

Efectividad *in vitro* de fungicidas biológicos, químicos y alternativos contra *Botrytis cinerea* (Pers.) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.)

SANTIAGO-ELENA, Eduardo, GUERRERO-MORENO, Disraeli Eron, VILCHIS-ZIMUTA, Robert, MARTÍNEZ-CRUZ, Julieta, TREJO-TÉLLEZ, Libia Iris y LEYVA-MIR, Santos Gerardo

E. Santiago, D. Guerrero, R. Vilchis, J. Martínez, L. Trejo, S. Leyva

Universidad Autónoma Chapingo, Depto. de Preparatoria Agrícola. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230

Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230

riquelme_124@hotmail.com

F. Pérez, E. Figueroa, L. Godínez, R. Pérez (eds.) Ciencias de la Biología, Agronomía y Economía. Handbook T-II.- ©ECORFAN, Texcoco de Mora, México, 2017.

Abstract

The management of gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) requires a holistic approach through the application of alternative products, both of a biological and chemical nature. In this research, different concentrations of the following *B. cinerea* (pathogen isolated from strawberry fruits) controllers were evaluated: 1) phosphorous acid, 2) Trico-bio (*Trichoderma harzianum*), 3) Probac-bs (*Bacillus subtilis*), 4) Sportak (prochloraz); in addition to an absolute control. The biological controllers *T. harzianum* and *B. subtilis* had a lower control of *B. cinerea* than the chemicals phosphorous acid and prochloraz. With these last two products, all the doses evaluated controlled 100% *B. cinerea*. The results obtained here indicate that phosphorous acid (which generates phosphite) is a viable and environmentally friendly option for *B. cinerea* strawberry management.

3 Introducción

El cultivo de fresa es de gran importancia para nuestro país dado que genera una gran fuente de divisas y empleo, por ser un producto de exportación. SAGARPA (2008), reportó que en el año 2008, se tuvo una superficie cultivada de fresa de 6 mil 214 ha, obteniéndose una producción de 208 mil 932.25 t, por lo que alcanzó un rendimiento promedio de 33.86 t ha⁻¹.

Los principales estados productores de fresa son Baja California, Guanajuato, Estado de México y Michoacán; en esta última entidad se concentra la mayor producción nacional con una superficie cultivada de 3,215 ha y una producción superior a las 106,905 t.

Dentro del desarrollo del cultivo y hasta la formación de los frutos, se presentan muchas enfermedades en toda la planta, siendo el moho gris causado por *Botrytis cinerea* Pers., una de las más importantes, debido a los daños que provoca en flores y en consecuencia en el fruto (Rebollar, 2011). Por otra parte, el manejo de *B. cinerea* requiere de un enfoque integral por lo que la presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto de ácido fosforoso, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y Prochloraz a diferentes dosis, en el crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers., *in vitro*.

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Fase de campo

Colecta. Durante el mes de marzo de 2016 se realizó un muestreo dirigido, en una plantación de fresa de la variedad "Festival", ubicada en la comunidad de Guadalupe de Rivera (20° 36' 35" latitud norte y 101° 27' 41" longitud occidente), en el municipio de Irapuato, en el estado de Guanajuato. El muestreo consistió en la selección de diez plantas con frutos infectados por *B. cinerea*. Se extrajeron los frutos cuidadosamente, de tal forma que los frutos se mantuvieran intactos, para no dispersar las esporas.

3.1.2 Fase de laboratorio

El material colectado se procesó en el Laboratorio de Hongos Comestibles del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Los frutos se colocaron en un recipiente hermético y se rociaron de agua destilada, para que éstos esporularan y se mantuvieron a 15 °C, para su conservación.

3.1.3 Aislamiento, purificación e identificación de patógenos

Se observaron al microscopio óptico los frutos colectados y se seleccionaron los que presentaron un micelio grisáceo (moho gris) y la siembra se realizó en punta de hifa en cajas Petri en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Los aislamientos obtenidos se reaislaron y se purificaron tomando pequeños trozos de medio PDA con micelio que se colocaron en cajas con PDA para su desarrollo en condiciones asépticas (Dickinson y Lucas, 1987).

Para la identificación, se elaboraron preparaciones semipermanentes de micelio grisáceo mediante el método Muntañola (1999) para conidios. En la identificación, se utilizaron las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972).

3.1.4 Diseño de tratamientos y diseño experimental

Los controladores evaluados para el control de *B. cinerea* así como las concentraciones de éstos, se presentan en la Tabla 4.

Tabla 3 Tratamientos evaluados

Controlador	Principio Activo	Concentraciones evaluadas					
		Unidades	T1	T2	T3	T4	T5
Ácido fosforoso	Ácido fosforoso	mg 100 mL ⁻¹	0	500	700	1000	1200
Trico-bio	<i>Trichoderma harzianum</i>	mL 100 mL ⁻¹	0	0.50	0.75	1.00	1.25
Probac-bs	<i>Bacillus subtilis</i>	mL 100 mL ⁻¹	0	0.50	0.75	1.00	1.25
Sportak	Procloraz	mL 100 mL ⁻¹	0	0.50	0.75	1.00	1.25

Los tratamientos de la Tabla 3 fueron incorporados en 100 mL del medio de cultivo PDA. La concentración utilizada para la siembra del patógeno (*B. cinerea*) fue de 10⁶ propágulos mL⁻¹. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar, consto de 5 tratamientos incluyendo un testigo absoluto y 4 controladores fúngicos (Tabla 1). Cada tratamiento tuvo ocho repeticiones, donde la unidad experimental fue una caja Petri con la cepa de *Botrytis cinerea*. Las unidades experimentales se mantuvieron cada día con 3 h de luz blanca y a una temperatura de 25-28 °C, para favorecer la esporulación de los hongos.

3.1.5 Variables evaluadas

Como variable respuesta se consideró el porcentaje del área de la caja Petri que es cubierta por el crecimiento de *B. cinerea*. Las cajas Petri fueron observadas cada 24 h durante 15 días, se dio por concluido el ensayo cuando en el tratamiento testigo, el crecimiento del patógeno cubrió la totalidad de la superficie de la caja Petri (100%).

3.1.6 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizaron análisis de varianza y prueba de comparación de medias por Tukey ($P \leq 0.05$), usando el software SAS (SAS, 2011).

3.2 Resultados y Discusión

En la Tabla 3.1 se presentan las medias obtenidas de promediar las concentraciones evaluadas de cada uno de los controladores (fungicidas). Se observa que con los fungicidas químicos (procloraz y ácido fosforo), no existió germinación de ningún conidio. En el caso de los fungicidas biológicos *Bacillus subtilis* y *T. harzianum* se tuvo crecimiento de *B. cinerea* en 17.3 y 34.69% de la caja Petri. Por el contrario, en el tratamiento testigo no se observó control de *B. cinerea*.

Tabla 3.1 Comparación de medias de los datos de área ocupada por la colonia de *B. cinerea*, desarrollada en cajas Petri con PDA y diferentes dosis de fungicidas

Controlador (fungicida)	% Area de caja Petri ocupada por la colonia	% Control	Agrupación Tukey
Procloraz	00.00	100.0	D
Ácido fosforoso	00.00	100.0	D
<i>B. subtilis</i>	17.30	82.65	C
<i>T. harzianum</i>	34.69	65.30	B
Testigo	100.00	0.000	A

Con el uso procloraz (imidazoles), en todas las concentraciones evaluadas en este experimento, no hubo germinación de los conidios, es decir este fungicida controló en 100% a *B. cinerea* (Tabla 2). De acuerdo a De Biasoli *et al.* (1995) el modo de acción de este fungicida es la inhibición del citocromo P-450 a través de la inactivación de la enzima C-14- α demetilasa, lo que ocasiona la interrupción de la síntesis del ergosterol en la membrana celular y la acumulación de esteroides intermedios tóxicos. Estos dos últimos aspectos, incrementan la permeabilidad de la membrana e interrumpen el crecimiento del hongo. Adicionalmente, debido a la homogeneidad de las unidades experimentales y al control de las condiciones en las que se desarrolló este estudio, se tuvieron resultados muy positivos del procloraz en *B. cinerea*; sin embargo, éstos podrían reducir su magnitud al replicar esta investigación en campo; por lo que es conveniente realizar de manera previa pruebas *in vivo*.

De la misma manera, el ácido fosforoso, controló de manera efectiva la proliferación de *B. cinerea*; en todas las concentraciones de ácido fosforoso evaluadas, no se observó germinación de conidios (Tabla 2). La incorporación del ácido fosforoso en el medio de cultivo tuvo un efecto fungicida al restringir el crecimiento e inhibir la esporulación (Lobato *et al.*, 2007) y probablemente al mezclarse con algún elemento que constituye el medio de cultivo, produce un efecto antagónico para la germinación de esporas de *B. cinerea*; en este contexto, Thizy *et al.* (1997) reportaron que el ácido fosforoso al mezclarse con iones de metales alcalinos como el K, Ca, Mg y Na, produce fosfito, por ejemplo al combinarse con potasio puede formar fosfitos de potasio monobásico (KH_2PO_3) y dibásico (K_2HPO_3), que se caracterizan por ser altamente solubles en agua y en el caso de su aplicación a plantas superiores, presentan mayor movilidad que formas fosfatadas (PO_4), tanto en sentido ascendente como descendente es decir tanto de manera acropétala como basipétalmente (Rebollar, 2011).

Sin embargo debido a que los fosfonatos agrupan a todos aquellos fungicidas o sales derivadas del ácido fosforoso (fosetil-Al, ácido fosforoso, ácido fosfónico y fosfitos de potasio, entre otros), no se deben confundir el ácido fosfórico (H_3PO_4) con el ácido fosforoso (H_3PO_3). Es importante distinguir que es el ion fosfito (PO_3), es el que ejerce la acción contra los Hyphomycetes (*B. cinerea*) como lo indican Kofet *et al.* (2007), y no el fosfato (PO_4).

En el caso de los productos biológicos, éstos mostraron mejor efectividad en el control de *B. cinerea* que los fungicidas químicos. Entre los productos biológicos fue evidente que Probac-BS (*Bacillus subtilis*) tuvo mayor eficiencia que Trico-Bio (*Trichoderma harzianum*), al inhibir en mayor proporción el crecimiento de *B. cinerea*. Cabe destacar que *B. subtilis* colonizó las cajas Petri desde la periferia y hacia el centro, lo que ocasionó un crecimiento difuso de *B. cinerea*; asimismo este patrón de crecimiento de *B. subtilis* ocasiona una distribución en la caja Petri de los antibióticos que produce, éstos del tipo bacilysin e iturin, que son altamente fungitóxicos (Butt *et al.*, 1999). Adicionalmente a la producción de antibióticos, *B. subtilis* produce sideróforos, que son compuestos extracelulares de bajo peso molecular con una elevada afinidad por el ion hierro, con lo que también se inhibe la germinación de las esporas de los hongos patógenos.

Por otra parte, el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* tuvo un control moderado de *B. cinerea*; los resultados positivos de éste pueden deberse a diversos factores dentro de los que destacan la producción de metabolitos no volátiles (tricodermin y harzianopiridona) y enzimas hidrolíticas con actividad antifúngica que reducen el crecimiento e inhiben el desarrollo de *B. cinerea*, y destruyen las paredes celulares de los esclerocios o estructuras de resistencia del hongo (DEAQ, 2014). De manera adicional, la mayoría de las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como lagliotoxina (Brian, 1944) y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Kleifeld y Chet, 1992). Asimismo, en este estudio fue evidente el micoparasitismo que según Ulhoa (1996), consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista; en este fenómeno se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, α -1-3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas y conidios de Deuteromycetes, como en el caso de *B. cinerea*. Bajo condiciones de laboratorio empleando medio de cultivo con agar, *Trichoderma harzianum* se caracteriza por presentar tonos de color verde, verde-amarillentas, asimismo, algunos micelios presentan un olor a coco; estos aspectos son evidencia de micoparasitismo (Samuels, 1996), y fueron visibles en las cajas Petri en esta investigación.

En la evaluación de los resultados obtenidos, es importante tomar algunas consideraciones; por ejemplo, el tiempo de 24 h dado al hongo antagonista para que éste colonizara el medio después de la elaboración del medio. Otro factor sería la temperatura, Dennis y Webster (1971) reportan controles de un 70 a 80% por parte del antagonista hacia patógenos *in vitro*, cuando la temperatura de crecimiento es óptima (25 °C), si bien el rango de temperatura para el crecimiento oscila entre 15 y 35 °C. Por debajo o encima de este rango de temperatura, *Trichoderma* spp., se caracteriza por producir formas de resistencia, las cuales, es probable que haya producido en este estudio. Por otra parte, las condiciones de humedad adecuadas están en torno al 70%, valor registrado en las unidades experimentales debido a que no había pérdida de humedad por parte del medio de cultivo. Adicionalmente, las cajas Petri fueron expuestas a la luz, especialmente azul y la violeta, la cual promueve la formación de conidios, el crecimiento de micelio y la coloración (Domsch *et al.*, 1980), lo cual pudo comprobarse con la visualización de los medios.

3.3 Conclusiones

El ácido fosforoso, presentó en promedio, la misma eficacia en el control de *B. cinerea*, que el fungicida procloraz, por lo que se considera como una alternativa viable y efectiva para el manejo del hongo, misma que debe ser evaluada *in vivo*, tanto para estimar su acción fungicida como fitotoxicidad. Los productos biológicos *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* presentaron niveles moderados de control; particularmente a las dosis más alta evaluada (1.25 L100 mL⁻¹) debido a que como productos biológicos, dependen del crecimiento de UFC (unidades Formadoras de Colonias) para tener actividad fúngica, y se sugiere su evaluación *in vivo*.

3.4 Referencias

- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis, EEUU, Burgess. 241 p.
- Brian, P. W. (1944). Production of gliotoxin by *Trichoderma viridae*. *Nature*, 154, 667-668.
- Butt, T. M., Harris, J. G., & Powell, K. A. (1999). Microbial biopesticides: The European scene. En Hill. F. R. & Menn, J. J. Biopesticides (Eds.). *Methods in Biotechnology. Vol. 5, Biopesticides Use and Delivery* (pp.:23-44). Ed. Humana Pres, NJ., U. S. A.
- DEAQ. (2014). *Diccionario de Especialidades Agroquímicas*. Recuperado el 28 de julio de 2016, de: <http://www.agroquimicos-organicosplm.com>
- De Biasoli, G. D. A., De Weitz. C. D. S, & De Chandías, D. O. T. (1995). *Química Orgánica*. Editorial Kapelusz. Buenos Aires, Argentina. 475 p.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of Species-Groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 363-369.
- Dickinson, C. H. & Lucas, J. A. (1987). *Patología vegetal y patógenos de plantas*. Editorial Limusa S.A. México. 518 p.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press London. 859 p.
- Kleifeld, O. & Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*-interactions with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, 144, 267-272.
- Kofoet, A. & Fischer, K. (2007). Evaluation of plant resistance improvers to control *Peronospora destructor*, *P. parasitica*, *Bremia lactucae* and *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Plant Disease and Protection*, 114(2), 54-61.
- Lobato, M. C., Olovieri, F. P., Daleo, G., & Andreu, A. (2007). Efecto inhibitorio de compuestos fosfitos sobre el crecimiento de patógenos de papa *in vitro*. En *Memorias del XI Congreso Argentino de Microbiología*. Asociación Argentina de Microbiología. Córdoba, Argentina.
- Muntañola, M. (1999). *Guía de los hongos microscópicos*. Ed. Omega, Barcelona, España. 168 p.
- Rebollar, A. A. (2011). *Manejo de Mildiú y el Moho Gris de la Zorzamora en Michoacán*. Primera Edición. Universidad Autónoma Chapingo. Centro Regional Universitario de Occidente, Morelia Michoacán. 34 p.
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2008). Recuperado el 30 de julio de 2016, de: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/fresa.pdf.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biological and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100, 923-930.

SAS Institute Inc. (2011). *SAS/STAT Users Guide*. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.

Thizy, A. D., Pillon, J. C., Debourge, Lacroix, G. (1997). *Fungicidal compositions containing phosphorous acid and derivates thereof*. US Patent 4119724. Recuperado el 29 de julio de 2016, de: <https://www.google.tl/patents/US4075324>

Ulhoa, C. J. (1996). Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. En *V SINCONBIOL Simposio de Controle Biológico. Anais: Conferencias y palestras*. (pp. 234-238). Foz de Iguaçu-Parana-Brasil.