuentra *F. moniliforme* que causa la enfermedad conocida como Fusariosis, la sintomatología aparece a finales de primavera en plantas aisladas que florecen y marchitan y al hacer un corte transversal al tallo o turión por la zona del cuello se observa la necrosis de los vasos liberianos, además de atacar las raicillas, rizomas, yemas y brotes hasta provocar su podredumbre (Planes y Carrero, 1995).

El achaparramiento, pudrición de raíz o secadera es causada principalmente por *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Gloesporium* sp., *Verticillium* sp., algunos autores designan a esta enfermedad bajo el nombre de complejo de la pudrición negra, producida por un complejo de hongos asociados, señalan que esta alteración es extremadamente destructiva y que no puede considerarse como una enfermedad sino como una aglomeración de enfermedades. Estos patógenos prosperan bajo condiciones de alta humedad y temperaturas, sobreviven como micelio, clamidosporas, se propaga principalmente por plantas contaminadas, agua para riego y herramienta de cultivos (Anaya, 1999; Mendoza y Pinto, 1985).

Fusarium moniliforme, que ataca el maíz, produce largas cadenas de microconidios acumulándose en gotas de mucilago en las bocas de las fiálides. La pudrición aparece antes o después de la polinización, la médula del tallo presenta coloración rosa o salmón que después se torna color café y como consecuencia origina una madurez prematura y acame (Díaz, 1993).

Gibberella fujikuroi es el estado teleomorfo de *Fusarium moniliforme* (Sheldon), asimismo en estado conidial anamórfico se le conoce con el mismo nombre *F. moniliforme*, el cual es el hongo que produce ácido giberélico en grandes cantidades y que causa, la enfermedad “Bakanae” del arroz en Asia Oriental y a la cual se le atribuía más del 70% de las pérdidas de las variedades tempranas. La enfermedad presenta síntomas manifestándose un alargamiento exagerado de las plántulas (Muntañola, 1999).

Los peritecios de *Gibberella* son globosos, violáceos o azulados, negruzcos, blandos y ostiolados. Se pueden formar superficialmente o dentro de un estroma carnoso, y pueden disponerse aislados o en grupos. Las ascas son hialinas, cilíndricas a claviformes y contienen ocho ascosporas fusiformes, ligeramente incurvadas y con uno a tres septos (Herrera y Ulloa, 1990). Las especies del género *Gibberella* viven generalmente como saprobias, aunque hay varias fitopatógenas que causa la pudrición o roña roja de las mazorcas de maíz; también puede atacar cebada, avena, centeno, alfalfa y trébol, además pueden vivir como saprobio en el suelo y en restos vegetales (Herrera y Ulloa, 1990; Agrios, 1996; Llácer *et al.* 2000).

4.1.1.1 Clasificación Taxonómica de *Fusarium moniliforme*

Agrios (1996) ubicó a *Fusarium moniliforme* en la siguiente clasificación taxonómica:

Reino.....Hongos
División.....Eumycotina
Subdivisión.....Deuteromycotina
Clase.....Hyphomycetes
Orden.....Hyphales
Género.....*Fusarium*
Especie.....*Fusarium moniliforme*

4.1.2 Hongos Antagonistas de Suelos Supresivos

Un suelo supresivo de enfermedades es aquel capaz de proveer un ambiente en el cual el patógeno no se establece o persiste, o bien se establece, pero no causa daño o causa muy poco, aun cuando el patógeno y el hospedero susceptible están presentes (Agrios, 1996). Los “supresores de enfermedades”, son microorganismos benéficos que requieren materia orgánica para su subsistencia. Es así como al aplicar carbono fácilmente disponible al suelo, como abonos verdes o compost, éste estimula la actividad biológica y causa una activa competencia entre los microorganismos benéficos y patógenos (Elizalde, 2002; Gilman, 1963).

Se ha observado que numerosas clases de organismos antagónicos prosperan en los suelos supresores; sin embargo, también se ha observado con más frecuencia que la supresión

tanto del patógeno como de la enfermedad se debe a hongos como *Trichoderma*, *Penicillium* y *Sporodesmium* (Gilman, 1963).

La adición de suelos supresores a suelos propicios reduce la magnitud de la enfermedad al introducir microorganismos antagónicos al patógeno. Por ejemplo se ha utilizado suelo supresor virgen para controlar a la pudrición de la raíz del papayo por *Phytophthora*, al plantar plántulas de este árbol en suelos supresores depositados en hoyos en el suelo del huerto, que había sido infestado por el hongo de la pudrición de la raíz, *Phytophthora palmivora* (Llácer *et al.* 2000). Además, el cultivo continuo de trigo o pepino hace que disminuya la magnitud de la enfermedad pietin del trigo y del ahogamiento de las plántulas de pepino por *Rhizoctonia* (Agrios, 1996).

4.1.2.1 Etiología de *Trichoderma harzianum*

El hongo *Trichoderma* se caracteriza por la producción de conidióforos hialinos, muy ramificado, no verticiladas; fialides individual o en grupos; conidios (phialosporas) hialina, 1-unicelulares, ovoides, en racimos terminales pequeñas, generalmente fáciles de reconocer por su rápido crecimiento y manchas verdes o cojines de las conidios; saprófitos del suelo o de madera, muy común, algunas especies reportadas como parásitos de otros hongos (Agrios, 1996; Alexopoulos, 1962; Barnett y Hunter, 1972).

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Papavizas, 1985). Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa (Benítez *et al.* 2004; Papavizas *et al.* 1982).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.* 1982).

Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de determinadas especies como lo es *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre los hongos fitopatógenos (Ciencia y Tecnología, 2003; Yedidia *et al.* 1999; Ezziyyani *et al.* 2003).

Trichoderma harzianum se caracteriza por sus conidióforos terminados en fiálidas, esporas lisas, hialinas, con un solo núcleo, verdosas, subglobosas u ovoides y colonias de

crecimiento rápido (7-9 cm) (Barnett y Hunter, 1972). Los conidióforos están muy ramificados teniendo cada ramificación forma de ángulo recto con la pequeña rama que la soporta. Cada conjunto de ramificaciones tiene forma piramidal semejante a un pequeño arbusto, morfología característica y típica de este hongo (Alexopoulos, 1962; Papavizas *et al.* 1982).

Fernández-Larrea *et al.* (1992) describieron al *Trichoderma harzianum*, como un microorganismo competitivo que ofrece una protección biológica a la planta, destruye el inóculo del patógeno presente y contribuye a prevenir su formación.

Trichoderma harzianum produce numerosos antibióticos y enzimas: (β -1,3- glucanasa, quitinasa, pectinasas, xilasas, glucosidasas, proteasa y celulasa) degradadores de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo, además de manifestar propiedades parasitarias contra diversos hongos, produciendo alteraciones en las hifas del parásito. Inicialmente realiza un reconocimiento y adherencia sobre la pared del patógeno, posteriormente promueve la hidrólisis de las hifas y esclerocios del patógeno por medio de las enzimas producidas (Benítez *et al.* 2004; Camargo, 2005; Fernández-Larrea *et al.* 1992).

Wells *et al.* (1972), realizaron una descripción de una cepa de *Trichoderma harzianum*, indicando que se desarrollaba rápidamente, cubriendo el medio de cultivo, contenido en placas de petri de 100 mm, en cuatro días. Dicho hongo se caracteriza por tener un crecimiento rápido y una abundante producción de esporas que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo. Estudios posteriores han confirmado el control de la pudrición y descomposición de la madera al tratar las heridas y los tocones de los árboles con hongos

antagónicos como *Trichoderma* ocasionada por *Heterobasidion (Fomes) annosum* (Agris, 2001).

Existen cultivos en los que se han encontrado variedades que muestran cierto grado de resistencia a *Pythium*, pero hasta ahora no existen variedades comerciales que sean resistentes a este hongo. Sin embargo, se han logrado controlar al ahogamiento de las plántulas y a la pudrición de las semillas ocasionadas por este hongo tratando estas con conidios de *Trichoderma* sp., *Penicillium oxalicum* y *Gliocadium virens*, incorporando los conidios de *Trichoderma* o *Streptomyces* sp. a mezclas de biopreparados (Agris, 1996, Llácer, 2000; Anaya, 1999).

4.1.2.2 Clasificación Taxonómica de *Trichoderma harzianum*

Agris (1996) clasifico taxonómicamente *Trichoderma harzianum* en el siguiente orden:

Reino.....Hongos
División.....Eumycotina
Subdivisión.....Deuteromycotina
Clase.....Hyphomycetes
Orden.....Hyphales
Género.....*Trichoderma*
Especie.....*Trichoderma harzianum*

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Trabajo

El proyecto de investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” en el Laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación en Desarrollo y Tecnología de Semillas, perteneciente al Departamento de Fitomejoramiento, ubicado en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, en coordinación con el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, en el Laboratorio de Fitopatología, del Departamento de Interacciones Planta-Insecto, ubicado en Yautepec, Morelos, México.

➤ Bioensayo con Ácidos Fúlvicos (AF) y el Hongo Fitopatógeno

Se realizaron pruebas *in vitro* con AF aplicando dosis de 0, 1000, 2000 y 3000 ppm en concentraciones de inóculo de 10^{-1} (24,8005 ufc/mL), 10^{-2} (62,193 ufc/mL), 10^{-3} (15,173) y 10^{-4} (12,153 ufc/mL), evaluadas en tiempos de 30, 60 y 90 minutos de exposición, para determinar la actividad fungicida mediante el número de esporas viables/mL, además de evaluar su efecto sobre el crecimiento micelial en donde se sembraron discos del inóculo *Fusarium moniliforme* sobre medio de cultivo PDA mezclado con 0, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 ppm de AF.

Obtención del inóculo de *Fusarium moniliforme*. Para realizar dicho bioensayo fue necesario obtener el inóculo en semillas de maíz (*Zea mays* L.), Híbrido SB50 (PIONNER HIBRIDS, CO.) mediante la técnica de papel secante y congelación (Neergaard, 1977), modificada para medio de cultivo, en la que se utilizaron 100 semillas lavadas con Tween-20 para desproveerlas del tratamiento químico. Dicha técnica consistió en desinfectar la semilla con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial al 0.6% mas dos gotas de Tween-20 durante 3 minutos; al termino se decantó enjuagando con agua destilada estéril, se secaron y posteriormente se depositaron bajo la cámara de flujo laminar, sobre papel filtro húmedo contenido en 2 cajas Petri de vidrio (16 cm de diámetro) estériles, depositando 50 semillas por caja, con un acomodo equidistante, sellando las cajas con cinta parafilm. Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas, al termino se sometieron a congelación a -20 °C por 48 horas, luego se devolvieron a la cámara de flujo laminar por 24 horas para secarse.

Las semillas posteriormente se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo malta-sal-agar, preparado en una proporción de 20g/L de extracto de malta, 20g/L de agar bacteriológico y 60g/L de cloruro de sodio (Sosa-Moss *et al.*, 1996). Tales cajas se sellaron con cinta parafilm e incubaron en una estufa a 25 °C por 15 días. Las cajas se sometieron a observación para la identificación de colonias potenciales de *F. moniliforme* basándose en sus características morfológicas como el micelio observado bajo un estereoscopio y de sus estructuras de fructificación mediante preparaciones microscópicas observadas en el microscopio (Warham *et al.*, 1999).

Dicho hongo, se purificó mediante cultivos monospóricos. Los cultivos consistieron en tomar pequeñas porciones del inóculo ubicado sobre la semilla con el micelio de *F. moniliforme*, depositándolas en un tubo de ensayo conteniendo agua destilada estéril mas dos gotas de ácido láctico al 25% hasta formar un suspensión que se disgregó y homogenizó hasta obtener una solución de esporas. Posteriormente se transfirió una porción con un asa bacteriológica estéril realizando estría simple en cajas Petri en medio de cultivo Agar Agua, preparado en una proporción de 15-20 gr de agar bacteriológico/L de agua destilada, incubándose a 25 °C por 24 horas, al termino se observaron bajo un estereoscopio identificando las colonias mas aisladas y puras, sembrándolas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), para obtener suficiente crecimiento y desarrollo micelial.

Fusarium moniliforme fue identificado considerando características morfológicas de los conidióforos, esporas y micelio, siendo estas características suficientes para determinar su clasificación (Agrios, 1996; Barnett y Hunter, 1972).

Una vez identificado se incrementó en medio de cultivo de caldo de Papa y Dextrosa natural elaborado como se ha descrito previamente (Burgess *et al.*, 1988). La preparación del medio de cultivo consistió en hervir 200 gr de papa en un litro de agua hasta la cocción. La suspensión se filtró y se pasó por tela cielo (gasa) estéril hasta completar un litro en un matraz, adicionando 15g de dextrosa, agitando vigorosamente hasta homogenizar, esterilizándolo a 121 °C en la autoclave durante 15 minutos.

En 75 mL de dicho medio se adicionaron dos discos de *F. moniliforme* de 5 mm de diámetro conteniendo colonias incipientes puras. Posteriormente se agitó por 48 horas para inducir la esporulación. Después se filtro a través de una gasa para eliminar restos de micelio, obteniendo así una solución inicial de esporas para el establecimiento del bioensayo.

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y su Efecto en Esporas de *Fusarium moniliforme*

En la prueba se utilizaron AF al 14 por ciento de su concentración, que se obtuvo a partir de extractos de composta de gallinaza.

Se emplearon dosis de AF de 0, 1000, 2000 y 3000 ppm, utilizando tres repeticiones, a los que se adicionó y diluyó concentraciones de inóculo de *F. moniliforme* de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , a partir de una solución inicial de esporas, siendo expuestos a los AF en tiempos de 30, 60, y 90 minutos. Al termino de cada tiempo de exposición se tomó la cantidad de 0.25 mL de inóculo de cada una de las repeticiones por tratamiento, depositándolas en cajas Petri con medio de cultivo PDA, diseminándola con una varilla de vidrio. Dichas cajas se sellaron e incubaron a 25 °C durante 48 horas, posteriormente se realizó el conteo de esporas viables de cada tratamiento, mediante una plantilla milimétrica estableciendo cinco cuadrantes de conteo (A, B, C, D y E) obteniendo un promedio, el resultado se multiplicó por el área de la caja 59.44 cm^2 para determinar la cantidad presente en 0.25 mL de inóculo depositado, cuya conversión en ml consistió en multiplicar las esporas viables por un mL entre la cantidad depositada.

Análisis Estadístico

El experimento se distribuyó mediante un Diseño Experimental Completamente al Azar con arreglo factorial (AxBxC); los factores fueron: A= 4 dosis de ácidos fúlvicos, B= 4 diluciones de inóculo y C= 3 tiempos de exposición, utilizando tres repeticiones por cada tratamiento; además, se estableció la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), la variable dependiente evaluada fue el número de esporas viables por tratamiento, a través del paquete estadístico Statistical Analysis System® (SAS) versión 8.0, bajo el siguiente modelo experimental (Padrón, 2003):

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \xi_{ijklm}$$

Donde: $i = 1, 2, \dots, a$ $j = 1, 2, \dots, b$ $k = 1, 2, \dots, c$ $m = 1, 2, \dots, R$

Y_{ijklm} = Número de esporas viables de *Fusarium moniliforme* en la ijklm-ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general del experimento.

α_i = Efecto verdadero de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos (A).

β_j = Efecto verdadero de la j-ésima dilución de inóculo (B).

γ_k = Efecto verdadero del k-ésimo tiempo de exposición (C).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción (AB) de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con la j-ésima dilución de inóculo.

$(\alpha\gamma)_{ik}$ = Efecto verdadero de la interacción (AC) de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con el k-ésimo tiempo de exposición.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = Efecto verdadero de la interacción (ABC) de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con la j-ésima dilución de inóculo y el k-ésimo tiempo de exposición.

ξ_{ijklm} = Error experimental en la ijklm-ésima unidad experimental.

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos en el Crecimiento Micelial de *Fusarium moniliforme*

Se prepararon seis matraces con 600 ml de Papa Dextrosa Agar (PDA) se esterilizó a 121 °C por 15 minutos en el autoclave, se enfrió a 50 °C. A cada uno se les agregaron los AF en 0, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 ppm, agitando hasta homogenizar para vaciar en cajas Petri (100 x 15 mm) bajo la campana de flujo laminar, disponiendo cinco cajas (repeticiones) por cada dosis. Una vez solidificado el medio, se sembraron discos de la cepa activa del hongo *F. moniliforme* de 5 mm de diámetro en el centro de la caja; posteriormente fueron selladas y se incubaron a 25 °C.

Se evaluó crecimiento micelial de *F. moniliforme* cada 24 horas, a través de la toma de fotografías de las repeticiones de los tratamientos, mismas que se procesaron con el programa ImageJ versión 1.38 para determinar el área de crecimiento micelial en cm². El bioensayo concluyó cuando el testigo con 0 ppm de AF alcanzó el extremo opuesto a donde se depositó el disco inicialmente, en la caja Petri.

Análisis Estadístico

El bioensayo se distribuyó de acuerdo a un Diseño Experimental Completamente al Azar con arreglo factorial (AxB), donde los factores fueron: A= 6 dosis de AF, B= 10 días (240 hrs) de medición, con cinco repeticiones por cada tratamiento.

Se estableció una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), a través del programa Statistical Analysis System® (SAS) versión 8.0 expresada en el siguiente modelo experimental (Padrón, 2003):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde $i = 1, 2, \dots, a$ $j = 1, 2, \dots, b$ $k = 1, 2, \dots, (\text{repeticiones})$

Y_{ijk} = Crecimiento micelial en cm^2 de *Fusarium moniliforme* en la ij-ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general del experimento.

α_i = Efecto verdadero de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos (A).

β_j = Efecto verdadero de la j-ésima tiempo (hrs) (B).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción (AB) de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con la j-ésima tiempo (hrs).

ξ_{ijk} = Error experimental en la ijk-ésima unidad experimental.

➤ **Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y el Hongo Antagonista**

En estas pruebas se utilizó una cepa de *T. harzianum* Tc74, proporcionada por la M. C. Leticia Bravo Luna del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi) del Instituto Politécnico Nacional. Se cultivó incubándose a temperatura ambiente en medio de cultivo PDA; posteriormente fue observada bajo un microscopio compuesto para constatar sus características morfológicas (Barron, 1972; Malone y Muskett, 1964). Aquellas cepas de *T. harzianum* que resultaron puras, se preservaron a temperatura ambiente hasta ser utilizadas.

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos en el Crecimiento Micelial de *Trichoderma harzianum*

Se prepararon seis matraces con 700 ml de medio de cultivo PDA, esterilizándolo a 121 °C por 15 minutos en la autoclave, antes de solidificar el medio se adicionaron los ácidos fúlvicos en 0, 500, 750, 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm, agitando cada matraz hasta homogenizar, vaciando en cajas Petri de plástico estériles (100 x 15 mm).

Una vez solidificado el medio se sembraron discos de la cepa activa del hongo *T. harzianum* de 5 mm de diámetro en el centro de la caja, se sellaron e incubaron a temperatura ambiente, realizando seis repeticiones por tratamiento.

Actividad Parasítica de *Trichoderma harzianum*, después de ser expuesta con Ácidos Fúlvicos.

Para verificar la actividad se realizó la técnica dual (Cherif y Benhamou, 1990), en la que se utilizaron las cepas de *T. harzianum* del bioensayo previo con AF, para posteriormente confrontarse contra el fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* sobre dos cepas C1 y C12.

Se sembraron discos de 5 mm de diámetro de la cepa activa de *T. harzianum* en un extremo de cada caja con medio de cultivo PDA y en un punto opuesto de la misma caja se depositó un disco de la cepa C1, de igual forma se realizó el mismo procedimiento pero con la cepa C12, excepto *T. harzianum* expuesto a 2000 ppm esta se confrontó solo con la cepa C12 debido a que dicha cepa no produjo suficiente micelio y no pudo cubrir el número de discos necesarios para todas las repeticiones; al término de la siembra se sellaron las cajas y se incubaron a temperatura ambiente, realizando 6 repeticiones por tratamiento.

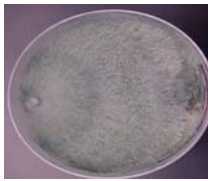
Actividad Antagónica de *Trichoderma harzianum*, después de ser expuesta con Ácidos Fúlvicos

Para verificar la actividad se realizó la prueba de antibiosis, mediante la técnica de papel celofán (Dennis y Webster, 1971), se emplearon las mismas cepas de *T. harzianum*, utilizadas para técnica dual. La prueba consistió en colocar un círculo de papel celofán sobre el medio de cultivo PDA contenido en cajas Petri (100 x 15mm), posteriormente en el centro de la caja se sembraron discos del hongo de 5 mm de diámetro, se sellaron e incubaron a temperatura ambiente. Después de cuatro días *T. harzianum* cubrió la superficie de la caja, por

lo que se retiró el papel celofán junto con el micelio con pinzas previamente estériles, para sembrar discos de 5 mm de diámetro de la cepa de *S. rolfsii* C1 y C12 en el centro de la caja, dichas cajas se sellaron e incubaron a temperatura ambiente, realizando 6 repeticiones por tratamiento.

Se evaluó el crecimiento micelial de *T. harzianum* y *S. rolfsii*, cada 24 horas, a través de la toma de fotografías de las repeticiones de los tratamientos y concluyó cuando el tratamiento de no aplicación de AF, alcanzó el extremo de la caja, excepto en la verificación de la actividad parasítica de *T. harzianum*, ya que se determinó la clase de parasitismo mediante el Cuadro. 1 (Bell *et al.* 1982), las fotografías se procesaron con el programa ImageJ Versión 1.38 para determinar el área de crecimiento micelial en cm².

^ Cuadro 1. Clasificación de antagonismo de *Trichoderma*, con algunas modificaciones, Bell *et al.* (1982).



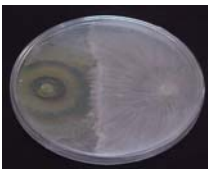
1.- *Trichoderma* crecido completamente sobre el fitopatógeno.



2.- *Trichoderma* crecido menos de 2/3 partes de la superficie del medio.



3.- *Trichoderma* y el fitopatógeno cada uno colonizado a la mitad de la superficie del medio y ninguno de los organismos parece dominar al otro.



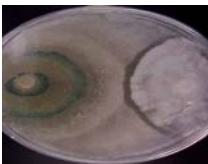
4.- El fitopatógeno coloniza menos de 2/3 partes de la superficie del medio y parece resistir la invasión por *Trichoderma*.



5.- El fitopatógeno sobrecrecido menos de 2/3 parte en *Trichoderma*.



6.- El fitopatógeno sobrecrecido completamente en *Trichoderma* y ocupando completamente la superficie del medio.



7.- Presencia de antibiosis.



8.- Presencia de antibiosis y posteriormente parasitismo.

Análisis Estadístico

El efecto de los ácidos fúlvicos en el crecimiento micelial y actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* mediante pruebas *in-vitro*, se evaluó y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente, mediante un Diseño Experimental Completamente al Azar con arreglo factorial (AxB); los factores fueron A= 7 dosis de ácidos fúlvicos, B= 4 días (96 hrs) de medición, con seis repeticiones por cada tratamiento. Se estableció la comparación de medias a través de la prueba de Tukey con el programa Statistical Analysis System® (SAS) versión 8.0 expresado en el siguiente modelo experimental (Padrón, 2003):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde $i = 1, 2, \dots, a$ $j = 1, 2, \dots, b$ $k = 1, 2, \dots, (\text{repeticiones})$

Y_{ijk} = Crecimiento micelial en cm^2 de *Fusarium moniliforme* en la ij -ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general del experimento.

α_i = Efecto verdadero de la i -ésima dosis de ácidos fúlvicos (A).

β_j = Efecto verdadero de la j -ésima tiempo (hrs) (B).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción (AB) de la i -ésima dosis de ácidos fúlvicos con la j -ésima tiempo (hrs).

ξ_{ijk} = Error experimental en la ijk -ésima unidad experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El inóculo de *Fusarium moniliforme* fue aislado mediante la técnica de papel secante y congelación modificada. Dicho hongo presentó características morfológicas distintivas, la colonial, es un micelio aéreo blanco que a menudo se tiñó de púrpura con una apariencia pulverulenta por la formación de microconidios, de color hialino, unicelulares, de forma oval, y formando cadenas largas, además presentó conidióforos simples con conidios en la parte terminal. No se observaron macroconidios hialinos curvos o casi rectos, de 3 a 7 septas. Lo anterior concuerda como fue descrito por Booth (1971), Barnett y Hunter (1972) Figura 1.

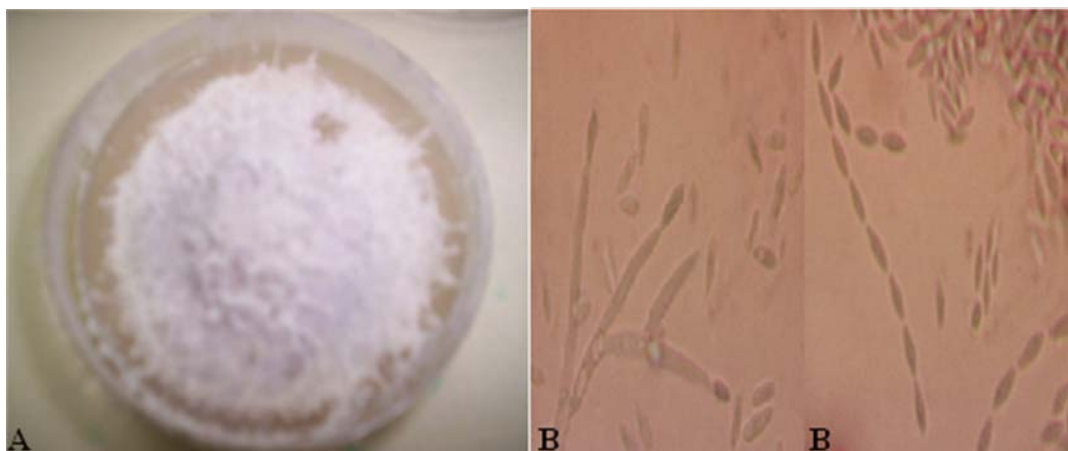


Figura 1. Morfología de *Fusarium moniliforme*. A, morfología colonial. B, conidióforos y microconidios (izquierda); microconidios formando cadenas (derecha).

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y Esporas del Hongo Fitopatógeno *Fusarium moniliforme*

Los ácidos fúlvicos poseen actividad fungicida contra *F. moniliforme*. Este hecho se constató al aplicar dosis de 1000, 2000 y 3000 ppm a una dilución de 10^{-4} esporas/mL, en un tiempo de exposición de 30, 60 y 90 minutos, redujeron dicho inóculo en un 60% a 91%. Los resultados del conteo de las unidades formadoras de colonias viables se estudiaron mediante un análisis de varianza, dicho análisis indicó que las diferencias observadas fueron altamente significativas (Cuadro 2). Además se analizó las interacciones entre los factores evaluados donde se observó que estadísticamente son diferentes y que dicha variabilidad son altamente significativas entre los tratamientos: dosis de ácidos fúlvicos, concentración de inóculo y tiempo de exposición.

Cuadro 2. Análisis de varianza para la variable ufc/mL viables de *Fusarium moniliforme* tratadas con ácidos fúlvicos.

FV	GL	SC	VARIANZA	FC	P > F
Dosis de ácidos fúlvicos	3	22286442557	7428814185.8	169.29**	<.0001
Concentración de inóculo	3	554926304116	18497543470	4215.33**	<.0001
Tiempo de exposición	2	13876755955	6938377977.3	158.12**	<.0001
Dosis x Conc.	15	40461764175	4495751575	102.45**	<.0001
Dosis x Tiempo	11	1178576909.3	196429484.89	4.48**	0.0005
Conc. x Tiempo	11	17225774698	2870962449.6	65.43**	<.0001
Dosis x Conc. x Tiempo	47	2146986358.2	119277019.9	2.72**	0.0009

**Diferencia altamente significativa= $P \leq 0.01$

Coefficiente de Variación = 11.97613%

Los resultados del análisis de varianza se procedieron a realizar la comparación de medias, se observó que ambos factores tienden ser estadísticamente diferentes. Es importante señalar que entre las 4 dosis de AF empleadas, la que presentó mayor efectividad en el control del fitopatógeno *F. moniliforme* fue la de 3000 ppm, en comparación de la que no se dosificó con 0 ppm de AF, presentando una reducción del 47.24% mientras solo el 52.76% equivalente a 37,479 unidades formadoras de colonias/mL se desarrollaron, a diferencia de 1000 y 2000 ppm con sólo un 13.46% se redujo presentando una viabilidad del 86.54% con 61,468 ufc/mL, aun con estos resultados ambas dosis se mantienen por debajo de la media con la no dosificada, observando que la viabilidad se vio favorecida en un 100% con un total de 71,025 ufc/mL (Cuadro 3). Aun cuando se aplica la misma dosis de AF al inoculo de *F. moniliforme* el número de esporas viables difiere de la dosis, a comparación de la no dosificada, por lo que entre mayor sea la cantidad aplicada de AF al inóculo, el número de unidades formadoras de colonias disminuye como se observa en la Figura 2.

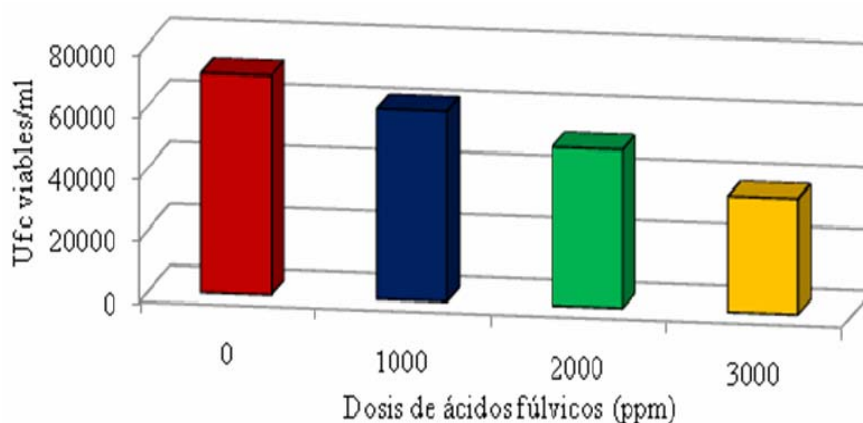


Figura 2. Valores medios de los tratamientos con ácidos fúlvicos en inoculo de *Fusarium moniliforme*.

Los resultados de la comparación de medias en la concentración de inóculo fueron variables (Cuadro 3), observando que a una dilución de esporas de 10^{-4} se redujo en un 98.28% las ufc/mL presentando un desarrollo de solo el 1.72% con 2,711 ufc/mL viables, misma tendencia con la concentración de 10^{-3} al reducir en un 94.52% y solo presentar el 5.48% con 8,640 ufc/mL viables, a diferencia de la concentración 10^{-2} ufc/mL presentó acción inhibitoria del 66.81%, en dicha concentración presentó el 33.19% con 52,312 de la viabilidad de las ufc/ml, al comparar ambas concentraciones con la de 10^{-1} la diferencia tiende a hacer del 100% con 157,588 ufc/mL dilución en donde las esporas no fueron afectadas en su totalidad debido a la gran cantidad (Fig. 3).

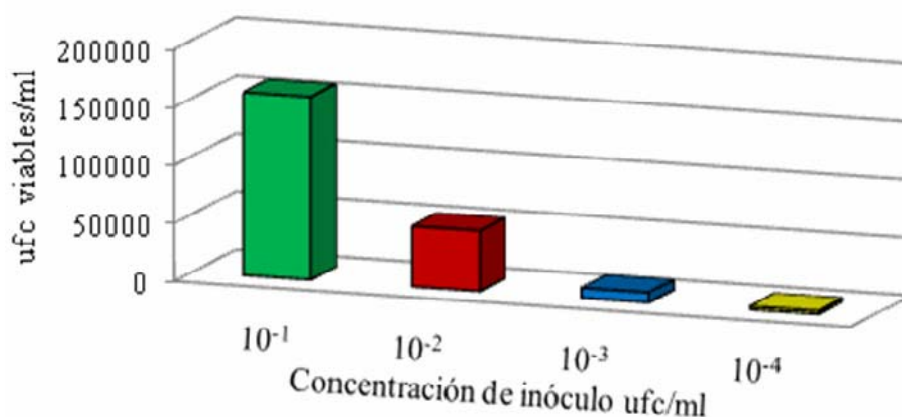


Figura 3. Valores medios de las diluciones con inóculo de *Fusarium moniliforme* tratadas con ácidos fúlvicos.

El factor tiempo de exposición, el más efectivo fue a los 90 minutos al presentar menor número de esporas viables, con el 65% equivalente a 44,416 ufc/mL desarrolladas, a diferencia de los 60 minutos se obtuvo un 78% con 53,312 ufc/ml viables, esto demuestra que

los ácidos fúlvicos requieren de mayor tiempo para establecer un alto contacto con las esporas del inóculo de *F. moniliforme*, para obtener mejor efectividad fungicida, pero al comparar estos resultados con el tiempo de 30 minutos se observa que a menor tiempo de exposición tiende a hacer más estable el número de ufc viables/mL, proporcional a la cantidad inicial, al presentar un 100% con 68,211 ufc/mL (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de medias de los tratamientos evaluados para determinar el efecto fungicida de los ácidos fúlvicos en inóculo de *Fusarium moniliforme*.

Dosis de AF (ppm)	ufc/mL viables	Concentración de inóculo	ufc/mL viables	Tiempo de exposición (min.)	ufc/mL viables
0	71025 a	10^{-1}	157588 a	30	68211 a
1000	61468 b	10^{-2}	52312 b	60	53312 b
2000	51279 c	10^{-3}	8640 c	90	44416 c
3000	37479 d	10^{-4}	2711 d		

Medias con diferente letras en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey $P= 0.05$).

ufc/mL viables = Unidades formadoras de colonias/mL viables.

Al analizar los resultados detalladamente por cada tiempo de exposición se observó que la actividad fungicida de los AF se ve reflejado a partir de los 30 minutos (Cuadro 4), al aplicar dosis de 1000, 2000, 3000 ppm, la cantidad de ufc/mL se reduce en aquellos tratamientos con menor concentración de inóculo, a diferencia del testigo donde la cantidad de esporas viables se mantuvo invariable, siendo más eficiente la aplicación de los AF a una

concentración de 10^{-4} al inhibir en un 79 a 91% las ufc/mL, mientras que solo se desarrollo en un 10.92% con 1,328ufc/mL a 20.14% con 2,448 ufc/mL viables. Sin embargo al aplicar 3000 ppm con igual concentración de inóculo de 10^{-4} , solo el 8.19% equivalente a 996 ufc/mL sobrevivieron, esto indica que los AF ejercen mejor control de hasta un 91.81% al aplicar dicha dosis sobre la concentración de inóculo de *F. moniliforme*, al comparar los resultados con el testigo de no aplicación de AF se observó una diferencia muy significativa al presentar la misma tendencia en el número de esporas viables en las diluciones evaluadas (Fig. 4).

Cuadro 4. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo de *Fusarium moniliforme* a diferentes diluciones de ufc/mL tratadas con ácidos fúlvicos a los 30 minutos de exposición.

Diluciones de inóculo	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)							
	0		1000		2000		3000	
	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables
10^{-1}	248005	100	217073	87.52	185260	74.70	129840	52.35
10^{-2}	62193	100	58105	93.42	85305	34.39	49572	73.28
10^{-3}	15713	100	8044	51.19	6393	40.68	8937	65.87
10^{-4}	12153	100	1328	10.92	2448	20.14	996	8.19

ufc/mL = Unidades formadoras de colonias/mL viables.

% ufc/mL = Porcentaje de unidades formadoras de colonias/mL viables.

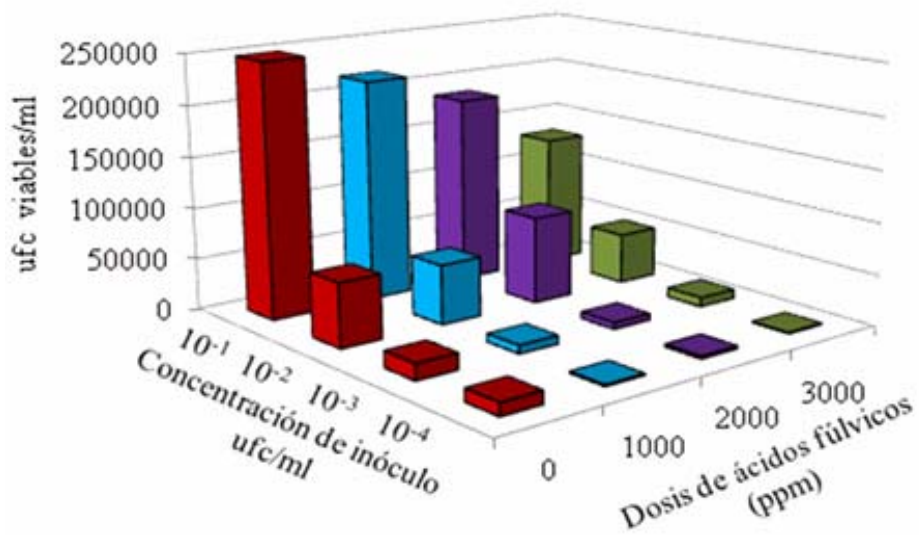


Figura 4. Número de unidades formadoras de colonias viables (ufc/mL) en diferentes concentraciones de inóculo con ácidos fúlvicos a los 30 minutos de exposición.

En el tiempo de exposición de 60 minutos (Cuadro 5) se observó una población de esporas ligeramente incrementada de un 89% a 95% con 185,885 ufc/mL viables, en las concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} cuando se aplicó 1000 y 2000 ppm de AF, diferente a los resultados observados en las concentraciones de 10^{-3} y 10^{-4} aún aplicando dosis de 1000, 2000, y 3000 ppm se redujo el número de esporas sobrevivientes, al desarrollarse solo en un 10.51% con 853 ufc/mL a 64.80% con 9,413 las ufc/mL, se observó que al emplear una dilución de inóculo de 10^{-4} ufc/mL y tratarla con las diferentes dosis de AF se obtiene una inhibición de hasta un 89.49%, siendo la dilución más efectiva en donde el control se vio favorecido a los 60 minutos, al comparar estos resultados con la dosis de no aplicación claramente se observa que los AF si mantienen acción fungicida al reducir el número de esporas viables/mL, a diferencia en esta dosis la concentración de inóculo se mantuvo bajo la misma tendencia al no presentar gran variabilidad en las ufc/mL contadas por cada dilución (Fig. 5).

Cuadro 5. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo de *Fusarium moniliforme* a diferentes diluciones de ufc/mL tratadas con ácidos fúlvicos a los 60 minutos de exposición.

Diluciones de inóculo	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)							
	0		1000		2000		3000	
ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	
10^{-1}	195365	100	185885	95.14	123444	63.18	92605	47.40
10^{-2}	62361	100	56037	89.85	50972	81.73	39204	62.86
10^{-3}	14525	100	6965	47.94	9413	64.80	5281	36.35
10^{-4}	8105	100	853	10.51	1020	12.58	948	11.64

ufc/mL = Unidades formadoras de colonias/mL viables.

% ufc/mL = Porcentaje de unidades formadoras de colonias/mL viables.

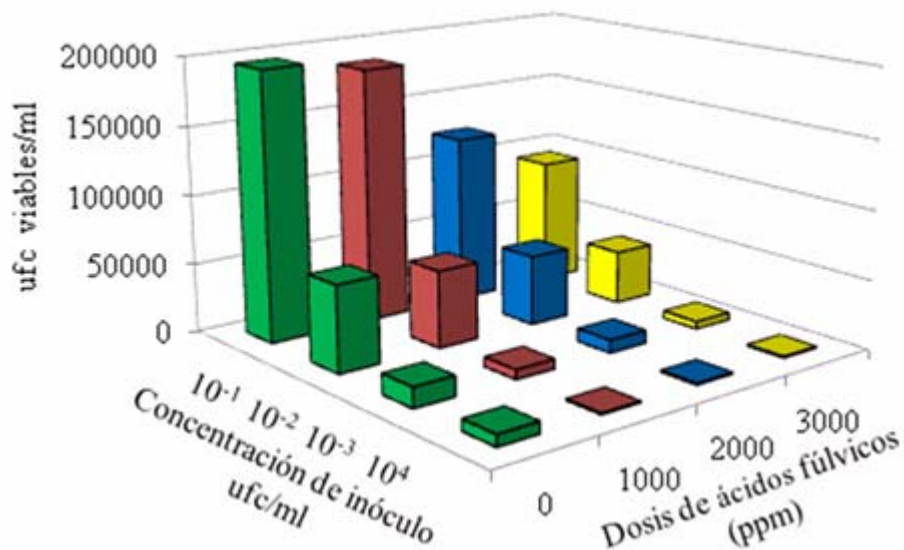


Figura 5. Número de unidades formadoras de colonias viables (ufc/mL) en diferentes concentraciones de inóculo con ácidos fúlvicos a los 60 minutos de exposición.

Los resultados obtenidos a los 90 minutos de exposición (Cuadro 6), indicaron que las diferentes concentraciones de inóculo empleadas se incrementaron hasta un 102.36% con 8,437 ufc/mL cuando se aplicaron dosis de 1000 y 2000 ppm de AF, excepto la dilución de 10^{-4} que solo presento 21.62% con 5,45 ufc/mL sobrevivientes cuando se aplicó 3000 ppm de AF en dicho tiempo, al comparar estos resultados con la dosis de no aplicación de AF se observó una similitud en la viabilidad de ufc/mL aún cuando el inóculo fue tratado con diferentes dosis, por lo que se atribuye que a mayor tiempo de exposición de los AF reducen su acción fungicida sobre la concentración de inóculo de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , por lo que es confiable emplear dosis de 3000 ppm a concentraciones de 10^{-4} ufc/mL en cual se observó mejor acción fungicida en los diferentes tiempos de exposición (Fig. 6).

Cuadro 6. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo de *Fusarium moniliforme* a diferentes diluciones de ufc/mL tratadas con ácidos fúlvicos a los 90 minutos de exposición.

Diluciones de inóculo	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)							
	0		1000		2000		3000	
ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	
10^{-1}	178105	100	150572	84.54	102377	57.48	82524	46.33
10^{-2}	45005	100	45172	100.37	39228	87.16	34592	76.86
10^{-3}	8242	100	7012	85.01	8437	102.36	4705	57.03
10^{-4}	2517	100	568	22.57	1044	41.49	545	21.62

ufc/mL = Unidades formadoras de colonias/mL viables.

% ufc/mL = Porcentaje de unidades formadoras de colonias/mL viables.

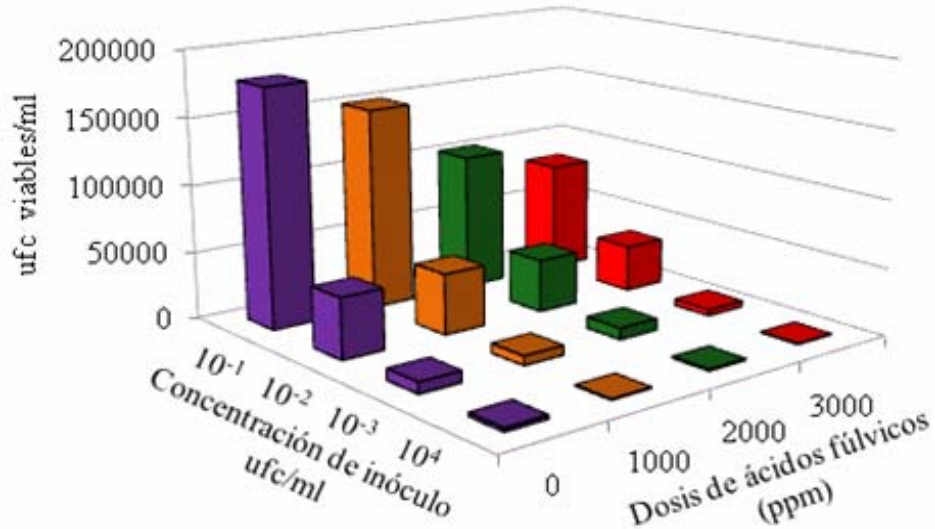


Figura 6. Número de unidades formadoras de colonias viables (ufc/mL) en diferentes concentraciones de inóculo con ácidos fúlvicos a los 90 minutos de exposición.

En los tiempos de exposición se observó que numéricamente el mejor tratamiento fue cuando se empleó 3000 ppm de AF a una concentración de inóculo de 10^{-4} ufc/mL a los 30 minutos de exposición alcanzando el punto óptimo de inhibición del 91.81% ufc/mL, a diferencia en los 60 minutos se redujo la viabilidad de las esporas en un 89.49% al aplicar dosis de 1000, 2000 y 3000 ppm a la misma concentración de inóculo, al comparar estos resultados con los obtenidos a los 90 minutos se observó que solo el 78.38% de la población de esporas fue inhibida al aplicar 3000 ppm a igual concentración de 10^{-4} , es importante señalar que aun cuando el número de esporas viables fue semejante con el testigo de no aplicación de AF la cantidad de ufc/mL se redujo por concentración en cada tiempo, por lo que algunos resultados superaron el testigo, sin embargo al exponerse ambas concentraciones a los 90 minutos se observó que las ufc/mL en el testigo como en las dosis de aplicación en las concentraciones de inóculo se redujo al mínimo, superando la viabilidad de los resultados obtenidos a partir de los 30 y 60 minutos. De acuerdo a los análisis de varianza y el

establecimiento de las medias entre los factores, se observó que estadísticamente el mejor tiempo de exposición es a los 90 minutos, tiempo donde los AF alcanzan su máxima efectividad fungicida.

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y su Efecto en el Crecimiento Micelial de *Fusarium moniliforme*

El experimento arrojó datos importantes revelando que los AF afectan el crecimiento micelial de *F. moniliforme*, inhibiendo en un 66% a 85% el crecimiento al aplicar dosis de 4000 ppm de AF, observando que solo proliferó 10.33cm² del crecimiento micelial del hongo, a diferencia cuando se aplicó 2000, 3000 y 5000 ppm de AF la inhibición osciló entre el 73.23% a 75.37%, mientras se presentó un crecimiento micelial de 17.30 cm² a 18.79 cm² (Fig. 7).

Aun cuando se aplicó 1000 ppm de AF el crecimiento se vio afectado en menor proporción alcanzando una inhibición del 66.49%, esto representa un crecimiento en el micelio de 23.53 cm². Al comparar los resultados con el testigo de no aplicación de AF existe gran diferencia debido a que presenta un área de crecimiento micelial del 100% equivalente a 70.88 cm², área total de la superficie de la caja Petri. Dicho crecimiento se observó durante el periodo de 10 días (240 hrs.) de medición para las dosis de AF experimentadas, las cuales denotaron una disminución continua en el crecimiento del micelio a través del tiempo (Fig. 7).

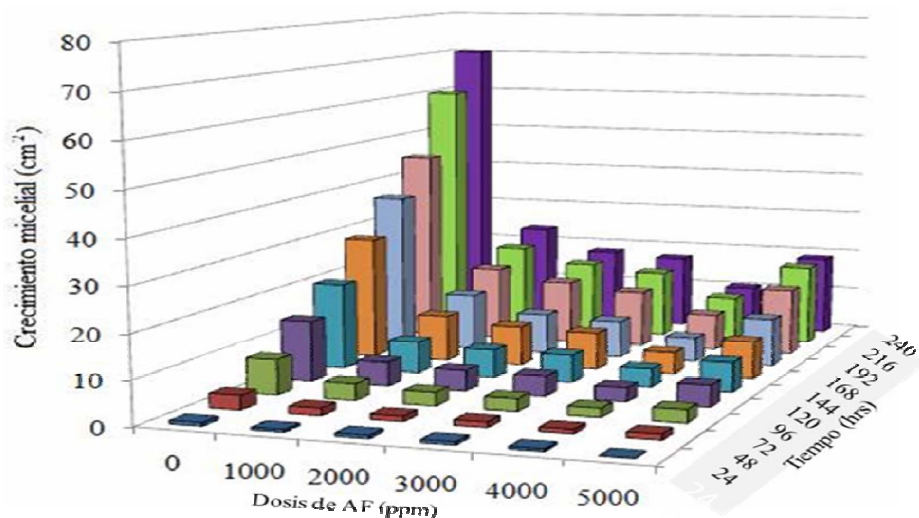


Figura 7. Dinámica de crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme* tratado con ácidos fúlvicos.

El resultado del análisis de varianza estableció diferencias altamente significativas para los factores evaluados y su interacción entre la dosis de AF y periodo de medición se observó que estadísticamente son diferentes en relación a las dosis de aplicación y el crecimiento micelial en cm^2 por día, además de presentar un coeficiente de variación del 34.55% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme*.

FV	GL	SC	VARIANZA	FC	P > F
Dosis de AF	5	18367.22991	3673.44598	226.68**	<.0001
Tiempo de exposición	9	22641.58040	2515.73116	155.24**	<.0001
Dosis de AF x Tiempo	59	12507.18247	277.93739	17.15**	<.0001

** = Diferencia altamente significativa

Coeficiente de variación = 34.55 %

En la comparación de medias (Cuadro 8) se observó que la dosis de aplicación más efectiva fue la de 4000 ppm de AF al inhibir en su totalidad el crecimiento micelial del fitopatógeno, se observó un crecimiento de 5.091 cm². Al emplear dosis de 1000, 2000, 3000 y 5000 ppm de AF se obtuvo resultados similares que fluctuó entre 7.989 cm² a 10.488 cm², esto explica que la actividad fungicida de los AF tiende a ser mas estable en dichas concentraciones, al comparar los resultados con la dosis de no aplicación de AF el crecimiento micelial es de 28.776 cm² equivalente al llenado total del área de la caja de 70.88 cm². Es importante señalar que las dosis con AF empleadas en la prueba si afectan el crecimiento micelial de *F. moniliforme*, a un cuando la dosis de 4000 ppm de AF presentó mayor inhibición, existió un control en menor proporción en el crecimiento micelial en las otras dosis de aplicación.

Cuadro 8. Comparación de medias* en el crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme* tratado con ácidos fúlvicos.

Dosis de AF (ppm)	Crecimiento micelial (cm ²)	
0	28.7764	A
1000	10.4886	B
2000	8.5433	B
3000	7.9893	C
4000	5.0918	D
5000	9.115	B

*Medias con diferente letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey $P= 0.05$).

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos en el Crecimiento Micelial y en la Actividad Antagónica de *Trichoderma harzianum*

En la prueba se observó que los AF ejercen efecto fungicida sobre el micelio de *T. harzianum* Tc74 al inhibir su crecimiento en un 61% a 99% cuando se trató con diferentes dosis de AF, principalmente al aplicar 4000 ppm de AF se obtuvo un crecimiento de 0.73% lo que representa 0.518 cm², sin embargo el crecimiento fue inhibido en un 99.27%, similar a los resultados cuando se aplicó 3000 ppm de AF presentó crecimiento de 0.81% equivalente a 0.571 cm², mientras que fue inhibido en un 99.19%, en las dosis de 750, 1000 y 2000 ppm de AF el daño se redujo de 97.47% a 87.49%, esto permitió que *T. harzianum* se beneficiara al aumentar su crecimiento micelial de 1.785 cm² a 8.797 cm², al aplicar la cantidad de 500 ppm de AF el crecimiento micelial de *T. harzianum* se favoreció en un 38.58% con 27.083 cm², al comparar los resultados con la dosis de no aplicación de AF la diferencia es muy significativa en un 100%, el hongo cubrió el área total de la caja Petri 70.88 cm² (Fig. 8).

El efecto fungicida sobre el crecimiento micelial del hongo se determinó en función del tiempo, durante 4 días (96 hrs.) de medición para las dosis de AF experimentadas, se observó que a partir del primer día el crecimiento reducía de forma continua, hasta completar las 96 hrs. de evaluación dependiendo de la dosis empleada (Fig. 8).

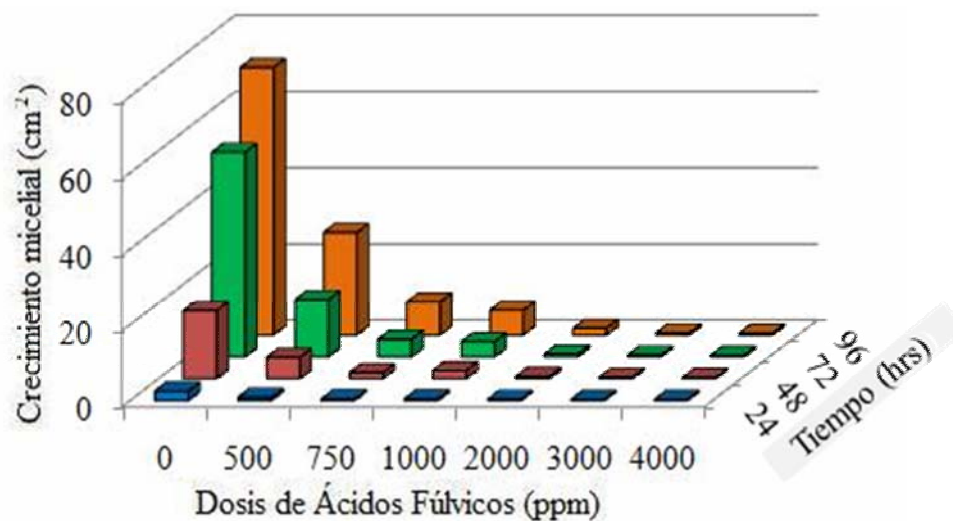


Figura 8. Dinámica de crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* tratado con ácidos fúlvicos.

En el Cuadro 9, se presenta el análisis de varianza del crecimiento micelial en cual se observó que los resultados son estadísticamente diferentes en los tratamientos evaluados, al establecer la interacción entre la dosis de aplicación y el tiempo de medición se observó diferencia altamente significativa con un coeficiente de variación de 46.65%. La comparación de medias se muestra en el Cuadro 10, dicha comparación indicó mejor control al aplicar 3000 y 4000 ppm de AF presentando un crecimiento de 0.519cm^2 a 0.571cm^2 , a diferencia cuando se aplicó 750, 1000 y 2000 ppm de AF la inhibición disminuyó, obteniendo un crecimiento que fluctuó entre 1.785cm^2 a 8.798cm^2 , se observó que al emplear 500 ppm de AF el crecimiento micelial aumento a 27.083cm^2 mientras que el control se redujo, al comparar los resultados con el testigo de no aplicación de AF existe una gran diferencia en el crecimiento micelial de 70.299cm^2 área total del llenado de la caja Petri. Esto explica que los AF afectan el crecimiento micelial de *T. harzianum* aun en concentraciones bajas, observando que a mayor dosis de aplicación el hongo es inhibido en su totalidad.

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum*.

FV	GL	SC	VARIANZA	FC	P > F
Dosis de AF	6	24398.88795	4066.48133	280.06**	<.0001
Tiempo de exposición	4	6399.30854	1599.82714	110.18**	<.0001
Dosis de AF x Tiempo	35	14055.42505	780.85695	53.78**	<.0001

** = Diferencia altamente significativa

Coeficiente de variación = 46.65%

Cuadro 10. Comparación de medias* en el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* tratado con ácidos fúlvicos.

Dosis de AF (ppm)	Crecimiento micelial (cm²)	
0	70.299	a
500	27.083	b
750	8.798	c
1000	6.584	d
2000	1.785	d e
3000	0.571	e
4000	0.519	e

*Medias con diferente letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey $P= 0.05$).

Actividad Parasítica de *Trichoderma harzianum*, después de la Aplicación con Ácidos Fúlvicos

La actividad parasítica de *T. harzianum* se conservó a un al exponerse a diferentes dosis de AF, la cual se confirmó en un periodo de evaluación de 10 a 20 días hasta darse la confrontación con el fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* sobre dos cepas C1 y C12, en la que se determinó la clasificación mediante la tabla de Bell *et al.* (1982), presentó la clase 1. *Trichoderma* crecido completamente sobre el fitopatógeno (Fig. 9).

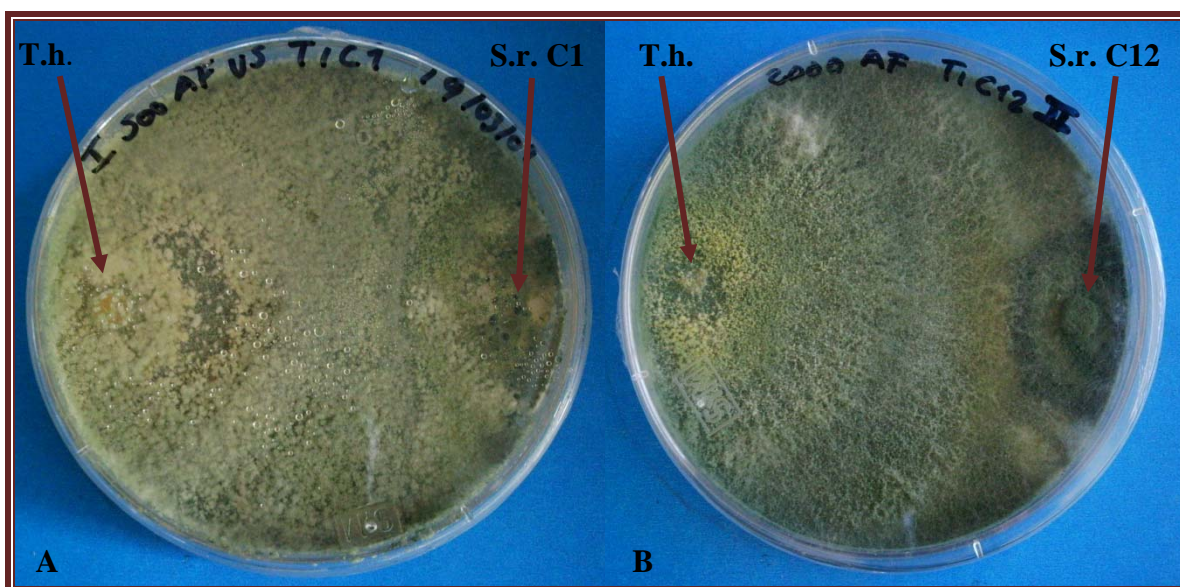


Figura 9. Confrontación de *Trichoderma harzianum* (*T.h.*) y *Sclerotium rolfsii* (*S.r.*) cepa C1 y C12. **A**, Inhibición del crecimiento vegetativo de *S. rolfsii* C1 por la actividad parasítica de *T. harzianum*. **B**, Inhibición del crecimiento vegetativo de *S. rolfsii* C12 por la actividad parasítica de *T. harzianum*, invadió totalmente la superficie de la colonia C1 y C12 en el medio PDA.

Actividad Antagónica de *Trichoderma harzianum*, después de la Aplicación con Ácidos Fúlvicos

Los resultados obtenidos en la prueba establecieron que la acción fungicida de los AF no afecta la actividad antagónica de *T. harzianum*, esto se comprobó al realizar la prueba de antibiosis mediante la técnica de papel celofán, se observó un control en el crecimiento micelial del fitopatógeno *S. rolfsii* sobre la cepa C1 y C12 al reducir de un 40% a 88%, esto indica que el hongo mantuvo un crecimiento de 8.302 cm² a 41.828 cm² en presencia de *T. harzianum* aun tratado con dosis de AF. Dicha actividad antagónica se refleja a partir de las primeras 24 horas y durante el periodo de evaluación de 5 días (120 hrs) (Fig. 10).

La cepa de *T. harzianum* que presentó mayor capacidad antagónica fue la que se expuso a 500 ppm de AF, al inhibir el crecimiento micelial de *S. rolfsii* cepa C1 hasta un 79.54% mientras que solo el 20.46% del micelio proliferó con 14.434 cm², en cuanto al crecimiento de *S. rolfsii* cepa C12 *T. harzianum* resultó a un más eficiente en el control, se observó una inhibición de 88.24% y un crecimiento de solo el 11.76% con 8.302 cm² de proliferación, a diferencia cuando *T. harzianum* fue expuesta a 750 y 1000 ppm de AF la capacidad antagónica se redujo de 52.62% a 40.69% sobre ambas cepas de *S. rolfsii* C1 y C12, esto permitió un crecimiento micelial progresivo de 33.429 cm² a 41.828 cm², excepto cuando se empleo con 1000 ppm de AF la cepa de *S. rolfsii* C12 presentó una inhibición del 81.74% y un crecimiento micelial de 18.26 cm², diferente a lo observado cuando se empleó 2000 ppm de AF la capacidad antagónica fue afectada lo que permitió que el crecimiento micelial de la cepa C12 incrementara a 21.13 cm², finalmente dichos resultados al compararlo

con *T. harzianum* que no fue tratado con AF, se observó una diferencia muy significativa al presentar un crecimiento micelial de 70.500 cm² (Fig. 10).

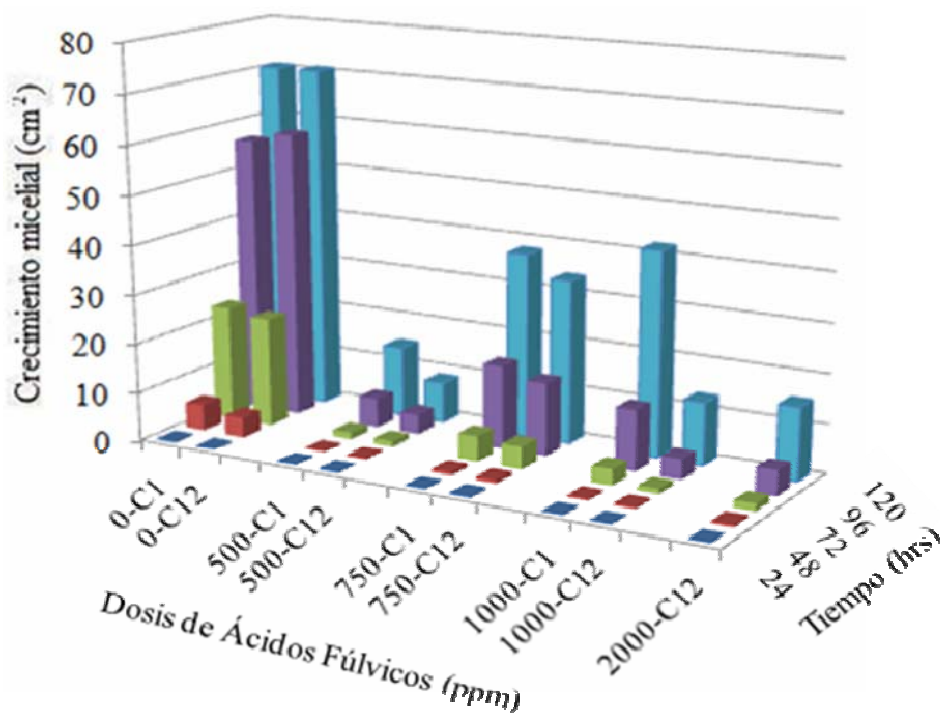


Figura 10. Capacidad de la actividad antagonista de *Trichoderma harzianum* en el crecimiento micelial sobre dos cepas de *Sclerotium rolfsii* C1 y C2.

El análisis de varianza de la antibiosis de *T. harzianum* en *S. rolfsii* cepa C1, indicó que los resultados son estadísticamente diferentes y que los tratamientos evaluados presentan diferencia altamente significativa con un coeficiente de variación del 47.47% (Cuadro 11). En la comparación de medias (Cuadro 12) se observó diferencias estadísticas en los resultados del crecimiento micelial, estableciendo que al emplear *T. harzianum* a 500 ppm de AF el daño hacia la actividad antagonista se reduce y por lo tanto el control tiende a incrementar en *S.*

rolfsii cepa C1 al observar una proliferación de solo 14.434cm². La adición de 750 y 1000 ppm de AF afectó la antibiosis de *T. harzianum*, lo que favoreció el crecimiento micelial del fitopatógeno de 37.710 cm² a 47.211 cm². La comparación de dichos resultados de los tratamientos con el testigo al que no se empleó AF y *T. harzianum* superó el crecimiento micelial de *S. rolfsii* cepa C1 con 70.517 cm².

Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable antibiosis de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* cepa C1.

FV	GL	SC	VARIANZA	FC	P > F
Dosis de AF	3	14135.88309	4711.96103	87.48**	<.0001
Tiempo de exposición	4	29054.83631	7263.70908	134.86**	<.0001
Dosis de AF x Tiempo	12	10787.01334	898.91778	16.69**	<.0001

** = Diferencia altamente significativa

Coefficiente de variación = 47.47%

El análisis de varianza de la antibiosis de *T. harzianum* en *S. rolfsii* cepa C12, indicó que los resultados son estadísticamente diferentes, así mismo los tratamientos evaluados presentaron diferencia altamente significativa con un coeficiente de variación del 40.72% (Cuadro 11). La comparación de medias arrojó resultados importantes, se observó que al emplear 500 ppm de AF la actividad antagónica de *T. harzianum* no es afectada en su totalidad, por lo que ejerció un buen control en el crecimiento micelial de *S. rolfsii* cepa C12 al observar un desarrollo de solo 11.175 cm², a diferencia cuando se aplicó 750, 1000 y 2000

ppm de AF el crecimiento de *S. rolfsii* cepa C12 incrementó de 12.414 cm² a 33.205 cm² indicando que al emplear altas concentraciones de AF la antibiosis de *T. harzianum* es afectada significativamente, al comparar los resultados con el testigo se observó que superó a los tratamientos con aplicación de AF y *T. harzianum*, por lo tanto *S. rolfsii* cepa C12 presentó un crecimiento de 70.548 cm² (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable antibiosis de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* cepa C12.

F V	GL	SC	VARIANZA	FC	P > F
Dosis de AF	4	24834.55255	6208.63814	269.54**	<.0001
Tiempo de exposición	4	17114.48346	4278.62086	185.75**	<.0001
Dosis de AF x Tiempo	16	16188.80212	1011.80013	43.93**	<.0001

** = Diferencia altamente significativa

Coefficiente de variación = 40.72%

Es importante señalar que *T. harzianum* aun expuesta a diferentes dosis de AF mantiene su capacidad antagonica al ejercer buen control contra el fitopatógeno *S. rolfsii* en especial en la cepa C12, la cual mostró ser más susceptible a la antibiosis de dicho hongo observando mayor inhibición en el crecimiento micelial (Cuadro 13), sin embargo en *S. rolfsii* cepa C1 se observó la misma tendencia en el control del crecimiento, pero en menor proporción lo que indicó que la cepa ejerció mayor resistencia a la actividad antagonica.

Esto demuestra que los ácidos fúlvicos si ejercen efecto fungicida en el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum*, se observó una inhibición de 99% en la aplicación de 4000 ppm de AF durante un periodo de evaluación de 4 días. Sin embargo no es afectada la actividad parasítica y antagonica de *T. harzianum* por lo tanto se observó muy efectivo en el control del crecimiento micelial del fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* cepa C1 y C12.

Cuadro 13. Comparación de medias* en la antibiosis de *Trichoderma harzianum* en el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* cepa C1 y C12.

Antibiosis <i>T. harzianum</i>	Crecimiento micelial (cm ⁻²)	Antibiosis <i>T. harzianum</i>	Crecimiento micelial (cm ⁻²)
0 AF-C1	70.517 a	0 AF-C12	70.548 a
500 AF-C1	14.434 c	500 AF-C12	11.175 c
750 AF-C1	37.710 b	750 AF-C12	33.205 b
1000 AF-C1	47.211 b	1000 AF-C12	14.224 c
		2000 AF-C12	12.414 c

*Medias con diferente letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey $P= 0.05$).

Aun cuando no se establecen estudios en la adición y efecto fungicida de los ácidos fúlvicos en hongos fitopatógenos y hongos antagonistas de los suelos, los resultados en este trabajo fueron favorables, al confirmar que los ácidos fúlvicos poseen actividad fungicida contra *F. moniliforme* al inhibir la viabilidad de las unidades formadoras de colonias de 60 a 91% y su crecimiento micelial de 66% a 85%.

Este hecho establece que la aplicación de materia orgánica y productos del mismo origen poseen efectos y/o acciones sobre los fitopatógenos del suelo, tales como la estimulación de la germinación (para hongos; anulación de la fungistasis) seguida por lisis, lo cual reduce el número de propágulos, la inactivación temporal o permanente de los propágulos en el suelo (incremento de fungistasis) (Papavizas y Lumsden, 1980). Otros estudios han demostrado que dicha aplicación contribuye al potencial anti-fitopatógeno de los suelos, además de una mejora física-química del suelo con alto contenido de fenoles y otros compuestos que tienen efecto antibiótico que actúan en particular directamente sobre los hongos fitopatógenos del género *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium* (Lampkin, 1998, Agrios 1996).

La materia orgánica da origen a las sustancias húmicas, esta a la vez se encuentra unida en diversas formas, una de ellas son ácidos fúlvicos que se caracteriza por la presencia de grupos funcionales como son los carboxílicos, alcohólicos, alto contenido en fenoles. Además de presentar estructuras aromáticas. Debido a su origen y composición no se descarta la posibilidad de que los ácidos fúlvicos ejerzan control sobre hongos fitopatógenos del suelo, en especial a *Fusarium moniliforme*, por lo que se atribuye acción fungicida (FitzPatrick, 1985; Labrador, 1996).

La aplicación de ácidos fúlvicos afecta la micoflora benéfica del suelo, esta acción se confirmó al inhibir su crecimiento micelial en un 61% a 99% de *Trichoderma harzianum*. Sin embargo esta actividad no se ve afectada en su capacidad parasítica y antagónica, ya que al confrontarse con las dos cepas de *S. rolfsii* C1 y C12, presentaron clase 1 (Bell y Markham, 1982). Herrera *et al.* (1999) describe que en primer lugar se observa una zona de inhibición

progresiva, en parte por la mayor velocidad de crecimiento de *T. harzianum*. Después un marcado efecto hiperparasítico, que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial no sólo por compartir el mismo sustrato sino también porque *T. harzianum* produce antibióticos y enzimas: (β -1,3- glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) degradadores de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo (Papavizas y Lumsden, 1980; Herrera *et al.* 1999).

En el caso de antibiosis *T. harzianum* inhibió el crecimiento micelial de los patógenos de un 40 a 88% de *S. rolfsii*. Se observó que aumenta la actividad antibiótica reduciendo la colonia del patógeno. Es decir *T. harzianum* no sólo inhibió la expansión *S. rolfsii* creciendo en su campo de acción, sino que a los cuatro días la colonia del patógeno *S. rolfsii* cepa C1 y C12 se redujo. Este efecto se puede deber a la acción de la enzima hidrolítico β -1,3- glucanasa (Ezziyyani, 2004; Camargo, 2005). La importante de dicha enzima radica en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno (Benítez *et al.*, 2004).

Trichoderma harzianum representa una alternativa viable como agente potencial de biocontrol, dadas sus características de ser eficaz contra fitopatógenos en algunos cultivos al ejercer biocontrol de manera indirecta al competir por nutrientes o espacio, antibiosis (por la producción de metabolitos), modificando las condiciones ambientales o mediante la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y de una forma directa por micoparasitismo (Benítez, 2004). La aplicación de ácidos fúlvicos al suelo a bajas concentraciones contribuye al mejoramiento de la estructural favoreciendo la formación de

agregados y la reproducción exponencial de microorganismos benéficos, como es el hongo del genero *Trichoderma* (Schnitzer, 2000).

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo una cepa de un hongo fitopatógeno identificado como *Fusarium moniliforme*.
2. Los ácidos fúlvicos poseen efecto fungicida contra *Fusarium moniliforme*, al inhibir la viabilidad de las unidades formadoras de colonias (ufc/mL) y el crecimiento micelial expresando su máximo grado de control cuando se aplicaron 3000 ppm a las esporas y se cultivo dicho hongo en un medio con 4000 ppm, respectivamente.
3. Los ácidos fúlvicos ejercen acción fungicida en *Trichoderma harzianum* en el crecimiento micelial, se observó un efecto inhibitorio cuando se cultivo en un medio conteniendo 4000 ppm.
4. Los ácidos fúlvicos no afectan las características parasíticas y antagónicas de *Trichoderma harzianum* más bien respeta sus condiciones, estableciendo un equilibrio en los microorganismos que habitan el suelo, cuando se cultivó en un medio conteniendo 500 ppm de dichas sustancias.
5. Se sugiere realizar posteriores investigaciones en la dosificación de los ácidos fúlvicos, debido a que es posible que por un lado estimulen la supresibilidad de los suelos respetando las poblaciones de microorganismos benéficos, y por otro lado se usen

como posible tratamiento a la semilla contra hongos fitopatógenos y que éste a su vez no formen residuos tóxicos en el suelo que perjudiquen al medio ambiente y en especial a la micoflora benéfica como hongos antagonistas.

LITERATURA CITADA

- Agrios G. N., 1996. Fitopatología. Editorial Limusa, S. A. de C. V. México, D. F. 838 pp.
- Albert, L., Aranda, E., Rincón V., J. F. y Loera, R. 1991. Situación de los plaguicidas en México y sus efectos en la salud y el medio ambiente. *Ecología Política/Cultura*, 2(5): 11-19.
- Alexopoulos, C. J. 1962. *Introductory mycology*. 2nd edition. John Wiley and Sons, Inc. New, York, U.S.A. 613 pp.
- Altieri, M. 1999. Agroecología, bases científicas para una agricultura sustentable. Textos Básicos para la Formación Ambiental. ONU-PNUMA. Montevideo, Uruguay. p. 13-17.
- Amador, M., P. Cussianovich y T. Saravi. 2002. Aproximación de la Oferta Centroamericana de Productos Orgánicos y Situación de los Mercados. Regional. IICA. San José, Costa Rica. 36 pp.
- Anaya, R. S. 1999. Hortalizas, plagas y enfermedades. Editorial Trillas, México, D.F. 544 pp.
- Anónimo. 2009. Los Ácidos Fúlvicos. *Teorema Ambiental Revista Técnico Ambiental*. México, D.F.
http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=47&id_art=2166&id_ejemplar=80
- Aza A. E. 2001. Efecto de los ácidos fúlvicos de dos orígenes en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Barron, G. L. 1972. *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. R. E. Kreiger Publishing. New York, U.S.A. 156 pp.

- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd edition. Burgess Publishing Company. New York, U.S.A. 241 pp.
- Benitez, T., Rincon A. M., Limón M. C. and Codon, A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Bell, O. W. and Markham, H. C. 1982. *In vitro* Antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Ecology and Epidemiology*. New York, U.S.A. 72(4):379-381.
- Bigre, J. D., Morand, J. C. y Tharaud, M. 1987. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, 233 pp.
- Bohn H. L., McNeal B. L. y O'Connor G. A. 1993. Química del suelo. Editorial Limusa. México, D. F. 370 pp.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Boul S.W., Hole F. D. y McCracken R. J. 2004. Génesis y clasificación de suelos. Editorial Trillas. México, D. F. 417 pp.
- Burgess, W. L, Liddell, M. C. and Summerell, A. B. 1988. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd edition. Incorporation a key and description of common species found in Australasia, Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. University of Sidney. 281 pp.
- Camacho, I. F. A., 2001. Efecto de los ácidos fúlvicos en la calidad fisiológica y el crecimiento de algunas especies vegetales. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Camargo, H., 2005. Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza sativa*), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base de *Trichoderma harzianum*.

- Campos, M., 1987. Relación entre micotoxinas y alimentación en países en desarrollo. Revista Post-cosecha. Órgano Oficial de la ALAGRAN-FAO. 8: 30-39.
- Carvalho, F., Zhohg, N. y Tavares, K. S., 1998. Rastreo de plaguicidas en los trópicos. Boletín del OEIA 40: 34-41.
- Castillo, T. J., 1987. Micología general. Editorial Limusa S.A. de C.V., México, D.F. 518 pp.
- Cerisola, C. I., 1989. Lecciones de agricultura biológica. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 349 pp.
- Ciencia y Tecnología., 2003. *Trichoderma* un hongo combatiente de patógenos. Revista agro. 42: 34-40.
- Cherif, M. y Benhamou, N., 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. Phytopathology. 80:1406-1414.
- Cremlyn, R., 1982. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Editorial Limusa, S.A., México, D.F. 356 pp.
- Cremlyn, R., 1990. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. 2ª edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V., México, D.F. 356 pp.
- Cornell, U., 2007. Toxicity of pesticides. Pesticide fact sheets and tutorial, module 4. Pesticide Safety Education Program. p. 76-79
- Dennis, C. y Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.
- Díaz, F. A., 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Editorial Trillas. México, D.F. 288 pp.

- Dua, V. K., Pant, C. S., and Sharma, V. P., 1996. Determination of level of HCH and DDT in soil, water, whole blood bioenvironmental and insecticide sprayed areas of control. Indian journal of Malariology. India. 33:17-15.
- Elizalde, P. J., 2002. Mejore su suelo y controle las enfermedades radiculares. Edición 178. Revista on line, Tattersall. Quebecor Word S.A. <http://www.tattersall.cl/revista/gerac.htm>
- Ezziyyani, M. Pérez, S. C. Sid, A. A. Requena, M. E. y Candela, M. E., 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, España. Anuales de Biología 26: 35-45.
- FAO. 1999. Los principios de la Agricultura Orgánica. http://www.FAO.org/about_ifoam/pdfs/POA_folder_spanish.pdf
- Felbeck, G. T. 1965. Structural Chemistry of Soil Humic Substances. Advances in Agronomy, Academic Press. 17: 67-82
- Fernández-Larrea, O., Calderón, A., Fraga, M. 1992. Metodología de reproducción de cepas de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de hongos fitopatógenos. Informe técnico de investigación, INISAV 12: 8-16.
- FitzPatrick E. A., 1985. Suelos su formación, clasificación y distribución. Compañía editorial continental, S.A. de C.V. México, D. F. 430 pp.
- Frías M. S. N., 2000. Efecto de dos tipos de ácidos fúlvicos en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Gilman, J. C., 1963. Manual de los hongos del suelo. Compañía editorial continental, S.A. México, D.F. 572 pp.
- Gliessman, S. R. 2002. Agroecología. Procesos ecológicos en agricultura sostenible. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. San José, Costa Rica. 39 pp.

- Gómez T. L., Gómez C. M. A. y Schwentesius R. R., 1999. Desafíos de la agricultura orgánica. Editorial Mundi-Prensa, S.A. de C.V. México, D.F. 224 pp.
- Hendi, E. J. and Peake, B. M. 1996. Organochlorine pesticides in a dated sediment core from Mapua, Wiawea Inlet, New Zeland. *Marine Pollution Bulletin*. New Zeland. 32:(10) 751-754.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de cultura económica. México, D.F. 552 pp.
- Labrador, L. J. 1996. La materia orgánica en los agroecosistemas. 2ª Edición, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 292 pp.
- Lampkin, N. 2001. Agricultura ecológica. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 724 pp.
- López C. R. 2002. Comportamiento de sustancias húmicas de diversos orígenes en la física de suelo limo-arcilloso y en la fisiología del tomate. Tesis Doctoral. Ingeniería en sistemas de producción. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. y Bello, A. 2000. Patología vegetal. Tomo II. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España. p. 701-1165
- Mainardi, F. F. 1998. El cultivo biológico de hortalizas y frutales. Editorial de Vecchi. Barcelona, España. 222 pp.
- Malone, J. P. y Muskett, A. E. 1964. Seed-borne fungi – description of 77 fungus species. *Proc. Int. Seed Test.* 29 (2): 179-384.
- Martínez, E. C., 1997. Dimensión social de la agricultura orgánica: un enfoque integral. Memorias del II Foro Nacional de Agricultura Orgánica. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur. p. 11-15.

- Mendoza, Z. C. y Pinto, B. 1985. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma Chapingo, Montecillo, Edo. de México. 256 pp.
- Miller, G. T., 2004. Sustaining the Earth. 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9. p. 211-216.
- Moreno E., 1978. Guía para evitar problemas causados por hongos en semillas y granos almacenados. Instituto de biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 47 pp.
- Muntañola M., 1999. Guía de los hongos microscópicos. Ediciones Omega, S. A., Barcelona, España. 167 pp.
- National Academy of Sciences. 1987. Control de plagas de plantas y animales. Ediciones Ciencia y Técnica, S. A., México, D.F. 223 pp.
- Neergard, P., 1977. Seed pathology. First edition. Rev. ed. 1979. The Macmillan Press LTD. New York, E.U. 839 pp.
- Olavarría, J.M., 1991. Cuantificación de Micotoxinas en Granos y Derivados. Revista IPA La Platina. 67: 18-22.
- Ovalle, R. M. C., 2005. Efecto de sustancias húmicas de leonardita en el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), en invernadero. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Padrón, C. E., 2003. Diseños experimentales aplicados a la agricultura y ganadería. Editorial Trillas. México, D.F. 215 pp.
- Papavizas, G. C., and R. D. Lumsden., 1980. Biocal control of soil-borne fungal propagulos. Ann. Rev. Phytopathol. 18: 389-413.

- Papavizas, G. C., Lewis J. A. and Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Papavizas, G. C., 1985. *Trichoderma* and Gliocadium: Biology, Ecology and potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 23:23-54.
- Planes, S. y Carrero., 1995. *Plagas del campo*. 12ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 550 pp.
- Porta, C. J.; López-Acevedo, R. M. y Roquero L. C., 2003. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. 3ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 929 pp.
- Queitsch, J. y Dromundo G., 1998. Mercado interno de productos agroecológicos: Su importancia y necesario desarrollo. *Cuadernos Agroecológicos* 2: 46-51.
- Queitsch, J. y Dromundo, G., 1999. Introducción a la agricultura ecológica. *Cuadernos Agroecológicos*. Edición Especial No. 1. U. A. Ch. Montecillo, Edo. de México. p. 36-42.
- Romero, C. S., 1993. *Hongos fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo, Dirección General del Patronato Universitario. México, D.F., 347 pp.
- Schnitzer, M., 2000. Life Time Perspective on the Chemistry of Soil Organic Matter. D. L. Sparks (Ed.). *Advances in Agronomy*, Academic Press. 98: 3-58.
- Schnitzer, M. and Schulten, H. R., 1992. The analysis of soil organics matter by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Soil Sci. Soc. AM. J.* 56: 1811-1817.
- Schnitzer, M. and Schulten, H. R., 1995. Analysis of organic matter in soli extracts and whole soils by pyrolysis-mass spectrometry. Ed. D. L. Sparks. *Advances in Agromomy*, Academic Press. 55: 167-217.
- Smith, G. 1963. *Introducción a la micología industrial*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 443 pp.

- Smith, I. M., Dunez J., Lelliott, R. A., Phillips, D. H. y Archer S. A., 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 671 pp.
- Sosa-Moss, C, Perdomo, R. F., Brathwaite, W. D. C y Salazar, C. J. J., 1997. Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. México, D.F. 223 pp.
- Stephenson, G.A. and Solomon, K.R., 1993. Pesticides and the Environment. Department of Environmental Biology. University of Guelph. Ontario, Canada. p. 97-103.
- Stevenson, F., 1982. Chemistry: Genesis composition and pelation wilwx. New York. U.S.A. 12:34-44.
- Toledo, V. M., Carabias, J., Toledo, C. y González, P., C. 1993. La producción rural en México: alternativas ecológicas. Fundación Universo. UNAM. México, D.F. 223 pp.
- Vásquez, S. L. M. 2008. Impacto del tráfico internacional de semillas en la sustentabilidad de los agroecosistemas. Tecnologías sustentables en semillas. Eds. Ruiz, T. N. A. y Lira, S. R. H. Centro de Capacitación en Desarrollo y Tecnología de Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. p. 104-119.
- Warham, E. J., Butler, L. D., y Sutton, B. C. 1999. Ensayos para la semilla de maíz y trigo. Manual de laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo CIMMYT. México, D.F. 84 pp.
- Wells, H., Bell, D. and Jaworski, C. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. 62: 442-447.
- Wilson, H. K. y Richer A. C. 1969. Producción de cosechas. Editorial Continental, S. A. México, D.F. 411 pp.

Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 1061-1070.

Zulueta R., R., Vázquez T., V. y Hernández Q., A. (Eds.) 1995. Memorias del Primer Curso-Taller sobre Agricultura Orgánica. Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. 115 pp.