

**Efecto de cinco herbicidas en el crecimiento *in vitro* de los hongos *Fusarium* sp.,
Magnophorthe oryzae y *Trichoderma* sp.**

Luis José Calzada Manssur

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto de cinco herbicidas en el crecimiento *in vitro* de los hongos *Fusarium* sp.,
Magnophorthe oryzae y *Trichoderma* sp.**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Luis José Calzada Manssur

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Efecto de cinco herbicidas en el crecimiento *in vitro* de los hongos *Fusarium* sp., *Magnophorthe oryzae* y *Trichoderma* sp.

Luis José Calzada Manssur

Resumen: Los herbicidas son compuestos químicos para el control de malezas comúnmente usados en la producción. Además de su efecto en las malezas, ciertos herbicidas también pueden afectar la microflora benéfica como patógena en el cultivo que se aplica. En el caso particular de los hongos, los herbicidas generan cambios fisiológicos que pueden afectar características importantes de su desarrollo. En este estudio se evaluó el crecimiento del micelio y esporulación de tres hongos (*Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. y *Magnophorthe oryzae*) en dos medios de cultivo (agar-agua y agar-V8 acidificado) con diferente disponibilidad de nutrientes, para evaluar el efecto de dos dosis de cinco herbicidas (cyhalofop-butyl, oxifluorfen, pendimetalina, clomazone, y conglomerado de picloram y 2,4-D). En las dosis de herbicidas calculada en relación al volumen de aplicación, no hubo crecimiento ni esporulación de ninguno de los hongos utilizados. En la evaluación en relación al área de aplicación, todos los herbicidas afectaron el crecimiento y esporulación de los hongos en relación al testigo. El único herbicida que no afectó el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sp. fue pendimetalina, mientras que los hongos *Fusarium* sp. y *Magnophorthe oryzae* fueron afectados por todos los herbicidas. El estudio sugiere que la aplicación de herbicidas pre y pos emergentes pueden causar impactos transitorios o permanentes en la población de hongos cuando se usan a las dosis recomendadas.

Palabras clave: Crecimiento de micelio, esporulación, medios de cultivo.

Abstract: Herbicides are chemical compounds for the control of weeds commonly used in agriculture. In addition to its effect on weeds, certain herbicides can also affect the microflora in the crop that is applied. In the particular case of fungi, the herbicides could generate physiological changes that can affect important characteristics of their development. In this study, mycelium growth and sporulation of three fungi (*Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. and *Magnophorthe oryzae*) were evaluated in two culture media (water agar and V8 agar) with different nutrient availability, and two doses of five herbicides (cyhalofop-butyl, oxyfluorfen, pendimethalin, clomazone, and conglomerate of picloram and 2,4-D). In the doses of herbicides calculated in relation to the volume of application, there was no growth or sporulation of any of the fungi used. In the evaluation in relation to the area of application, all the herbicides affected growth and sporulation of the fungi when compared to the control. The only herbicide that did not affect growth and sporulation of *Trichoderma* sp. was pendimethalin, while *Fusarium* sp. and *Magnophorthe oryzae* were affected by all the herbicides used. The study suggests that the application of pre and post emergent herbicides can cause transient or permanent impacts on the fungal population when used at the recommended doses.

Key words: Culture media, mycelial growth, sporulation.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	21
5. RECOMENDACIONES.....	22
6. LITERATURA CITADA.....	23
7. ANEXOS	25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción y uso de cinco herbicidas selectivos para gramíneas.	3
2. Diluciones realizadas para los herbicidas.	4
3. Cálculo para dosificaciones de área y volumen en plato Petri.	5
4. Análisis estadístico del crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. en agar agua al tercer día después de siembra.	7
5. Análisis estadístico del crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. en agar V8 acidificado (AV8ac) al tercer día después de siembra	8
6. Análisis estadístico del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. en agar agua al quinto día después de la siembra.	8
7. Análisis estadístico del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. en agar V8 acidificado al quinto día después de la siembra.	9
8. Análisis estadístico del crecimiento de <i>Magnaporthe oryzae</i> ($\Delta asd4$) en agar agua al duodécimo día después de la siembra.	9
9. Análisis estadístico del crecimiento de <i>Magnaporthe oryzae</i> ($\Delta asd4$) en agar V8 acidificado al duodécimo día después de la siembra.	10
10. Análisis estadístico de la esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. en agar agua a los 14 días después de la siembra.	16
11. Análisis estadístico en esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. en AV8ac a los 14 días después de siembra.	17
12. Análisis estadístico en esporulación de <i>Fusarium</i> sp. en AA a los 26 días después de siembra.	17
13. Análisis estadístico en esporulación de <i>Fusarium</i> sp. en AV8ac a los 26 días después de siembra.	18
Figuras	
1. Efecto en crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. (3 días), <i>Fusarium</i> sp. (5 días) y <i>Magnaporthe oryzae</i> ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua con la adición de cyhalofop-butil.	11
2. Efecto en crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. (3 días), <i>Fusarium</i> sp. (5 días) y <i>Magnaporthe oryzae</i> ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificante con la adición del conglomerado picloram y 2,4-D.	12
3. Efecto en crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. (5 días) en agar agua y <i>Magnaporthe oryzae</i> ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificado con la adición de pendimetalina.	13

4. Efecto en crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. (5 días) y <i>Magnaporthe oryzae</i> (Δ asd4) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificado con la adición de clomazone.	14
5. Efecto en crecimiento de <i>Magnaporthe oryzae</i> (Δ asd4) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificado con la adición de oxifluorfen	15
6. Efecto en esporulación del conglomerado picloram y 2, 4-D en la esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. (12 días) y <i>Fusarium</i> sp. (26 días) en agar agua.	18
7. Efecto de pendimetalina en <i>Fusarium</i> sp. (26 días) en agar V8 acidificado.	19
8. Efecto de clomazone en la esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. (12 días) en agar agua.	20
9. Efecto de oxifluorfen en la esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. (12 días) y <i>Fusarium</i> sp. (26 días) en agar agua.	20

Anexos	Página
--------	--------

1. Protocolo para la elaboración de agar agua (AA).	25
2. Protocolo para la elaboración de agar verdura V8 acidificado (AV8ac).	25
3. Protocolo para siembra de hongos.	26
4. Protocolo para recolecta y conteo de esporas de hongos	27
5. Protocolo para el conteo de células con el hemocitómetro.	27
6. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de <i>Trichoderma</i> sp. al tercer día en AA.	28
7. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de <i>Trichoderma</i> sp. al tercer día en AV8ac.	28
8. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. al tercer día en AA.	29
9. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de <i>Trichoderma</i> sp. al tercer día en AV8ac.	29
10. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de <i>Fusarium</i> sp. al quinto día en AA.	30
11. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de <i>Fusarium</i> sp. al quinto día en AV8ac.	30
12. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de <i>Fusarium</i> sp. al quinto día en AA.	31
13. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de <i>Fusarium</i> sp. al quinto día en AV8ac.	31
14. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de <i>Magnaporthe oryzae</i> (Δ asd4) al duodécimo día en AA.	32
15. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de <i>Magnaporthe oryzae</i> (Δ asd4) al duodécimo día en en AV8ac	32
16. Conglomerado de fotografías del crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. (14 días) en AV8ac suplementado con los herbicidas evaluados.	33
17. Conglomerado de fotografías del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. (21 días) en AV8ac suplementado con los herbicidas evaluados.	33
18. Conglomerado de fotografías del crecimiento de <i>Magnaporthe oryzae</i> (Δ asd4) (32 días) en AV8ac suplementado con los herbicidas evaluados.	33

1. INTRODUCCIÓN

El uso de los plaguicidas o agroquímicos en la producción agrícola-alimentaria fue implementado en la década de los 60's y fue motivada en gran parte por la revolución verde. En la producción mundial de alimentos el uso de plaguicidas es excesivo, representando los herbicidas y los fungicidas, casi el 50% del consumo total de agroquímicos (Ongley 1997).

En la actualidad la producción mundial de arroz está aproximadamente en 750 millones de toneladas métricas y constituye uno de los cereales de mayor importancia alimenticia en el mundo (Ongley 1997). Las adversidades que enfrentan los productores de arroz hoy en día son: las abundantes malezas y el ataque severo de patógenos.

Al ser el arroz un cultivo extensivo requiere diversos tipos de protecciones. Una de las protecciones más comunes es la aplicación de herbicidas directamente al cultivo o al suelo de forma pre emergente y post emergente para el control de malezas (Pitty 2013).

Algunos de los herbicidas de amplio espectro, como el glifosato o el paraquat, generan efectos no deseados sobre hongos benéficos en el ambiente (Druille 2007), pero existen otros herbicidas de menor espectro que afectan el crecimiento y la esporulación de hongos patógenos (Mekwatanakarn y Sivasithamparam 1987).

Los hongos son organismos eucariotas que pertenece al reino fungi, forman un grupo polifacético y son parásitos o viven sobre materia orgánica en descomposición (Agrios 2011). Su alimentación se basa en la absorción de nutrientes mediante digestión externa para luego absorber las sustancias disueltas (osmotrofia) debido a la secreción de enzimas para la digestión. Así también, los hongos tienen la capacidad de descomponer la materia o tejido muerto de las plantas y cumplen un rol importante en los ciclos biogeoquímicos y agroecológicos (Pérez y Gardey 2010).

Los hongos patógenos generan excesivas pérdidas alimenticias, solo en producción las pérdidas están entre el 10 al 15% en países desarrollados y alrededor del 30% en países en vías de desarrollo (Gullino *et al.* 2011). En la producción de arroz el ataque de hongos es común en zonas con menores biotecnologías de protección contra patógenos. Una de las enfermedades más preocupantes en arroz es el tizón tardío (*Magnaporthe oryzae*) que afectan hojas y espigas. El hongo *Magnaporthe oryzae*, fue considerado en 2012 como el fitopatógeno más importante por sus efectos económicos y sociales en las producciones de arroz (Rodríguez 2016).

Existen otros patógenos también importantes que afectan al suelo como *Fusarium* sp., que causa pérdidas a una gran gama de cultivos. El género *Fusarium* es cosmopolita de suelo ya que la mayoría de sus especies son saprófitas (Agrios 2011); son complejos en su manejo

y generan un crecimiento fisiológico pobre, poco llenado del grano y en algunos casos pérdida total de la producción.

No todos los hongos son patógenos y destruyen al cultivo; existe una alta gama de hongos benéficos que mejoran las condiciones de las plantas. Muchos trabajan en simbiosis con la planta creando una ayuda mútua entre el hongo y el hospedero. Uno de los hongos benéficos saprófito más conocidos es *Trichoderma* sp. que actúa como antagonista de patógenos. El hongo se encuentra presente en la mayoría de los suelos y estimula crecimiento radicular en plantas; así también es capaz de colonizar las raíces y aumentar la resistencia del cultivo al ataque de patógenos (Agrios 2011).

- Este trabajo plantea los siguientes objetivos, evaluar el efecto de la aplicación de herbicidas pre y pos emergentes en las características de crecimiento y esporulación *in vitro* de hongos benéficos (*Trichodermas* sp.) y patógenos (*Magnaporthe oryzae* y *Fusarium* sp.), determinar el efecto de la dosificación de herbicidas en diferentes medios de cultivo con distintas cantidades de nutrientes y por ultimo analizar dos métodos de cálculo (área y volumen) para las dosificaciones de los herbicidas sobre las características de crecimiento y esporulación de los hongos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El ensayo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicado a 30 km de la carretera Tegucigalpa-Danlí, Honduras. El experimento consistió en determinar el efecto de cinco herbicidas en el crecimiento de hongos. Los hongos evaluados fueron: *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. y el mutante *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$).

La metodología en este proyecto se desarrolló usando protocolos proporcionados por el laboratorio que se encuentran en los anexos de este documento.

El ensayo consta de las siguientes partes:

- Diluciones de los herbicidas.
- Elaboración de dos tipos de medio de cultivo.
- Siembra de hongos en los medios de cultivos.
- Evaluación del crecimiento de hongos.
- Recolección y conteo de esporas.

A continuación, se explica detalladamente los procedimientos de cada uno de los segmentos del proyecto:

Diluciones de herbicidas. Los herbicidas utilizados para este experimento son selectivos para el cultivo de arroz y son aplicados en estadios pre emergente y post-emergente del cultivo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción y uso de cinco herbicidas selectivos para gramíneas.

Herbicida	Ingrediente activo	Tipo de uso	Modo de acción
Clincher 18 EC	Cyhalofop-butil	PoE	Inhibe la síntesis de ácidos grasos.
Flash 7,5 SL	Picloram y 2,4-D	PoE	Regula el crecimiento fisiológico de la planta.
Prowl 50 EC	Pendimetalina	PE	Interfiere en los procesos de mitosis en las plantas.
Clivus 48 EC,	Clomazone	PE	Inhibe la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa.
Galigan 24 EC	Oxifluorfen	PE	Regula el crecimiento fisiológico de la planta.

EC = concentrado emulsionable, SL = líquido soluble, PE = pre emergente, PoE = post emergente

Para determinar las dosis a utilizar *in vitro*, se analizaron dos escenarios:

- Área. Se determinó la cantidad del producto a aplicar en una hectárea en proporción al área del plato Petri (56.8 cm²) según la recomendación de la etiqueta (Cuadro 3).
- Volumen. Se determinó la cantidad de agua a utilizar por hectárea (200 L) y se ajustó la dosis recomendada según el volumen del medio en el plato Petri (20 mL) (Cuadro 3).

Se realizaron diluciones de los herbicidas para facilitar la dosificación y evitar sesgos en la elaboración de medios de cultivos utilizando el Cuadro 2, ya que el producto comercial tiene distintas concentración y dosificaciones por hectárea.

Cuadro 2. Diluciones realizadas para los herbicidas.

Tratamientos (Ingredientes activos)	Nombre comercial	Composición de la dilución (mL)	
		Agua destilada	Herbicida
Control	Agua destilada	50.0	0.0
Cyhalofop-butil	Clincher® 18 EC	40.0	10.0
Oxifluorfen	Galigan® 24 EC	30.0	20.0
Picloram y 2,4-D	Flash® 7,5 SL	40.0	10.0
Pendimetalina	Prowl® 50 EC	35.0	15.0
Clomazone	Clivus® 48 EC	42.5	7.5

EC = concentrado emulsionable, SL = líquido soluble, mL = mililitros

Medios de cultivos. Se utilizó agar agua (AA) por su baja cantidad de en nutrientes para inducir el crecimiento y la esporulación de hongos en condiciones desfavorables; y agar V8 acidificado (V8ac) por su alta cantidad de en nutrientes para inducir el crecimiento y esporulación de hongos en condiciones favorables. Para la elaboración de los medios de cultivo se siguieron los lineamientos provistos por el laboratorio (Anexo 1 y 2). Los medios fueron esterilizados a 121 °C por 45 minutos a una presión de 15 PSI y vertidos en cajas Petri (20 mL de medio por caja Petri).

El Cuadro 3 muestra los volúmenes utilizados según los cálculos de área y volumen para los experimentos realizados.

Cuadro 3. Cálculo para dosificaciones de área y volumen en plato Petri.

Herbicida	Concentración (g/L de producto comercial)	Dosis/ha (L)	μL de producto comercial/100 mL de medio de cultivo	
			Área	Volumen
Cyhalofop-butil	180	1.5	21.80	750
Oxifluorfen	240	1.5	10.90	750
Picloram y 2,4-D	75	4.0	58.00	2000
Pendimetalina	500	2.0	19.33	1000
Clomazone	480	1.2	23.20	600

g = gramos, L = litros, μL = microlitros, ha = hectáreas

Siembra de los explantes. Todos los hongos fueron sembrados en un medio de agar agua previo al experimento para que tengan las mismas condiciones de nutrientes al inicio del ensayo. Los platos Petri se mantuvieron a una temperatura de 22 °C con 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad hasta el final del experimento (Anexo 3).

Evaluación del crecimiento. La medición consiste en tomar el diámetro de crecimiento a cuatro intervalos consecutivos dependiendo de la velocidad de crecimiento del hongo. En el caso de *Trichoderma* sp., que es el hongo que más rápido crece, los datos del diámetro fueron evaluados en el día 2, 3, 4 y 5 después de la siembra. Para el hongo *Magnaporthe oryzae* (*Δasd4*), hongo de crecimiento más lento, fue evaluado en los días 7, 14, 21 y 28 posterior a la siembra y para *Fusarium* sp. el crecimiento se evaluó en los días 2, 5, 8 y 11 posterior a la siembra.

Recolecta y conteo de las esporas. Después de 12 días de la siembra en los medios de cultivo suplementados con herbicidas en el caso de *Trichoderma* sp. se procedió a la recolección y conteo de esporas. Para *Fusarium* sp. se esperaron 26 días para la recolección y conteo; y en el caso de *Magnaporthe oryzae* (*Δasd4*) por ser un mutante que no esporula, no se realizó conteo de esporas.

Diseño experimental y análisis estadísticos. El estudio consta de un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y el testigo; y se evaluaron tres especies de hongos en dos medios de cultivo (Cuadro 3). Se realizaron tres repeticiones independientes en el tiempo para el análisis estadístico.

Las variables a medir fueron el crecimiento del micelio en milímetros (mm) y la esporulación (esporas totales/plato). Con los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de probabilidad del ($P \leq 0.05$) y separación de medias Dunnett utilizando el programa estadístico Prism 7.

Para el análisis estadístico se tomó como parámetro el tiempo donde las diferencias en crecimiento fueron más drásticas respecto al control. Así para *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) se analizó el crecimiento a los 21 días, para *Fusarium* sp. a los cinco días y para *Trichoderma* sp. a los tres días después de la siembra en el respectivo tratamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de hongos.

En el ensayo de dosis relacionado al volumen de aplicación se observó que todos los hongos fueron afectados en el crecimiento y esporulación. A estas concentraciones los herbicidas son tóxicos para los hongos y ninguno sobrevivió.

En el análisis de dosis relacionado al área de aplicación (Cuadro 3) se presentaron los siguientes resultados:

Análisis de datos de crecimiento de hongos.

Herbicidas picloram, 2,4-D y cyhalofop-butil afectan el crecimiento *Trichoderma* sp. en agar agua (AA). Al tercer día de siembra de *Trichoderma* sp. en agar agua (AA) se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el crecimiento con los herbicidas cyhalofop-butil ($P=0.0001$) y el conglomerado de Picloram y 2,4-D ($P=0.0124$) en comparación con el control (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis estadístico del crecimiento de *Trichoderma* sp. en agar agua al tercer día después de siembra.

Tratamiento	Crecimiento en plato Petri (mm)		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	68a	38b	16.82 ± 42.51	0.0001 *
Oxifluorfen	68a	59a	$- 3.84 \pm 21.84$	0.2143 ns
Picloram y 2,4-D	68a	51b	3.49 ± 29.18	0.0124 *
Pendimetalina	68a	56a	$- 1.18 \pm 24.51$	0.0793 ns
Clomazone	68a	59a	$- 4.51 \pm 21.18$	0.2697 ns

^{*}, ^{ns} Significativo al $P < 0.05$ y no significativo. ^{ab} = las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Ausencia de efecto de los herbicidas en el crecimiento de *Trichoderma* sp. en agar V8 acidificado (AV8ac). Al tercer día de siembra de *Trichoderma* sp. en AV8ac no se encontró diferencia significativa en crecimiento en comparación con el control (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis estadístico del crecimiento de *Trichoderma* sp. en agar V8 acidificado (AV8ac) al tercer día después de siembra .

Tratamiento	Crecimiento en plato Petri (mm)		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butyl	49a	45a	-14.43 ± 22.43	0.9507 ns
Oxifluorfen	49a	49a	-18.43 ± 18.43	0.9999 ns
Picloram y 2,4-D	49a	46a	-15.10 ± 21.77	0.9760 ns
Pendimetalina	49a	40a	-9.10 ± 27.77	0.4768 ns
Clomazone	49a	31a	0.43 ± 36.43	0.0564 ns

^{ns} No significativo al P<0.05. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Herbicida cyhalofop-butyl afecta el crecimiento *Fusarium* sp. en AA. Al quinto día de siembra en el medio AA se encontró diferencia significativa solo con cyhalofop-butyl (P=0.0365) en comparación con el control (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis estadístico del crecimiento de *Fusarium* sp. en agar agua al quinto día después de la siembra.

TRT	Crecimiento en plato Petri (mm)		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butyl	50a	31b	1.10 ± 36.89	0.0365 *
Oxifluorfen	50a	39a	-6.50 ± 29.23	0.2883 ns
Picloram y 2,4-D	50a	42a	-9.89 ± 25.89	0.5835 ns
Pendimetalina	50a	37a	-4.89 ± 30.89	0.1906 ns
Clomazone	50a	41a	-8.89 ± 26.89	0.4825 ns

^{*}, ^{ns} Significativo al P<0.05 y no significativo. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Herbicidas pendimetalina y clomazone afectan el crecimiento de *Fusarium* sp. en AV8ac. En los tratamientos aplicados para *Fusarium* sp. en el medio AV8ac se encontraron datos significativos al quinto día (Cuadro 7) con los herbicidas pendimetalina (P=0.0163) y clomazone (P=0.0027).

Cuadro 7. Análisis estadístico del crecimiento de *Fusarium* sp. en agar V8 acidificado al quinto día después de la siembra.

TRT	Crecimiento en plato Petri (mm)		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	50a	45a	-7.07 ± 16.07	0.5893 ns
Oxifluorfen	50a	46a	-7.57 ± 15.57	0.6754 ns
Picloram y 2,4-D	50a	52a	-13.57 ± 9.57	0.9588 ns
Pendimetalina	50a	35b	3.42 ± 26.57	0.0163 *
Clomazone	50a	28b	9.93 ± 33.07	0.0027 *

* , ns Significativo al P<0.05 y no significativo. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Todos los herbicidas afectaron el crecimiento de *Magnaporthe oryzae* (Δ asd4) en AA. Al duodécimo primer día del ensayo con *M. oryzae* se encontró diferencia significativa en todos los tratamientos en comparación al control (Cuadro 8). Todos los tratamientos mostraron disminución significativa de crecimiento en AA.

Cuadro 8. Análisis estadístico del crecimiento de *Magnaporthe oryzae* (Δ asd4) en agar agua al duodécimo día después de la siembra.

TRT	Crecimiento en plato Petri (mm)		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	25a	8b	10.09 ± 22.58	0.0001 *
Oxifluorfen	25a	16b	2.75 ± 15.24	0.0052 *
Picloram y 2,4-D	25a	16b	2.42 ± 14.91	0.0068 *
Pendimetalina	25a	17b	1.09 ± 13.58	0.0204 *
Clomazone	25a	14b	4.09 ± 16.58	0.0018 *

* Significativo al P<0.05. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Cyhalofop-butil no mostró efecto en crecimiento en AV8ac con *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$). A los 21 días se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos, exceptuando en cyhalofop-butil (Cuadro 9). Importante, los herbicidas pendimetalina, clomazone y el conglomerado de picloram y 2,4-D provocaron un aumento en el crecimiento en relación con el control en el medio con mayor cantidad de nutrientes.

Cuadro 9. Análisis estadístico del crecimiento de *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) en agar V8 acidificado al duodécimo día después de la siembra.

TRT	Crecimiento en plato Petri (mm)		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	52a	50a	-3.13 ± 7.80	0.6222 ns
Oxifluorfen	52a	28b	19.20 ± 30.14	0.0001 *
Picloram y 2,4-D	52a	61b	-14.14 ± - 3.19	0.0026 *
Pendimetalina	52a	60b	-13.14 ± - 2.19	0.0064 *
Clomazone	52a	58b	-11.47 ± - 0.52	0.0305 *

*, ns Significativo al $P < 0.05$ y no significativo. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Discusión de datos de crecimiento de hongos.

Efecto de cyhalofop-butil en el crecimiento de los hongos. El herbicida actúa inhibiendo la coenzima A carboxilasa afectando la síntesis de lípidos (Acuña 2000). Se registró el efecto en los tres hongos evaluados en el medio con menor cantidad de nutrientes (AA). Los hongos al estar en un medio con poca cantidad de nutrientes utilizan sus propias reservas de nutrientes y ácidos grasos para el crecimiento del micelio (Figura 1).

La razón por la cual el crecimiento es inferior al control se basa en la interferencia en el catabolismo de ácidos grasos del hongo. El efecto del herbicida fue más evidente en *M. oryzae* (Cuadro 8) en comparación con *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. (Cuadros 6 y 4).

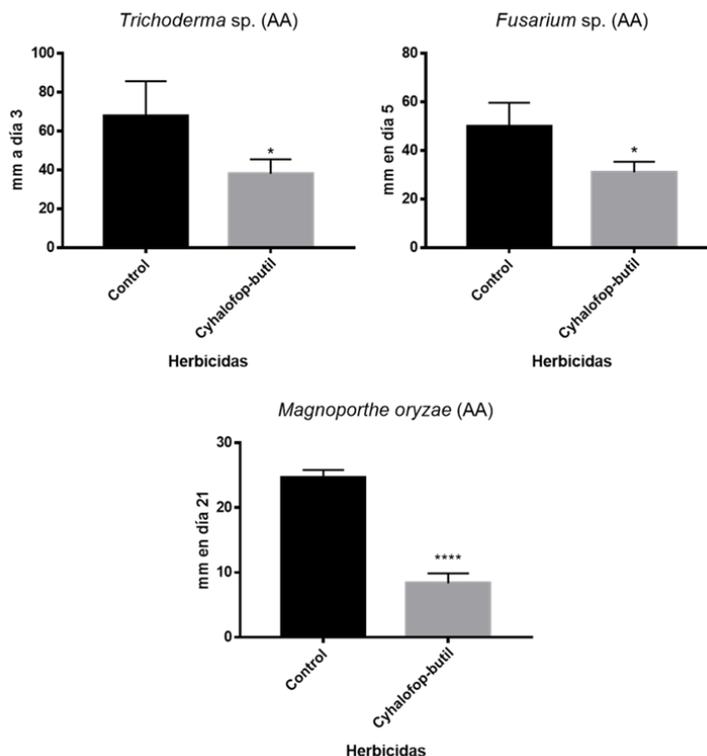


Figura 1. Efecto en crecimiento de *Trichoderma* sp. (3 días), *Fusarium* sp. (5 días) y *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua con la adición de cyhalofop-butil.

Efecto del herbicida conglomerado picloram y 2, 4-D en el crecimiento de los hongos.

El conglomerado inhibe la producción del ácido indolacético (AIA) en las plantas (Acuña 2000). Se ha comprobado que *Trichoderma* sp. produce pequeñas cantidades de AIA (Sanchez *et al.* 2005); picloram y 2, 4-D no solo afectaron a *Trichoderma* sp., pero también a *M. oryzae* ($\Delta asd4$) lo que sugiere que AIA es importante en el metabolismo de estos hongos.

En contraste, se observó un aumento significativo del crecimiento de *M. oryzae* ($\Delta asd4$) en medio AV8ac. Este crecimiento podría estar asociado a la modificación genéticamente del hongo (Anexo 15). El gen $\Delta asd4$ actúa como un sensor de la cantidad de nitrógeno en el interior de la célula a través del mecanismo de traducción dirigido por el “Target of Rapamycin” (TOR). El gen $\Delta asd4$ afecta directamente el balance celular del aminoácido glutamina, ya que aumenta los niveles de glutamina en las células (Marroquín-Guzmán y Wilson 2015). La glutamina es el principal regulador de nitrógeno en las células y a la vez un antagonista de TOR. Al estar el AIA relacionado con el metabolismo del hongo se observó cómo la inhibición de AIA contribuyó favorablemente al crecimiento del hongo (Figura 2).

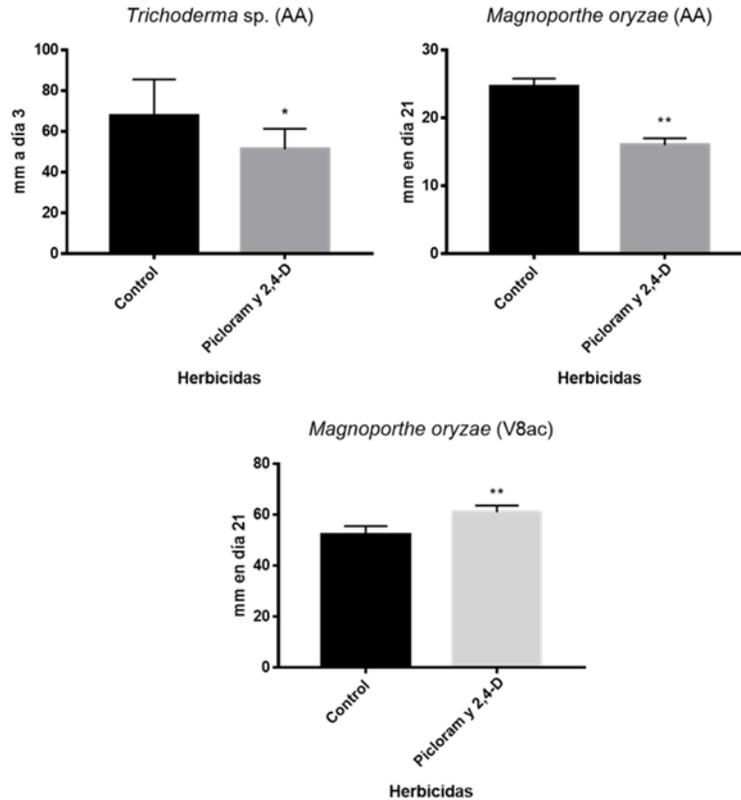


Figura 2. Efecto en crecimiento de *Trichoderma* sp. (3 días), *Fusarium* sp. (5 días) y *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificante con la adición del conglomerado picloram y 2,4-D.

Efecto de pendimetalina en el crecimiento de los hongos. El modo de acción de pendimetalina consiste en ejercer una inhibición de la polimerización de la tubulina del ensamblaje de microtúbulos afectando la división celular en las plantas (Acuña 2000). En el caso de *Trichoderma* sp. no se ve afectada en AA y AV8ac. Esto debido a que el hongo crece de forma acelerada y la mitosis no es afectada por el modo de acción del herbicida.

En contraste *Fusarium* sp. y *M. oryzae* ($\Delta asd4$), que son los hongos que crecen de forma lenta, se observaron diferencias significativas en crecimiento del micelio en comparación al control (Figura 3). Para *Fusarium* sp. se observó el efecto en AV8ac y en el caso de *M. oryzae* ($\Delta asd4$) se observó aumento en AV8ac y disminución en AA del crecimiento. Según Raghavendra y Gundappagol (2017), los herbicidas de pre emergencia provocan un aumento en la población de hongos en los ensayos con pendimetalina.

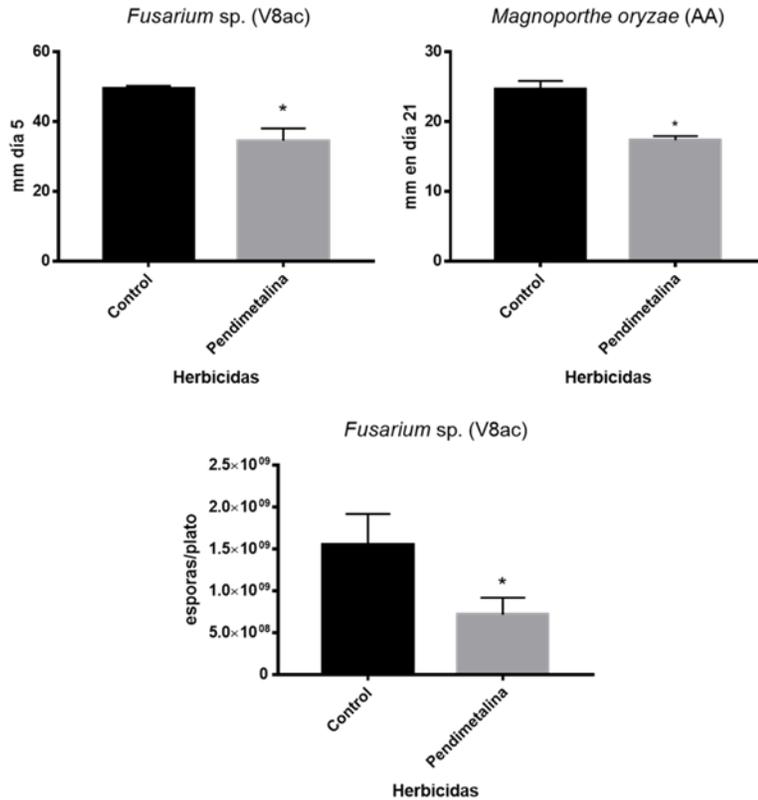


Figura 3. Efecto en crecimiento de *Fusarium* sp. (5 días) en agar agua y *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificado con la adición de pendimetalina.

Efecto de clomazone en el crecimiento de *Fusarium* sp. y *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$).

Clomazone es un herbicida que interfiere en la síntesis de tifol, carotenoides y del aminoácido histidina (Acuña 2000). Los hongos pueden metabolizar el herbicida clomazone (Liu *et al.* 1996), afectando el metabolismo de histidina. Por lo tanto, el efecto en el crecimiento de los hongos *Fusarium* sp. en el medio rico con nutrientes y *M. oryzae* en los dos tipos de medios (Figura 4) fueron posiblemente afectados en la síntesis de histidina alterando su crecimiento.

El patógeno *M. oryzae* ($\Delta asd4$) en el medio con exceso de nutrientes se notó un crecimiento significativo. El herbicida promovió el crecimiento posiblemente porque el hongo ha sido genéticamente modificado en su metabolismo.

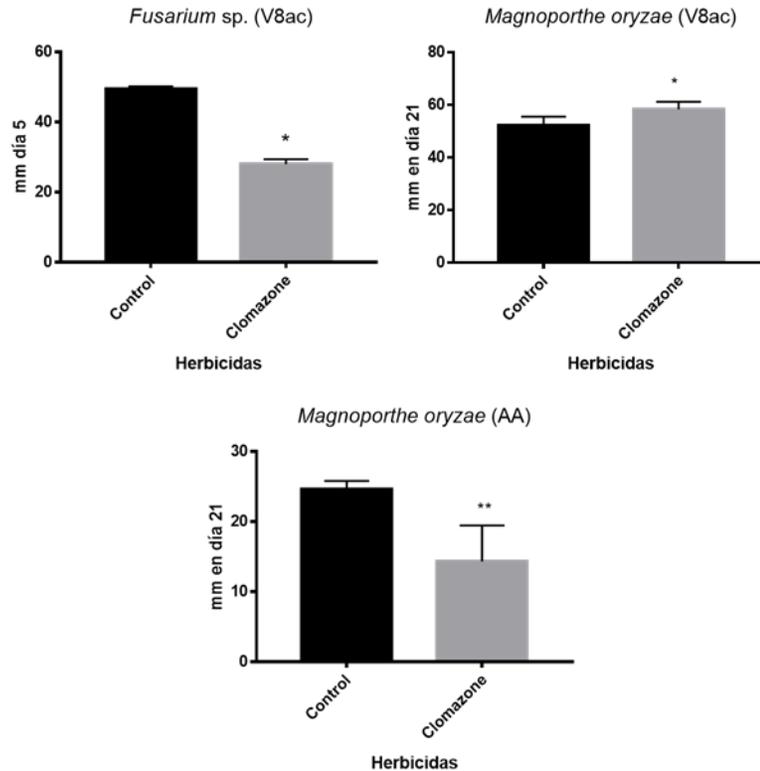


Figura 4. Efecto en crecimiento de *Fusarium sp.* (5 días) y *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificado con la adición de clomazone.

Efecto de herbicida oxifluorfen en crecimiento de *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$). El oxifluorfen es un herbicida específico para las plantas (Acuña 2000), siendo su modo de acción la inhibición de la enzima protoporfirinogeno-9-oxidasa, conllevando a la degradación de la membrana celular en las plantas.

El hongo *M. oryzae* ($\Delta asd4$) fue el único afectado en el crecimiento por el efecto con oxifluorfen (Figura 5). Según el estudio de Raghavendra y Gundappagol (2017), este herbicida genera un impacto negativo a las poblaciones de hongos en general. Aún no se ha estudiado el origen del efecto de oxifluorfen en las poblaciones de hongos.

En la Figura 5 se observa que *M. oryzae* en AA en el crecimiento generó diferencias significativas (Cuadro 8), aunque *M. oryzae* en el AV8ac obtuvo mayor diferencia significativa en comparación al control.

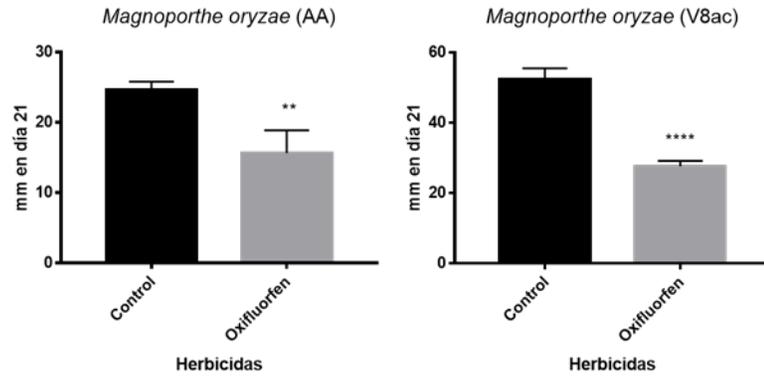


Figura 5. Efecto en crecimiento de *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) (21 días) en agar agua y agar V8 acidificado con la adición de oxifluorfen

Esporulación de hongos.

Conteo de las esporas en hongos. Para la evaluación de los datos de la cantidad de esporas por plato Petri solo se analizaron dos de los tres hongos (*Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp.). No se evaluó al hongo *M. oryzae* ($\Delta asd4$) ya que no produce esporas.

Análisis de datos de esporulación de hongos

Herbicidas oxifluorfen, clomazone, picloram y 2,4-D afectan la esporulación de *Trichoderma* sp. en AA. A los 14 días de siembra en el medio AA se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con tres herbicidas a comparación al control (Cuadro 10). Los herbicidas que mostraron efecto significativo para la variable fueron oxifluorfen ($P=0.0027$), clomazone ($P=0.0001$) y el conglomerado de picloram y 2,4-D ($P=0.0001$).

Cuadro 10. Análisis estadístico de la esporulación de *Trichoderma* sp. en agar agua a los 14 días después de la siembra.

TRT	Cantidad de esporas por plato		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Petri Tratamiento		
Cyhalofop-butil	1.32E+07a	1.24E+07a	2.21E+06 ± 1.41E+04	0.8985 ns
Oxifluorfen	1.32E+07a	8.42E+06b	1.74E+06 ± 7.76E+06	0.0027 *
Picloram y 2,4-D	1.32E+07a	2.45E+06b	7.71E+06 ± 1.37E+07	0.0001 *
Pendimetalina	1.32E+07a	1.41E+07a	-3.98E+06 ± 2.05E+06	0.8160 ns
Clomazone	1.32E+07a	4.28E+06b	5.87E+06 ± 1.19E+07	0.0001 *

*, ns Significativo al $P < 0.05$ y no significativo. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Ausencia de efecto de herbicidas en esporulación de *Trichoderma* sp. en AV8ac. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los tratamientos en esporulación de AV8ac (Cuadro 11); se observó el mismo efecto que en el ensayo de crecimiento en AV8ac de *Trichoderma* sp. (Cuadro 5).

Cuadro 11. Análisis estadístico en esporulación de *Trichoderma* sp. en AV8ac a los 14 días después de siembra.

TRT	Cantidad de esporas por plato Petri		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	1.778E+09a	1.361E+09a	-1.63E+09 ± 2.47E+09	0.9615 ns
Oxifluorfen	1.778E+09a	1.043E+09a	-1.31E+09 ± 2.78E+09	0.7498 ns
Picloram y 2,4-D	1.778E+09a	1.196E+09a	-1.47E+09 ± 2.63E+09	0.8730 ns
Pendimetalina	1.778E+09a	1.361E+09a	-1.63E+09 ± 2.47E+09	0.9615 ns
Clomazone	1.778E+09a	1.333E+09a	-1.60E+09 ± 2.49E+09	0.9507 ns

^{ns} No significativo al $P < 0.05$. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Herbicidas cyhalofop-butil, oxifluorfen, picloram y 2,4-D afectan la esporulación de *Fusarium* sp. en AA. En los 26 días desde la siembra del hongo en AA se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en tres tratamientos con herbicidas (Cuadro 12). Los herbicidas que presentaron las diferencias significativas son cyhalofop-butil ($P=0.0419$), oxifluorfen ($P=0.0266$) y el conglomerado de picloram y 2,4-D ($P=0.0068$).

Cuadro 12. Análisis estadístico en esporulación de *Fusarium* sp. en AA a los 26 días después de siembra.

TRT	Cantidad de esporas por plato Petri		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	6.22E+08a	4.28E+08b	6.50E+06 ± 3.83E+08	0.0419 *
Oxifluorfen	6.22E+08a	4.11E+08b	2.32E+07 ± 4.00E+08	0.0266 *
Picloram y 2,4-D	6.22E+08a	3.61E+08b	7.32E+07 ± 4.50E+08	0.0068 *
Pendimetalina	6.22E+08a	5.11E+08a	-7.72E+07 ± 2.99E+08	0.3456 ns
Clomazone	6.22E+08a	5.44E+08a	-1.10E+08 ± 2.66E+08	0.6449 ns

^{*, ns} Significativo al $P < 0.05$ y no significativo. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Herbicida pendimetalina afecta la esporulación de *Fusarium* sp. en AV8ac. A los 26 días después de la siembra en AV8ac se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en Pendimetalina ($P=0.0098$) en *Fusarium* sp. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis estadístico en esporulación de *Fusarium* sp. en AV8ac a los 26 días después de siembra.

TRT	Cantidad de esporas por plato Petri		Intervalo confianza al 95%	Valor P
	Control	Tratamiento		
Cyhalofop-butil	1.55E+09a	9.90E+08a	-7.24E+07 ± 1.19E+09	0.0889 ns
Oxifluorfen	1.55E+09a	1.26E+09a	-3.39E+08 ± 9.26E+08	0.5525 ns
Picloram y 2,4-D	1.55E+09a	1.63E+09a	-7.09E+08 ± 5.56E+08	0.9958 ns
Pendimetalina	1.55E+09a	7.16E+08b	2.01E+08 ± 1.47E+09	0.0098 *
Clomazone	1.55E+09a	9.72E+08a	-5.47E+07 ± 1.21E+09	0.0774 ns

*, ns Significativo al $P < 0.05$ y no significativo. ^{ab}= las medias que no comparten una letra en la línea son significativamente diferentes.

Discusión de datos de esporulación de hongos.

Efecto del conglomerado picloram y 2, 4-D en la esporulación de *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. La producción de AIA es importante para el crecimiento de los hongos, en especial *Trichoderma* sp. (Sánchez *et al.* 2005). El conglomerado de herbicidas picloram y 2, 4-D inhiben la producción de AIA. En *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. se observó un disminución significativa en la cantidad de esporas a comparación del control (Figura 6).

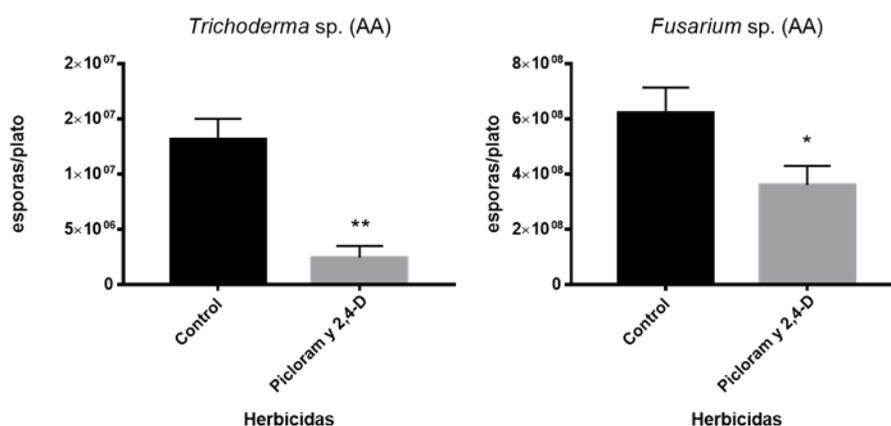


Figura 6. Efecto en esporulación del conglomerado picloram y 2, 4-D en la esporulación de *Trichoderma* sp. (12 días) y *Fusarium* sp. (26 días) en agar agua.

Efecto de pendimetalina en la esporulación de *Fusarium* sp. Al ser pendimetalina un herbicida que afecta la división celular (mitosis) (Acuña 2000). Se observó que la influencia del herbicida fue solo para el patógeno de *Fusarium* sp. en un ambiente con alto contenido de nutrientes (Figura 7). Pendimetalina fue el único herbicida que generó efecto significativo en la esporulación del hongo en el medio AV8ac (Anexo 13). Esto debido a que el hongo al estar en un ambiente abundante de nutrientes disminuye la capacidad de realizar mitosis.

Se observó que el herbicida pendimetalina no generó efecto en *Trichoderma* sp. en ninguno de los medios de cultivos. Esto debido a que pendimetalina no afecta a los hongos de metabolismo rápido, ya que *Trichoderma* sp. es el hongo de crecimiento más acelerado.

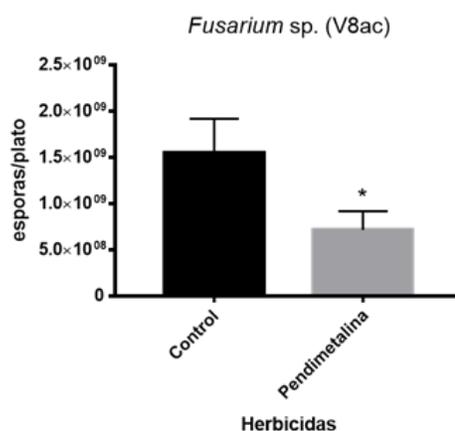


Figura 7. Efecto de pendimetalina en *Fusarium* sp. (26 días) en agar V8 acidificado.

Efecto de clomazone en la esporulación de *Trichoderma* sp. La síntesis del aminoácido histidina es necesaria en la cantidad de esporas en *Trichoderma* sp. Al ser el clomazone un herbicida inhibidor de este aminoácido (Liu *et al.* 1996) se demuestra en la figura 8, como limitada la cantidad de esporas producidas (Cuadro 10).

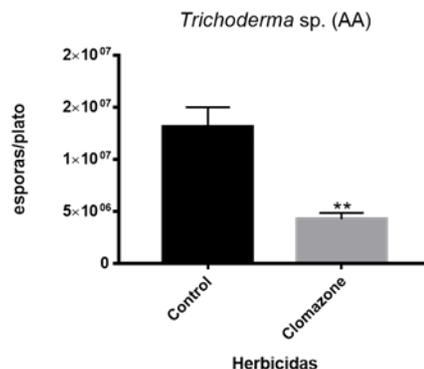


Figura 8. Efecto de clomazone en la esporulación de *Trichoderma sp.* (12 días) en agar agua.

Efecto de oxifluorfen en la esporulación de *Trichoderma sp.* y *Fusarium sp.* Al ser oxifluorfen un herbicida específico para las plantas con un modo de acción que se enfoca en la inhibición de la enzima protoporfirinogeno-9-oxidas (Acuña 2000). Este modo de acción no se ha relacionado con los hongos evaluados, sin embargo, el estudio de Raghavendra y Gundappagol (2017), este herbicida generó decrecimiento en las poblaciones de hongos en general. En la actualidad no se ha descifrado el origen del efecto de oxifluorfen en las poblaciones de hongos (Figura 9). En la Figura 9, *Trichoderma sp.* y *Fusarium sp.* obtuvieron el mismo grado de significancia estadística (Cuadro 10 y 12)

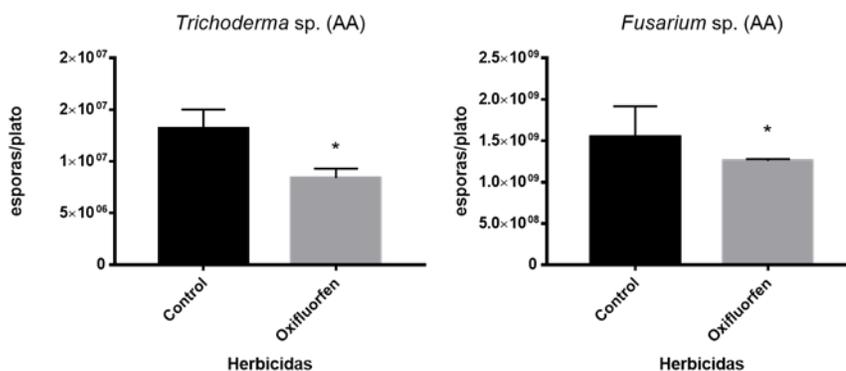


Figura 9. Efecto de oxifluorfen en la esporulación de *Trichoderma sp.* (12 días) y *Fusarium sp.* (26 días) en agar agua.

4. CONCLUSIONES

- Las dosificaciones calculadas en relación al volumen generaron efectos tóxicos para el crecimiento y esporulación de todos los hongos evaluados.
- Los herbicidas generaron mayor impacto en crecimiento y esporulación en los medios con menor cantidad de nutrientes y obtuvieron menor impacto en el medio con mayor cantidad de nutrientes.
- El herbicida cyhalofop-butil generó el mayor impacto en el crecimiento de micelio de los hongos evaluados. En el caso de *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. y *Magnaporthe oryzae* (*Dasd4*) se vio reflejado en el medio con baja cantidad de nutrientes (AA). Este herbicida también generó un efecto significativo en la esporulación del hongo *Trichoderma* sp.

5. RECOMENDACIONES

- Proveer el tiempo residual estimado por la etiqueta del herbicida para posteriormente realizar enmiendas biológicas con microorganismos (*Trichoderma* sp.) en el suelo, de esta forma aseguramos la viabilidad de las enmiendas biológicas.
- Tener conciencia sobre los efectos adversos que podrían causar aplicaciones con herbicidas en la microbiota del suelo.
- Realizar ensayos en el campo con el fin de evaluar y comparar de los efectos observados en el laboratorio.

6. LITERATURA CITADA

- Acuña A. 2000. Uso de herbicidas [Internet]. Costa Rica: MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). [consultado 2018 jul 10]. http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/h60-7190_anexo1.pdf
- Agrios G. 2011. Plant Pathology. 5th ed. Gainesville (Estados Unidos de America): Limusa – Grupo, Noriega. 54–194 p.
- Druille M. 2007. Efectos directos e indirectos del herbicida glifosato sobre los hongos micorrícicos arbusculares en pastizales de la Pampa Deprimida [tesis]. Universidad de Buenos Aires (Argentina).135 p.
- Gullino L, Bonants M, Murray P. 2011. Plant Pathology in the 21st Century; Detection and Diagnostics of Plant Pathogens. 5th ed. Londres (Reino Unido): Springer. 85–90 p.
- Liu S, Shocken M, Rosazza J. 1996. Transformación Microbial de Clomazone [Internet]. Iowa (Estados Unidos de america). FAO (Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y Agricultura). [consultado 2018 jul 25]. http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=E26AD6B3FF7708802E1336BA7DBA394B?request_locale=ru&recordID=US1997053903&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField
- Marroquín-Guzmán M, Wilson R. 2015. GATA-Dependent Glutaminolysis Drives Appressorium Formation in *Magnaporthe oryzae* by Suppressing TOR Inhibition of CAMP/PKA Signaling. *PLoS Pathog.* 11(4): e1004851. doi:10.1371/journal.ppat.1004851.
- Metwatanakara P, Sivasithamparam K. 1987. Effect of certain herbicides on soil microbial populations and their influence on saprophytic growth in soil and pathogenicity of take-all fungus. *Biology and Fertility of Soils*: 5175–180 p.
- Ongley E. 1997. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos [internet]. Burlington (Canadá): FAO (Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y Agricultura); [consultado 2017 oct 2]. <http://www.fao.org/docrep/003/w2612s/w2612s06.htm>.
- Pérez J, Gardey A. 2010. Definición de Hongos [internet]. Definición de; [consultado 2018 jul 10]. <https://definicion.de/hongos/>

- Pitty, A. 1997. Introducción a la Biología. Ecología y Manejo de Malezas. 6th ed. San Antonio de Oriente (Honduras): Zamorano Academic Press. 6:203-223 p.
- Raghvendra K, Gundappagol R. 2017. Effect of herbicides on soil microcosm, nodulation and yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Journal of pharmacognosy and phytochemistry. 6(5): 1649-1655 p.
- Rodríguez J. 2016. *Magnaporthe oryzae*, un hongo de difícil control y de efectos devastadores en nuestros cultivos de arroz [internet]. Madrid (España): UPM (Universidad Politécnica de Madrid); [consultado 2018 oct 7]. <http://www.interempresas.net/Grandes-cultivos/Articulos/158284-Magnaporthe-oryzae-hongo-dificil-control-efectos-devastadores-nuestros-cultivos-arroz.html>.
- Sánchez J, Valencia H, Valero N. 2005. Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo El Granizo [tesis]. Universidad Nacional de Colombia. 51 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la elaboración de agar agua (AA).

El protocolo está diseñado para elaborar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 15 g de bacto-agar
2. Añadir 990 mL de agua destilada
3. Autoclavar (121 °C, 45 min, 15 PSI)

Anexo 2. Protocolo para la elaboración de agar verdura V8 acidificado (AV8ac).

El protocolo está diseñado para elaborar un litro de medio de cultivo.

1. Añadir 150 mL de jugo de verdura V8 Campbell Soup Company
2. Pesar 3 g de carbonato de calcio
3. Añadir 790 mL de agua destilada
4. Mezclar
5. Pesar 15 g de bacto-agar
6. Autoclavar (121 °C, 45 min, 15 PSI)
7. Añadir 10 mL de ácido tartárico después del autoclavado

Anexo 3. Protocolo para siembra de hongos.

Es importante trabajar con orden y realizando el menor movimiento posible dentro de la cámara de flujo laminar (movimientos sutiles). Evitar objetos que obstruyan el flujo del aire en el área donde se está trabajando, así como el uso de joyas o cualquier otro accesorio que interfiera con la inocuidad y el movimiento sutil de las manos.

1. Apagar el aire acondicionado para evitar la turbulencia en la cámara de flujo laminar.
2. Seleccionar el hongo para la siembra.
3. Encender y preparar la cámara de flujo laminar: limpiar y desinfectar con alcohol al 70% (para mayor información encontrar la guía al lado derecho de la cámara).
4. Seleccionar los medios de cultivos que se utilizarán y colocarlos en la cámara de flujo laminar. Dejarlos reposar alrededor 10 min antes de la siembra y quitar el agua que se condensó en la tapa de los platos.
5. Preparar los materiales: bisturí, mechero, fósforos, parafina, contenedor para sostener el bisturí desinfectado y contenedor con alcohol para desinfectar al 95%.
6. Desinfectar el bisturí con alcohol al 95%.
 - a) Llevar el bisturí sobre la llama del mechero para flamearlo.
 - b) Desinfectarlo con alcohol al 95%.
 - c) Repetir a y b nuevamente.
 - d) Dejarlo reposar para que se seque y enfríe.
7. Para la siembra es importante seleccionar el borde del hongo con hifas jóvenes. Realizar un corte pequeño cuadrangular y sembrarlo en el centro del plato con la parte de las hifas en contacto con el medio.
8. Observación: hacer movimientos sutiles porque se puede crear contaminaciones por migración de esporas.
9. Dejar reposar los platos abiertos alrededor de 10 minutos para eliminar el exceso de humedad y condensación de la muestra y el plato.
10. Sellar con parafina los platos, rotularlos y colocarlos en los contenedores de crecimiento.
11. Limpiar (quitando los residuos de medios de cultivo u hongos del bisturí), desinfectar y depositar los materiales utilizados en su lugar.
12. Apagar la cámara de flujo laminar.

Anexo 4. Protocolo para recolecta y conteo de esporas de hongos

1. Colocar 2 mL de agua destilada estéril sobre el hongo en el plato Petri.
2. Hacer un raspado con un portaobjetos hasta coleccionar todas las esporas.
3. Tamizar el líquido obtenido usando una tela (cheescloth grado 90) estéril sobre un tubo Falcon de 50 mL para separar el micelio y las esporas.
4. Realizar el conteo usando el hemocitómetro (ver protocolo para conteo de esporas usando el hemocitómetro). Transferir 10 µL de la suspensión de células a los 2 espacios entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (la muestra subirá a la cámara por capilaridad). Se deben observar al menos de 40-50 esporas por cuadro.

Nota: si la concentración de las esporas es muy alta, se recomienda hacer una dilución de 1:100 (1 mL de agua destilada estéril con 10 µL de muestra).

Anexo 5. Protocolo para el conteo de células con el hemocitómetro.

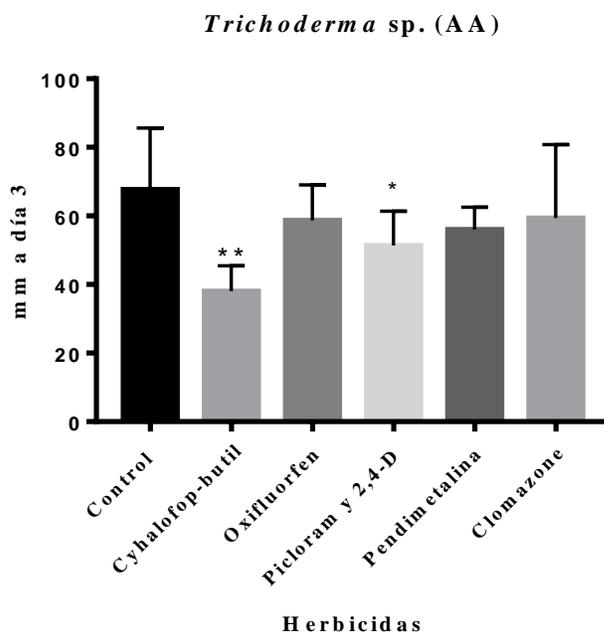
1. Preparar los materiales: microscopio, cubreobjetos, pipetas, tips, muestras de la suspensión del cultivo.
2. Tomar el hemocitómetro y colocar un cubreobjetos en la parte superior.
3. Colocar 10 µL de la suspensión de células en los 2 espacios entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (la muestra subirá a la cámara por capilaridad).
4. Observar en el microscopio. Identificar el primer cuadrado grande en 10x y orientarse hacia los pequeños del centro en 40x.
5. Elegir qué celdas se van a contar dependiendo del tamaño de las células.
6. Observar: número de células vivas, número de células muertas (en el caso de la mayoría de células, la cantidad de células muertas es 0), número de cuadrados contados, volumen inicial (mL), factor de dilución y verificar si los cuadros contados fueron grandes o pequeños.
7. Si desea realizar el cálculo manual use la siguiente fórmula para determinar la densidad de células.

- Cuadrados del centro

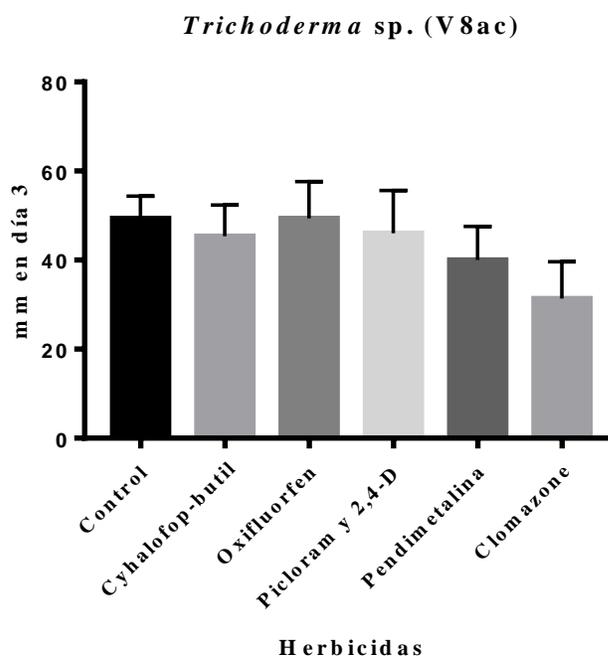
$$\text{Densidad de células} = \frac{\text{Promedio de células de los 25 cuadros contados} \times \text{factor de dilución}}{0.000004 \text{ mL}} = \text{células/ mL}$$

8. Retirar el cubreobjetos y limpiar con alcohol el hemocitómetro.

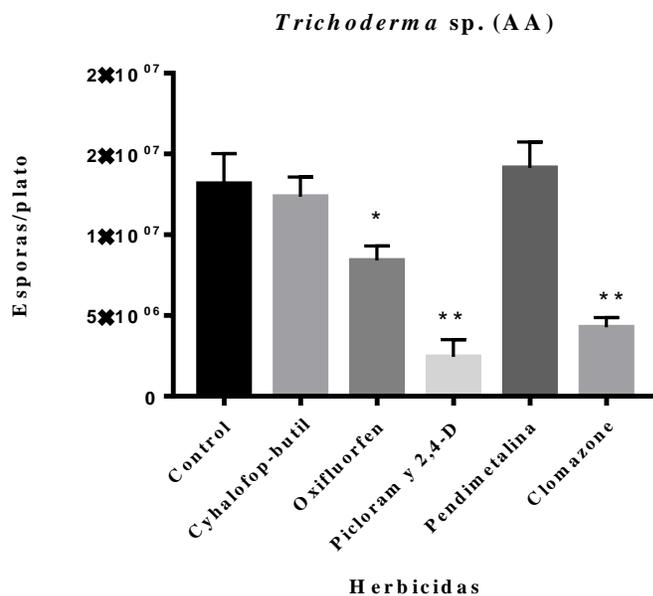
Anexo 6. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de *Trichoderma* sp. al tercer día en AA.



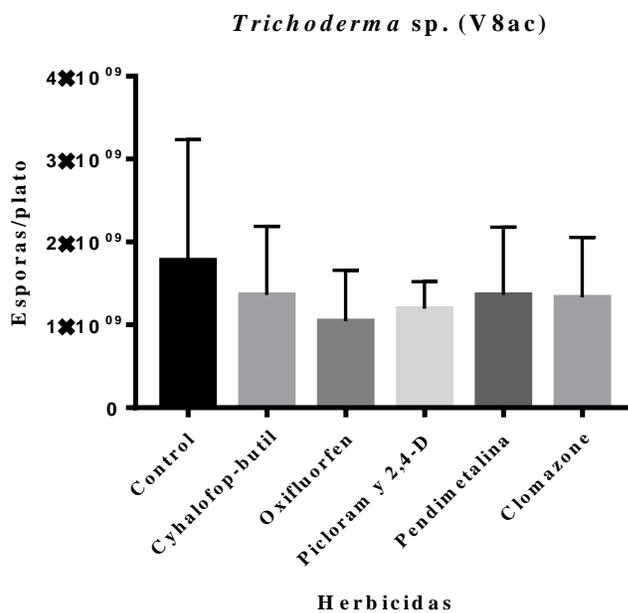
Anexo 7. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de *Trichoderma* sp. al tercer día en AV8ac.



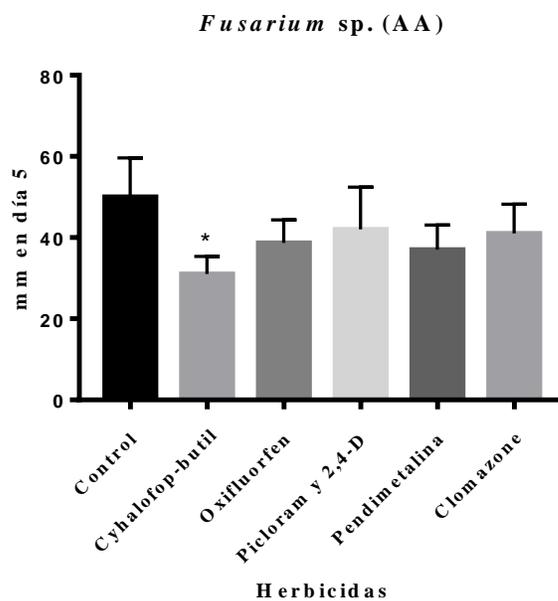
Anexo 8. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de *Trichoderma* sp. al tercer día en AA.



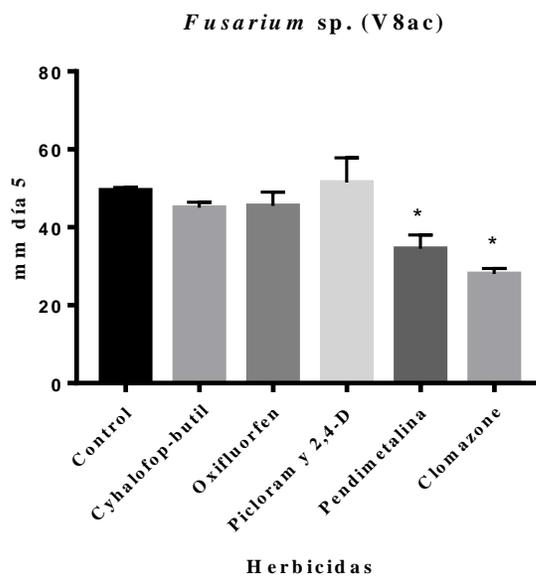
Anexo 9. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de *Trichoderma* sp. al tercer día en AV8ac.



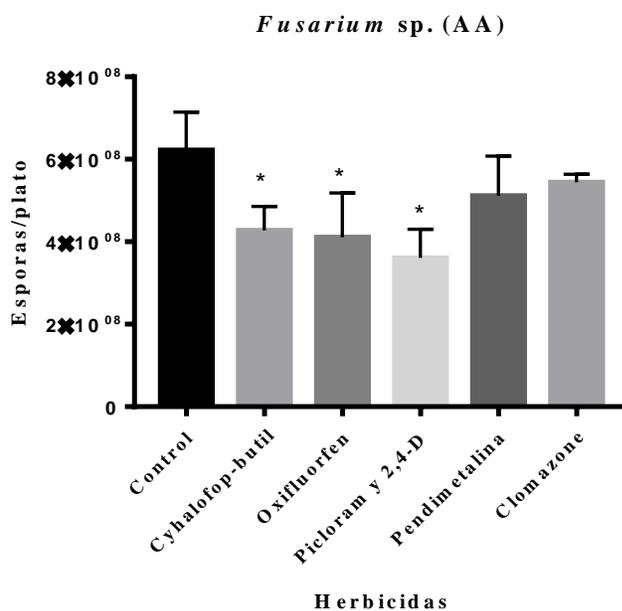
Anexo 10. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de *Fusarium* sp. al quinto día en AA.



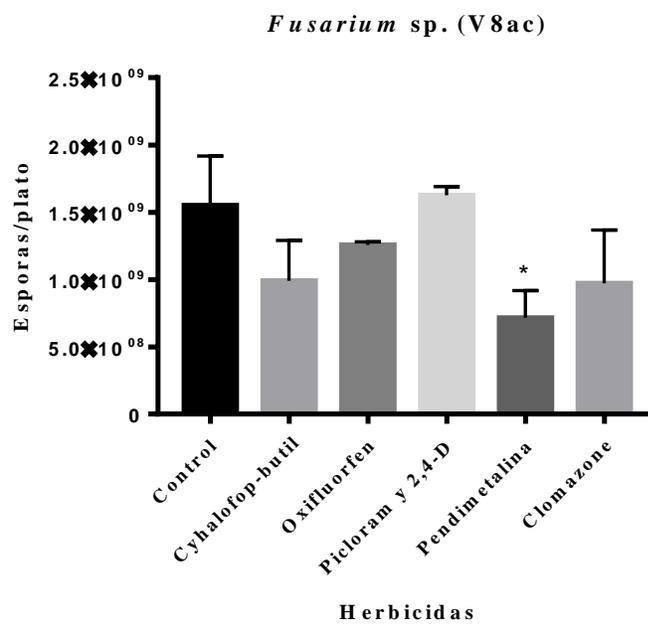
Anexo 11. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de *Fusarium* sp. al quinto día en AV8ac.



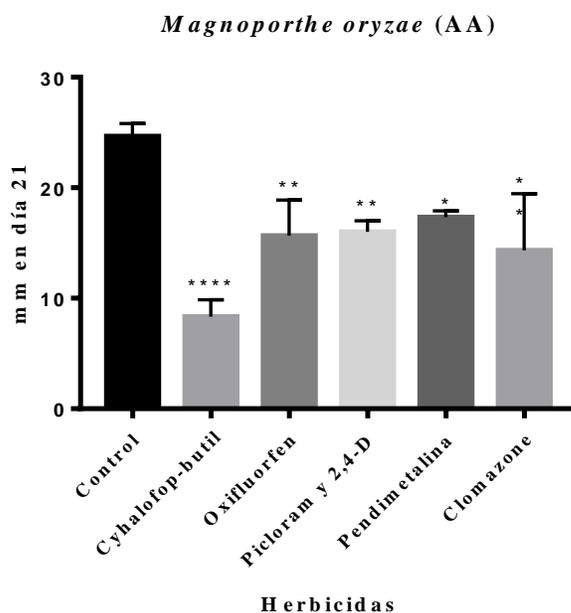
Anexo 12. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de *Fusarium* sp. al quinto día en AA.



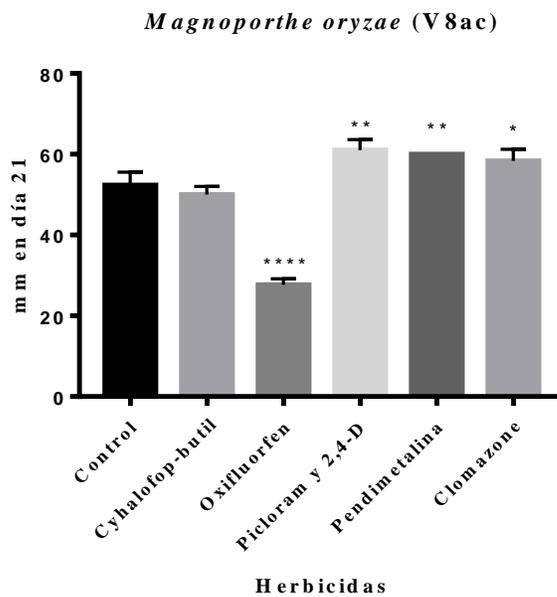
Anexo 13. Efecto de los cinco herbicidas en la esporulación de *Fusarium* sp. al quinto día en AV8ac.



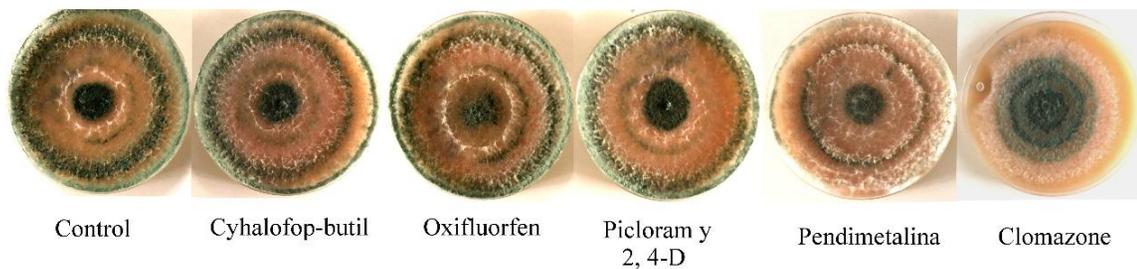
Anexo 14. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) al duodécimo día en AA.



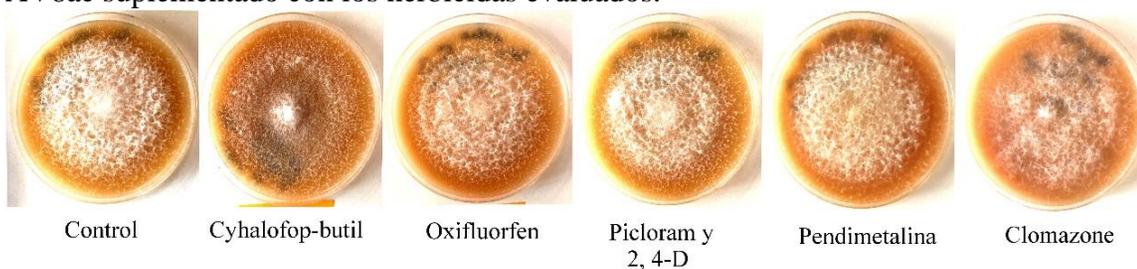
Anexo 15. Efecto de los cinco herbicidas en el crecimiento (mm) de *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) al duodécimo día en en AV8ac



Anexo 16. Conglomerado de fotografías del crecimiento de *Trichoderma* sp. (14 días) en AV8ac suplementado con los herbicidas evaluados.



Anexo 17. Conglomerado de fotografías del crecimiento de *Fusarium* sp. (21 días) en AV8ac suplementado con los herbicidas evaluados.



Anexo 18. Conglomerado de fotografías del crecimiento de *Magnaporthe oryzae* ($\Delta asd4$) (32 días) en AV8ac suplementado con los herbicidas evaluados.

