



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CONTROL BIOLÓGICO DE *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* y *Fusarium verticilloides* (Sacc.) Nirenberg CON HONGOS ANTAGONISTAS NATIVOS DEL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO EN CONDICIONES *In vitro*

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA**

P R E S E N T A

BRENDA MELÉNDEZ CARBAJAL

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESOR

DR. JESÚS RICARDO SÁNCHEZ PALE

OCTUBRE DEL 2015

**CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO
PIEDRAS BLANCAS MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO.**



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 El cultivo de maíz	5
4.2 Producción de maíz en México	5
4.3 Producción de maíz en el Estado de México	6
4.4 Enfermedades del maíz en Valles Altos	7
4.4.1 Diente de caballo (<i>Claviceps gigantea</i> , <i>Sphacelia</i> spp. (Leveillé, 1827))	7
4.4.1.1 Taxonomía de <i>Sphacelia</i> spp.....	7
4.4.1.2 Fase imperfecta de <i>Claviceps gigantea</i> (<i>Sphacelia</i> spp.)	9
4.4.2 Pudrición de la mazorca (<i>Fusarium verticilloides</i> (Link ex Grey, 1821)) (Anamorfo: <i>Fusarium graminearum</i>)(Teleomorfo: <i>Gibberella moniliformis</i>)	12
4.4.2.1 Taxonomía de <i>Fusarium verticilloides</i>	12
4.4.2.1 Principales rutas de infección	14
4.5 Otras enfermedades	17
4.5.1 Carbón de la espiga (<i>Sporisorium reilianum</i> , (Kühn Clinton)).....	17
4.5.1.1 Taxonomía de <i>Sporisorium reilianum</i>	17
4.5.2 Carbón común (<i>Ustilago maydis</i> (D.C. Corda))	18
4.5.2.2 Taxonomía de <i>Ustilago maydis</i>	18
4.5.3 Necrosis vascular y marchitez tardía (<i>Acremonium strictum</i> (sin. <i>Cephalosporium acremonium</i> y <i>C. maydis</i> . Corda, 1839)	19
4.5.3.3 Taxonomía de <i>Acremonium strictum</i>	19
4.5.4 Pudrición de tallo por antracnosis (Anamorfo: <i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) G.W. Wilson 1914) (Teleomorfo: <i>Glomerella graminicola</i> , Politis 1975)).	20

4.5.4.4	Taxonomía de <i>Colletotrichum graminicola</i>	20
4.5.5	Pudrición de mazorca por <i>Penicillium</i> (<i>Penicillium spp.</i>) Link: Fr. 1816.....	21
4.5.5.5	Taxonomía de <i>Penicillium spp.</i>	21
4.5.6	Pudrición de mazorca por <i>Aspergillus</i> (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus spp.</i> Link, 1809)	21
4.5.6.6	Taxonomía de <i>Aspergillus spp.</i>	21
4.5.7	Pudrición de mazorca por <i>Nigrospora</i> (Anamorfo: <i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch 1924 (Teleomorfo: <i>Khuskia oryzae</i> , H.J. Huds. 1963)).....	22
4.5.7.7	Taxonomía de <i>Nigrospora oryzae</i>	22
4.6	Control biológico	23
4.6.1	Definiciones de control biológico	24
4.6.2	Tipos de control biológico.....	25
4.6.2.1	25
4.6.2.2	Control biológico conservador.....	25
4.6.2.3	Control biológico aumentativo.	25
4.6.2.3.1	El control inoculativo.	25
4.6.2.3.2	Control inundativo.	26
4.6.3	Importancia del control biológico.....	26
4.6.4	Ventajas y desventajas del control biológico.....	28
4.6.4.1	Ventajas	28
4.6.4.2	Desventajas.....	29
4.6.5	Hongos como agentes de biocontrol	30
4.6.6	Mecanismos de acción.....	33
4.6.6.1	Competencia.	34
4.6.6.1.1	Competencia por nutrientes.....	34
4.6.6.1.2	Competencia por espacio.	34
4.6.6.2	Antibiosis.....	34
4.6.6.3	Parasitismo.....	35
4.6.6.4	Interacción directa con el patógeno (Micoparasitismo y lisis enzimática).	35
4.6.6.5	Resistencia inducida.....	35
4.6.6.5.1	Inductores bióticos	36
4.6.6.5.2	Inductores abióticos.....	36
V.	MATERIALES Y METODOS	37
5.1	Eta de campo	37

5.2 Etapa de laboratorio	38
5.2.1 Aislamiento e identificación de hongos antagonistas	38
5.2.2 Aislamiento de <i>Sphacelia</i> spp. y <i>Fusarium verticilloides</i>	39
5.2.2.1 <i>Sphacelia</i> spp.	39
5.2.2.2 <i>Fusarium verticilloides</i>	41
5.2.3 Identificación de los hongos	41
5.2.4 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	41
5.2.5 Variables a evaluar	42
5.2.6 Diseño experimental	42
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Aislamiento e identificación de los hongos antagonistas	43
6.2 Confrontaciones de <i>Fusarium verticilloides</i> con los hongos aislados	48
6.2.1 Crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA).....	48
6.2.2 Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (CDP).....	52
6.2.3 Diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DC).....	54
6.2.4 Eficiencia de biocontrol.....	62
6.3 Confrontaciones de <i>Sphacelia</i> spp. con los hongos aislados	64
6.3.1 Crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA).....	64
6.3.2 Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (CDP).....	69
6.3.3 Diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DC)	71
6.3.4 Eficiencia de biocontrol (EB)	72
VII. CONCLUSIONES.....	75
VIII. BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Localidades en donde se realizó el muestreo de suelo y colecta de mazorcas infestadas por <i>Fusarium verticilloides</i>	37
Cuadro 2. Cepas de los hongos aislados e identificadas en las 3 localidades evaluadas	43
Cuadro 3. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista.	48
Cuadro 4. Separación de medias para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA, en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.	49
Cuadro 5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (<i>Fusarium verticilloides</i>).	52
Cuadro 6. Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno, <i>Fusarium verticilloides</i> (CDP en cm) en cultivo dual con los diferentes antagonistas.	53
Cuadro 7. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable diferencia de crecimiento de la colonia entre el antagonista y el patógeno.	55
Cuadro 8. Diferencia de crecimiento (DC en cm) entre los hongos antagonistas y el patógeno <i>Fusarium verticilloides</i>	56
Cuadro 9. Resultados de eficiencia de biocontrol (EB) de los hongos antagonistas a <i>Fusarium verticilloides</i>	63
Cuadro 10. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista.	64
Cuadro 11. Separación de medias para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista. (CDA, en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.	65
Cuadro 12. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (<i>Sphacelia</i> spp.).....	69
Cuadro 13. Separación de medias para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno <i>Sphacelia</i> spp. (CDP en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.	70
Cuadro 14. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno.....	71
Cuadro 15. Separación de medias para la variable diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DC en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.	72
Cuadro 16. Resultados de la eficiencia de biocontrol (EB) de los hongos antagonista a <i>Sphacelia</i> spp.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diente de caballo (<i>Claviceps gigantea</i>).....	8
Figura 2.	Ciclo de vida <i>C. purpurea</i> modificado de Agrios (2005) para ejemplificar el de <i>C. gigantea</i> (Moreno, 2014).....	10
Figura 3.	Daños y síntomas ocasionados por <i>Fusarium</i> spp. en la mazorca de maíz.....	13
Figura 4.	Rutas de entrada de <i>Fusarium verticillioides</i> a la planta de maíz.....	16
Figura 5	Diluciones de placa realizada en las tres muestras de suelo.....	39
Figura 6.	Crecimiento en medio PDA de las cepas de los hongos nativos aislados.....	44
Figura 7.	Características morfológicas de los aislados nativos. a) <i>Pythium</i> spp., b) <i>Penicillium</i> spp. 1MM, c) <i>Penicillium</i> spp. 2 VV, d) <i>Penicillium</i> spp 5MM, e) <i>Alternaria</i> spp. 2Ca, f) <i>Penicillium</i> spp. 1 VV, g) <i>Penicillium</i> spp. 2MM, h) <i>Penicillium</i> spp. 4MM, i) <i>Penicillium</i> spp. 3VV, j) No identificado 3MM.....	46
Figura 8.	Características morfológica a nivel género de <i>Fusarium verticilloides</i>	47
Figura 9.	Características morfológico a nivel de género de <i>Sphacelia</i> spp.....	48
Figura 10.	a) <i>Penicillium</i> spp. 1MM, <i>Penicillium</i> spp. b) 3VV en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i>	47
Figura 11.	Crecimiento del diámetro del antagonista en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i> hasta los 15 días.....	50
Figura 12.	Crecimiento de la cepa de <i>Fusarium verticilloides</i> (testigo).....	54
Figura 13.	Crecimiento micelial de a) <i>Pythium</i> spp. 1Ca, b) <i>Penicillium</i> spp. 3VV, c) <i>Penicillium</i> spp. 1MM en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i>	54
Figura 14.	Hongos con mayor crecimiento del diámetro. 1) <i>Pythium</i> spp. 1Ca, 2) <i>Penicillium</i> spp. 4 MM, 3) <i>Penicillium</i> spp. 1MM, 4) <i>Penicillium</i> spp. 3VV, en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i>	57
Figura 15.	<i>Penicillium</i> spp. 1VV, 2) <i>Penicillium</i> spp. 2VV, 3) <i>Penicillium</i> spp.	

	5MM. en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i> , con presencia de halo de inhibición.	58
Figura 16.	Hongo <i>Penicillium</i> spp. 2MM en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i>	59
Figura 17.	Crecimiento de <i>Alternaria</i> spp. en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i>	60
Figura 18.	<i>Trichoderma</i> spp. en confrontación con <i>Fusarium verticilloides</i>	61
Figura 19.	Comportamiento de <i>Pythium</i> spp. confrontado con <i>Sphacelia</i> spp. en comparación con los testigos de ambos hongos.....	66
Figura 20.	Comportamiento de <i>Penicillium</i> spp. 1MM en confrontación con <i>Sphacelia</i> spp.....	66
Figura 21	Crecimiento del diametro del antagonista (cm) en confrontacion con <i>Sphacelia</i> spp. hasta los 15 dias.....	67
Figura 22	Comportamiento de <i>Penicillium</i> spp. 3VV en confrontación con <i>Sphacelia</i> spp.	68
Figura 23.	Crecimiento de <i>Alternaria</i> spp en confrontación con <i>Sphacelia</i> spp.....	68

RESUMEN

CONTROL BIOLÓGICO DE *Claviceps gigantea* Fuentes et al. y *Fusarium verticilloides* (Sacc.) Nirenberg CON HONGOS ANTAGONISTAS NATIVOS DEL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO EN CONDICIONES *In vitro*.

Brenda Meléndez Carbajal. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Asesor: ¹Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale

¹. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario El Cerrillo, El Cerrillo Piedras Blancas. Mpio. de Toluca, México. Código Postal 50200. Tel. (fax) 2-96-55-29 y 2-96-55-31 jrsanchezp@uaemex.mx

El maíz ocupa la mayor superficie sembrada en el Estado de México con 568,267 ha. El valle de Toluca es la principal región productora caracterizada por lo siembra de materiales de tipo criollo e híbridos. En los últimos años se reportan fuertes daños por *Claviceps gigantea* (*Sphacelia* spp.) y *Fusarium verticilloides*. Una posible alternativa de control es el uso de hongos antagonistas nativos. El presente trabajo tuvo por objetivo aislar, identificar los hongos antagonistas nativos con capacidad antagonica a *Claviceps gigantea* (*Sphacelia* spp.) y *Fusarium verticilloides* provenientes de suelos naturalmente infestados de los valles altos del Estado de México. El trabajo se desarrolló en dos etapas, en la fase de campo se realizó el muestreo de suelo y colecta de mazorcas infestadas por *Claviceps gigantea* y *Fusarium verticilloides* en las localidades de Calimaya (San Andrés), Almoloya de Juárez (Mina México) y Villa Victoria (Laguna seca). La etapa de laboratorio consistió en realizar diluciones seriadas y siembra en medio PDA para aislar los hongos antagonistas; posteriormente se realizaron las confrontación *in vitro* entre los hongos antagonistas y los patógenos considerando cinco repeticiones de cada enfrentamiento. Los resultados indicaron que 10 cepas se comportaron como antagonistas, de las cuales siete pertenecieron al género *Penicillium* spp., uno a *Pythium* spp. y uno *Alternaria* spp. De las cuales, siete cepas de *Penicillium* spp. y *Pythium* spp. presentaron una mayor capacidad antagonica contra *Fusarium verticilloides*; mientras que dos cepas de *Penicillium* spp., la cepa *Pythium* spp., *Alternaria* spp. y *Trichoderma* spp. mostraron antagonismo contra *Sphacellia* spp.

Palabras clave: Maíz, Diente de caballo, cornezuelo, pudrición de la mazorca, antagonismo.

ABSTRACT

BIOLOGICAL CONTROL OF *Claviceps gigantea* Fuentes et al. y *Fusarium verticilloides* (Sacc.) Nirenberg *in vitro* WITH NATIVE ANTAGONISTS FUNGI IN TOLUCA, MEXICO.

Brenda Meléndez Carbajal. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Asesor: ¹Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale

¹ Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario El Cerrillo, El Cerrillo Piedras Blancas. Mpio. de Toluca, México. Código Postal 50200. Tel. (fax) 2-96-55-29 y 2-96-55-31 jrsanchezp@uaemex.mx

Corn occupies the largest acreage in the state of Mexico with 568.267 hectares. Toluca Valley is the main producing region marked by the planting of native materials and of the hybrid type. In recent years heavy damage was caused by *Claviceps gigantea* (*Sphacelia* spp.) and *Fusarium verticilloides*. One possible alternative is to control native antagonistic fungi. The present study was aimed to isolate, and identify native antagonistic fungi with antagonistic capacity *Claviceps gigantea* (*Sphacelia* spp.) and *Fusarium verticilloides* from naturally infected in the high valleys of the state of Mexico soils. The work was developed in two stages, the field phase of the soil sampling and the collection of infested cobs was conducted by *Claviceps gigantea* and *Fusarium verticilloides* in the towns of Calimaya (San Andres), Almoloya de Juarez (Mina Mexico) and Villa Victoria (Laguna Seca). The laboratory stage consisted in performing serial dilutions and plating through PDA to isolate antagonistic fungi; then the *in vitro* confrontation took place between the antagonistic fungi and the pathogens considering five repetitions of each confrontation. The results indicated the isolation of 10 strains of which seven belonged to the genus *Penicillium* spp., *Pythium* spp one. They had higher antagonistic ability against *Fusarium verticilloides*; while two strains of *Penicillium* spp., a strain of *Pythium* spp., *Alternaria* spp. and *Trichoderma* spp. *Sphacelia* spp. showed antagonism.

Keywords: corn, ergot, fusarium ear rot, antagonism.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz es el principal cultivo que ocupa la mayor superficie sembrada en el Estado de México con 568,267 ha (SIAP, 2013). El valle de Toluca es la principal región productora de maíz en donde se siembran materiales de tipo criollo, y en los últimos años se han introducido materiales híbridos de alta productividad.

Cada año, la producción de maíz se ve afectada por la presencia de plagas y enfermedades que repercuten fuertemente en el rendimiento y calidad del producto. Es afectado por al menos 23 insectos plagas y 18 enfermedades (De León, 2008) en diferentes regiones de México. En los Valles Altos, del Estado de México existen diversos problemas fitosanitarios que van en aumento, afectando de manera considerablemente el ingreso de los productores. Entre las enfermedades de mayor importancia está la pudrición de la mazorca ocasionada por *Fusarium verticilloides*, que es una enfermedad prevalente y común en dicha región, en especial en aquellos materiales que presentan acame o caída de planta y el denominado carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* = *Sphacelotheca reiliana*) (De León, 2008). En fechas recientes se ha presentado un incremento en los daños causados por el llamado diente de caballo, ocasionado por el hongo *Claviceps gigantea* (Anamorfo *Sphacelia* spp.) (Osada, 1984) que ha llegado a presentar incidencias de hasta el 100% en híbridos introducidos.

El hongo *Claviceps gigantea* (en su fase perfecta), *Sphacelia* (en su fase imperfecta) es considerado de tipo endémico para el Valle de Toluca, y se caracteriza por originar el llamado diente de caballo (Osada, 1984). Su presencia se ha reportado en los municipios de Calimaya, Almoloya de Juárez y Villa Victoria, ocasionando pérdidas en la producción de grano; mientras que la pudrición de mazorca por *Fusarium verticilloides* se reporta en todos los municipios del estado, aunque destacan los Valles Altos por la intensidad de la enfermedad que se presenta durante el ciclo de temporal.

Las dos enfermedades atacan principalmente a híbridos y variedades mejoradas, en los criollos se observan ligeros daños año con año. No se reportan alternativas de control químico, debido a que económicamente poco se justifica su uso, por lo que el empleo de

otras alternativas pueden ser viables, tal es el caso de hongos antagónicos nativos que representan una opción de origen biológico para el control de las dos enfermedades, sobre todo en las etapas que permanecen en el suelo.

II. OBJETIVOS

- Aislar e identificar los hongos antagonistas nativos provenientes de suelos naturalmente infectados de *Claviceps gigantea* y *Fusarium verticilloides* de los valles altos del Estado de México.
- Determinar la capacidad antagónica de los hongos nativos contra *Sphacelia* spp. (etapa imperfecta de *Claviceps gigantea*) y *Fusarium verticilloides*.

III. HIPÓTESIS

Los hongos antagónicos nativos aislados de suelos del Valle de Toluca, reducirán el crecimiento de *Sphacelia* ssp. y *Fusarium veticilloides* en condiciones *In vitro*, con perspectivas de ser utilizados como agentes de control biológico.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 El cultivo de maíz

La producción de maíz, por tradición, es necesaria para la alimentación de la población rural y urbana del país, para la ganadería y para la creciente industria. Su evolución ha sido importante ya que México pasó de ser un país exportador a importador debido a las crecientes demandas que generan una balanza de producción y consumo desfavorable en los últimos años (PROMEAR, 2009).

4.2 Producción de maíz en México

Según la FAO STATS (2012) México es el quinto productor de maíz a nivel mundial; en 2013 se contó con una superficie sembrada de maíz forrajero y maíz grano de 8, 053,703.55 ha (SIAP, 2013), de las cuales el Estado de México tiene 542,527.68 ha de maíz grano y 25,740.00 ha de maíz forrajero, siendo el municipio de Almoloya de Juárez el que cuenta con una mayor superficie de maíz grano con 26,500.00 ha.

En la economía mexicana, el maíz es el cultivo más importante; ya que, la superficie cultivada con él, representa 38.6% del territorio mexicano. Los esfuerzos de la producción nacional se enfocan en la obtención de maíz blanco, que es utilizado en la dieta de los mexicanos. La importancia que tiene el maíz como parte de la dieta alimenticia ha llevado a que este grano se cultive a lo largo y ancho del territorio mexicano. El 50% de la producción de maíz en México se obtiene de cinco principales estados productores, que son: Jalisco, Estado de México, Sinaloa, Chiapas y Michoacán. El Estado de México cuenta con una gran diversidad de maíces que pueden ser agrupados en blancos, pigmentados y amarillos. En esta pluralidad de maíces pigmentados se encuentran el rojo y azul. El maíz es uno de los granos que mayor demanda tiene a nivel mundial. Es utilizado tanto en la dieta humana, como alimento forrajero o como insumo en la agroindustria. En México, 69% del maíz producido es destinado al consumo humano; 20% sector pecuario; industrialización 10%, y a la producción de semillas 1% (Salinas *et al.*, 2010).

4.3 Producción de maíz en el Estado de México

El maíz es el cultivo de mayor importancia en el Estado de México (Aquino *et al.*, 2014), este tiene una marcada influencia sobre el desarrollo social y económico de la población. La superficie territorial de la entidad comprende 22 499.95 km², de los cuales 18% se siembra el maíz. El Estado de México se ubica en el tercer lugar como productor de maíz a nivel nacional (Ortega y Ochoa, 2003).

En el 2013 se contó con una superficie sembrada de 568,267 ha obteniendo una producción de 3, 352,870.53 toneladas de maíz forrajero y grano (SIAP, 2013). De acuerdo a la altitud, las zonas cultivadas con maíz se dividen en tres regiones: 1) Valles Altos 2) transición 3) subtrópico. La región Valles Altos, comprende el Valle de Toluca-Atlacomulco, Jilotepec y el Valle de México (300,000 ha). En los valles de gran altura, como el de Toluca-Atlacomulco, el cultivo se establece en punta de riego o temporal benigno. En los ambientes del Valle de México, de transición y subtrópico seco, la siembra se realiza bajo temporal limitado, no obstante, en algunas zonas cercanas a Zumpango y Texcoco, también se reportan áreas con punta de riego. En estos ambientes aún se utiliza un alto porcentaje de maíces criollos y la tecnología de producción es deficiente (Salinas *et al.*, 2010).

En el Estado de México se genera 10% de la producción nacional, pero las variedades mejoradas ocupan un poco menos de una décima parte de la superficie dedicada al maíz. Casi todo el maíz que se produce es de grano blanco, ideal para elaborar platillos de la región, pero no alcanza los estándares del mercado a gran escala, particularmente. Los industriales de la masa y la tortilla, así como los de la harina nixtamalizada califican el maíz blanco o cremoso de los Valles Altos del Estado de México, como de mala calidad para sus procesos. Por esta situación, cuando el productor destina sus excedentes al mercado, el precio que logra es inferior al que se paga por el maíz tipo Sinaloa, y es catalogado como el de mejor calidad para el procesamiento alcalino. El cultivo de maíz en la entidad se realiza principalmente en el ciclo primavera-verano, con 98.5% de la superficie dedicada a este producto, el 1.5% restante se efectúa en el ciclo otoño-invierno. Lo anterior significa que el mayor volumen de producción de maíz en la entidad se obtiene en el ciclo primavera-verano (Salinas *et al.*, 2010).

4.4 Enfermedades del maíz en Valles Altos

Los hongos fitopatógenos, los causantes de las mayores pérdidas económicas agrícolas por el gran número de enfermedades que ocasionan. Se considera que todas las plantas son susceptibles al ataque de por lo menos un hongo y muchas son afectadas por un gran número de estos organismos, que las invaden desde la semilla hasta la planta adulta (De la I. De Bauer, 1991). El maíz es susceptible a varias enfermedades, que en alguna forma afectan el desarrollo normal de las plantas. Las enfermedades son favorecidas por las condiciones ambientales, el tipo de suelo, la susceptibilidad de los materiales y, en el caso de las enfermedades de origen viral, por las condiciones que favorecen la migración, establecimiento y supervivencia de los insectos vectores (Urbina, 2011). Las enfermedades causadas por hongos de mayor frecuencia que afectan el cultivo de maíz en Valles Altos incluyen pudriciones, marchites, tizones, carbones y royas.

4.4.1 Diente de caballo (*Claviceps gigantea*, *Sphacelia* spp. (Leveillé, 1827))

4.4.1.1 Taxonomía de *Sphacelia* spp.

Reino: Fungi

Súper reino: Eukaryota

Sub reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: *Clavicipitaceae*

Género: *Sphacelia*

Fuente: NCBI. 2015

El hongo *Claviceps gigantea* (diente de caballo) es una enfermedad endémica de los valles altos de México, en las regiones de Amecameca y Toluca del Estado de México y en la serranía tarasca del estado de Michoacán. Estos lugares se encuentran a

una altura de más de 2,000 msnm con clima húmedo y frío. La enfermedad se caracteriza por la presencia de abultamientos en las mazorcas tiernas, se encuentran esclerocios de color blanquecino o cremoso de 5 a 10 cm de longitud por 0.5 a 5.0 cm de ancho. Al final del ciclo vegetativo, de 4 a 6 semanas después de su aparición, los esclerocios se enjuntan, se endurecen y toman una coloración pajiza a café claro, rompiendo a veces la envoltura de la mazorca. De acuerdo a la posición del esclerocio en la mazorca, este puede dañar en menor o mayor grado el desarrollo de los granos cercanos, y su germinación.

La infección del hongo es favorecida por un rango de temperaturas de 13 a 15°C y una precipitación pluvial de anual de 1,000 mm (Osada, 1984). En las primeras etapas de la infección, los esclerocios son de color claro, suaves y viscosos, y se van endureciendo a medida que se acerca la cosecha. No producen el polvo negro característico del carbón común, pero cuando caen al suelo, germinan y desarrollan muchas estructuras parecidas a cabezuelas (estromas), las cuales liberarán esporas nuevas durante la emisión de estigmas en el siguiente ciclo de cultivo. Este patógeno está estrechamente relacionado con el del cornezuelo del centeno y también produce alcaloides tóxicos (CIMMYT, 2004).



Figura 1.Diente de caballo (*Claviceps gigantea*).

4.4.1.2 Fase imperfecta de *Claviceps gigantea* (*Sphacelia* spp.)

Aunque no se tiene información exacta del ciclo de vida de ésta especie, se supone que es muy parecido al de *Claviceps purpurea*, especie representativa de la familia de los Clavicipitaceae. Como se puede apreciar en la figura 3, se observa la descripción del ciclo de vida señalado por Agrios (2005) con algunas modificaciones realizadas con información conocida de *C. gigantea*.

El estado anamorfo de *C. gigantea* que indica De la Isla y Fuentes (1963) es el hongo *Sphacelia* spp. Los ovarios de las flores del maíz son infectadas por los conidios de *Sphacelia* spp. y el micelio forma un esporodoquio que a su vez forma conidióforos y conidios (haploide) (Moreno, 2014).

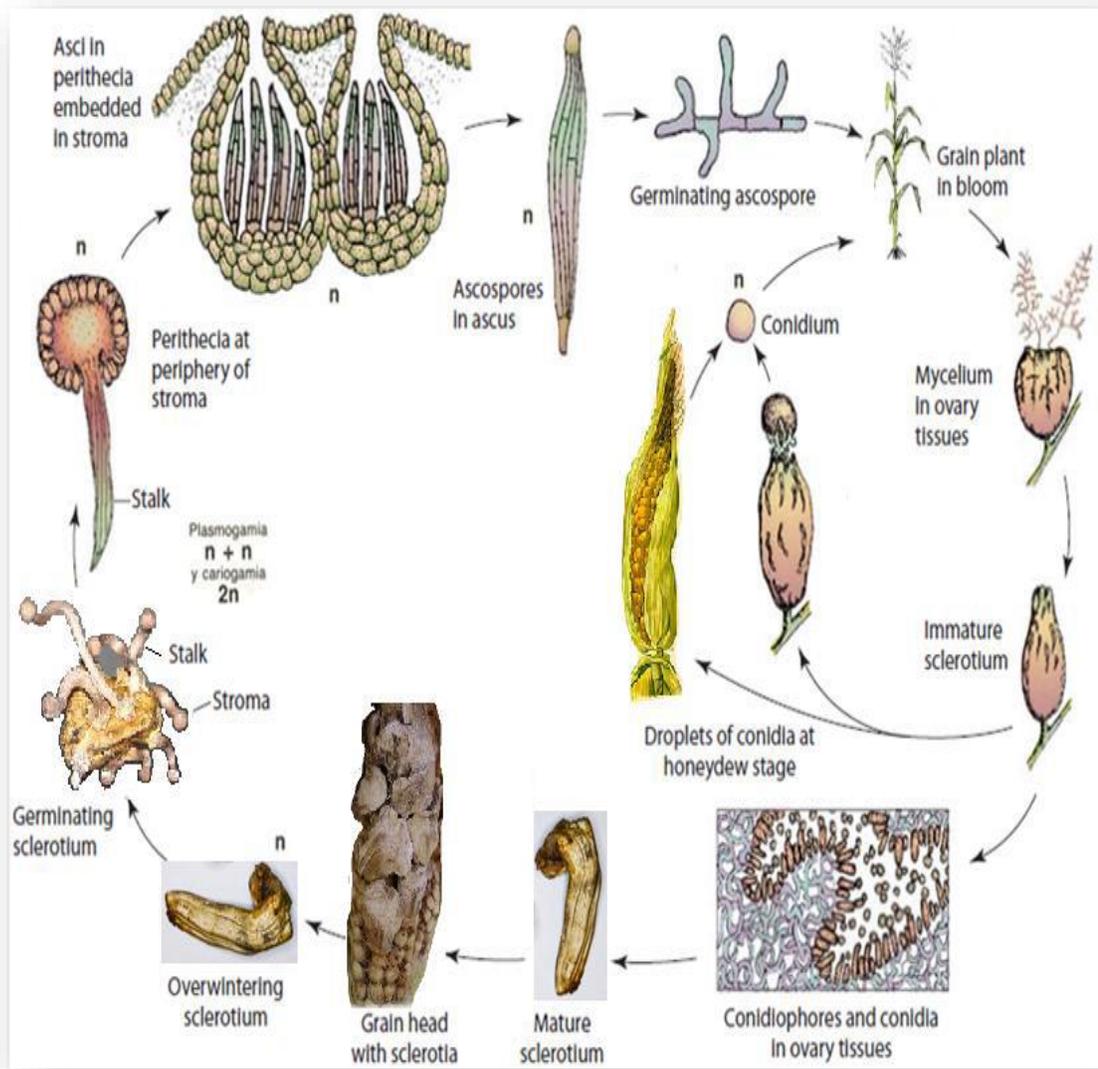


Figura 2. Ciclo de vida *C. purpurea* modificado de Agrios (2005) para ejemplificar el de *C. gigantea* (Moreno, 2014).

Los conidios germinan y penetran al estigma. Estos conidios se forman en una secreción azucarada (Fucikovsk y Moreno, 1971, citado por Osada, 1984) además dicho autor menciona la posibilidad de que esta secreción atrae a los insectos y estos los diseminan. Sin embargo, White *et al.* (2003), citado por Moreno (2014), mencionan que el estado conidial del hongo está completamente envuelto en las hojas, por lo que la mielecilla con los conidios no está disponible para que los insectos la diseminan. Los conidios son transportados por aire o agua de lluvia a otras flores en cuyos ovarios

germinan dispersando la enfermedad y completándose el ciclo asexual. La fase teleomorfa se inicia después de la infección de los ovarios, en los que el hongo crece y se endurece para formar un esclerocio ligeramente curvo dando la apariencia de un diente de caballo. Los esclerocios caen al suelo y pueden sobrevivir durante varios meses hasta el nuevo ciclo de siembra de maíz. En presencia del cultivo y de condiciones ambientales favorables, los esclerocios germinan (micelio haploide). El micelio desarrollado a partir de los esclerocios origina pedicelos o estípites en cuyo ápice se forma un estroma esférico.

En el estroma se forman peritecios, cada uno con un ascogonio y un anteridio. El anteridio fertiliza al ascogonio por contacto gametangial y ocurre la plasmogamia. Posteriormente, ocurre la cariogamia (unión o fusión de núcleos) originando núcleos diploides en el ascogonio. Finalmente, durante la ascogénesis (formación de ascas y ascosporas), los núcleos diploides se dividen por meiosis y con una división mitótica se forman 8 núcleos haploides, cada uno de los cuales formará una ascospora.

Los peritecios se desarrollan en la periferia del estroma y en su interior se forman ascas con ascosporas. Entre las ascas se forman parafisos que son hifas estériles. Las ascosporas maduran en las ascas y son liberadas a través del ostíolo del peritecio. Las ascosporas son transportadas por aire o agua de lluvia, llegan a los estigmas de los jilotes donde germinan e infectan a los ovarios iniciándose nuevamente el ciclo (Moreno, 2014).

4.4.2 Pudrición de la mazorca (*Fusarium verticilloides* (Link ex Grey, 1821)) (Anamorfo: *Fusarium graminearum*) (Telemorfo: *Gibberella moniliformis*)

4.4.2.1 Taxonomía de *Fusarium verticilloides*

Reino: Fungi

Súper reino: Eukaryota

Sub reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hipocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium verticilloides*

Fuente: NCBI. (2015)

Fusarium verticillioides es un ascomiceto perteneciente a la subdivisión Deuteromycota, que agrupa a aquellos hongos en los que no hay descrita una fase sexual o, bien, ésta es muy rara (Deacon, 1997). *F. verticillioides* cae en esta última categoría, porque sí presenta una fase sexual llamada telemorfo, o forma perfecta, muy difícil de encontrar en la naturaleza y se requieren condiciones especiales para observarla *in vitro*. La forma telemórfica recibe otro nombre de género y especie: para *F. verticillioides* es *Gibberella moniliformis*, que es heterotálico, ya que el apareamiento ocurre entre colonias de distintos grupos. En el estado anamorfo, o de reproducción asexual, hay a bundante producción de microconidias; éstas son células ovaladas con la base aplanada y agrupadas en cadenas (Leslei y Summerell, 2006).

Dos especies de *Fusarium* spp. causan pudriciones del tallo en el maíz: *Fusarium moniliforme* es más común en climas secos y cálidos. Es particularmente dañina si comienza antes de la floración. *Gibberella zeae* es más común en regiones frías. Es uno de los agentes causantes de pudrición del tallo más perjudiciales.

Los síntomas se caracterizan porque las plantas marchitas permanecen erectas cuando se secan y aparecen lesiones pequeñas de color café oscuro en los entrenudos inferiores. Al partirlos verticalmente, se observa que el floema de los tallos infectados es café oscuro y que hay un oscurecimiento conspicuo general de los tejidos. En las etapas finales de la infección, la médula es destruida y los tejidos adyacentes pierden su color (CIMMYT, 2004).

Las mazorcas infectadas por *Fusarium verticillioides* desarrollan una pudrición característica de unos cuantos granos aislados o áreas relativamente grandes de granos. El micelio blanco o ligeramente rosado se puede desarrollar sobre los granos infectados. Granos afectados presentan un rayado, debido a la presencia del micelio bajo el pericarpio. Similar al caso anterior, en maíz esta especie sintetiza micotoxinas conocidas como fumonisinas (Rodriguez y De leon, 2008).



Figura 3. Daños y síntomas ocasionados por *Fusarium* spp. en la mazorca de maíz.

La especie *F. verticillioides* se distribuye por todo el mundo, y con alta frecuencia es aislada del maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas cuantiosas que varían año con año. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que

tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, así como las condiciones ambientales. El clima caliente y húmedo favorece la pudrición de la mazorca durante el periodo de llenado de grano. Uno de los aspectos que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides* en el maíz es que el hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (De la Torre *et al.*, 2014).

4.4.2.1 Principales rutas de infección

Uno de los aspectos que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides* en el maíz es que el hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (De la Torre *et al.*, 2014).

Infección sistémica de las plántulas: Ocurre durante y desde la germinación de la semilla, y a lo largo del establecimiento de la plántula. Como el hongo sobrevive ya sea en la semilla o en el suelo, se encuentra estratégicamente posicionado para infectar a la planta. *F. verticillioides* penetra de forma directa el pericarpio y a las células de la epidermis de la raíz, tres días después de que se siembran las semillas inoculadas. Las hifas colonizan las células del parénquima del escutelo y llegan hasta el córtex. Sin embargo, la colonización de la endodermis y de las regiones vasculares ocurre en raras ocasiones (Murillo *et al.*, 1999).

Infección de la mazorca por medio del estigma: La vía más común para que *F. verticillioides* infecte a la mazorca es a través del estigma. Lo anterior sucede cuando el

inóculo aéreo y las conidias transportadas por el agua de lluvia se depositan en el estigma. De esa forma se facilita el acceso a las células del pericarpio y la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula para poder acceder al grano, a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas (Duncan y Hawar, 2010).

Infección del tallo y la mazorca por daño mecánico: Al alimentarse, varios insectos plagas del maíz recorren las mazorcas y los tallos de la planta. Este daño mecánico funciona como ruta de entrada para las conidias de *F. verticillioides*. Además, hay insectos que actúan como vectores del hongo, ya sea dispersándolo a lo largo de la superficie de la planta hacia los granos como *Ostrinia* spp., el gusano barrenador o, bien, transportándolo a través de grandes distancias como el gusano de la raíz (*Diabrotica* spp.). Otros vectores descritos son el gusano elotero en sus fases de larva y de adulto, los trips y los gorgojos (Gilbertson *et al.*, 1986).

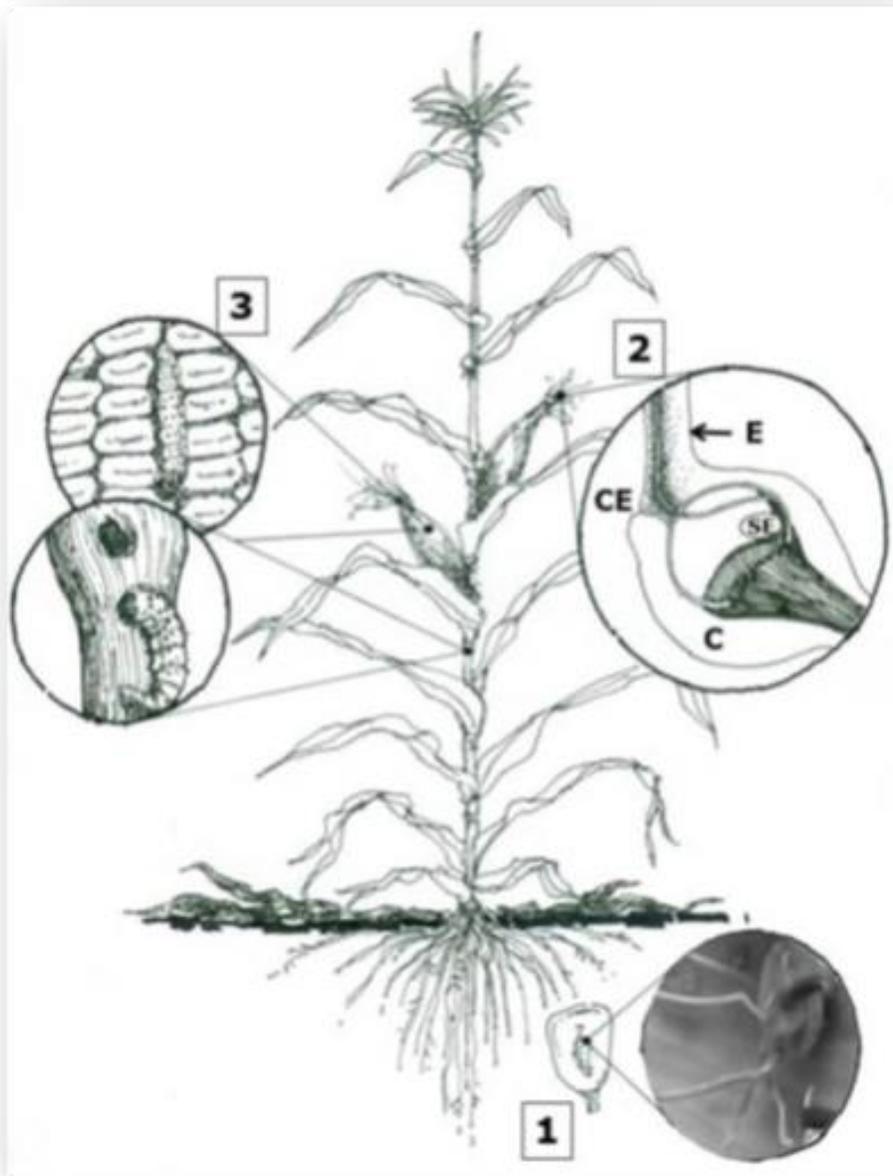


Figura 4. Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. El hongo sobrevive en la semilla o en el suelo de donde accede a la plántula e infecta las raíces. 2. Infección a través del estigma. Las conidias del hongo son depositadas en el estigma (E) y penetran a través de la parte inferior del canal estilar (CE). C: carpelo, SE: saco embrionario. 3. Infección a través de heridas. El hongo accede al tallo y/o a la mazorca a través de lesiones mecánicas por insectos al alimentarse.

La incidencia de dicha enfermedad causada por *F. verticilloides* depende de la humedad durante la emergencia y desarrollo del estigma, y aumenta considerablemente si esta persiste. La infección con *F. verticilloides* puede ser tanto sintomática como asintomática, las causas que producen estas diferencias aun no estan bien conocidas. La podredumbre de las semillas causadas por *Fusarium* spp, generalmente se relacionan con la presencia de lluvias moderadas durante la emergencia del estigma seguidos por periodos alternantes de sequia-humedad (Velluti, 2002).

4.5 Otras enfermedades

4.5.1 Carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum*, (Kühn Clinton))

4.5.1.1 Taxonomía de *Sporisorium reilianum*

Reino: Fungi

Super reino: Eukaryota

Sub reino: Dikarya

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Ustilaginomycotina

Clase: Ustilaginomycetes

Orden: Ustilaginales

Familia: Ustilaginaceae

Género: *Sporisorium*

Especie: *Sporisorium reilianum*

Fuente: NCBI. (2015)

El carbón de la espiga puede ocasionar daños económicos significativos en zonas maiceras tanto secos y cálidos como de altitud intermedia y clima templado.

La infección es de tipo sistémica, lo cual significa que el hongo penetra las plántulas y se desarrolla dentro de las plantas sin que éstas muestren síntomas, hasta que llegan a la floración y la emisión de estigmas.

Los síntomas más conspicuos son: a) el desarrollo anormal de las espigas (panojas), que se deforman y crecen excesivamente; b) la formación de masas negras de esporas en algunas florecillas macho, y; c) el desarrollo de masas negras de esporas en lugar de mazorcas, que dejan al descubierto los haces vasculares desgarrados (CIMMYT, 2004). Sánchez-Pale (2011) indica que la enfermedad se distribuye en forma agregada en las 34 localidades en donde se ha detectado, además su incidencia es mayor en materiales híbridos que en criollos. Sus incidencias varían de 0.2 % a 29 % los diversos materiales de maíz

4.5.2 Carbón común (*Ustilago maydis* (D.C. Corda))

4.5.2.2 Taxonomía de *Ustilago maydis*

Reino: Fungi

 Súper reino: Eukaryota

 Sub reino: Dikarya

 Phylum: Basidiomycota

 Subphylum: ustilaginomycotina

 Clase: Ustilaginomycetes

 Orden: Ustilaginales

 Familia: Ustilaginaceae

 Género: *Ustilago*

 Especie: *Ustilago maydis*

Fuente: NCBI. (2015)

El carbón común ocurre en todas las regiones productoras de maíz, pero puede ser más grave en climas húmedos y templados que en las tierras bajas tropicales con clima caluroso húmedo. El hongo ataca a las mazorcas, los tallos, las hojas y las espigas. Unas agallas blancas cerradas muy conspicuas sustituyen a los granos individuales. Con el tiempo las agallas se rompen y liberan masas negras de esporas que infectarán las plantas de maíz del siguiente ciclo de cultivo. La enfermedad causa daños graves en plantas jóvenes en estado activo de crecimiento y puede producirles enanismo o matarlas. El carbón común se distingue fácilmente del carbón de la espiga por la

ausencia de tejidos vasculares que aparecen en forma de fibras en las mazorcas infectadas por este patógeno (CIMMYT, 2004).

4.5.3 Necrosis vascular y marchitez tardía (*Acremonium strictum* (sin. *Cephalosporium acremonium* y *C. maydis*. Corda, 1839)

4.5.3.3 Taxonomía de *Acremonium strictum*

Reino: Fungi

 Súper reino: Eukaryota

 Sub reino: Dikarya

 Phylum: Ascomycota

 Subphylum: Pezizomycotina

 Clase: Sordariomycetes

 Subclase: Hypocreomycetidae

 Orden: Hypocreales

 Género: *Sarocladium*

 Especie: *Sarocladium strictum*

Fuente: NCBI. (2015). Nota: actualmente el hongo *Acremonium strictum* según el National Center for Biotechnology Information (NCBI) es clasificado como *Sarocladium strictum*.

La necrosis vascular es causada por *Cephalosporium acremonium* y está ampliamente distribuida por todo el mundo. La marchitez tardía, causada por *C. maydis*, sólo se ha detectado en Egipto y la India. Ambas enfermedades causan la muerte prematura de las plantas al aproximarse a la floración; son más frecuentes en suelos pesados y húmedos en las regiones cálidas. La infección se puede originar a partir de inóculo en el suelo o mediante semilla infectada.

Las plantas infectadas no muestran síntomas hasta que llegan a la floración y empiezan a marchitarse; lo primero que se marchita son las hojas superiores. Las plantas producen mazorcas pequeñas o con grano poco desarrollado y arrugado. Al abrirlos verticalmente, se puede ver que los haces vasculares de los tallos enfermos tienen una coloración parda que comienza desde las raíces. Se observan síntomas similares en plantas infectadas por *Fusarium moniliforme* (CIMMYT, 2004).

4.5.4 Pudrición de tallo por antracnosis (Anamorfo: *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson 1914) (Teleomorfo: *Glomerella graminicola*, Politis 1975)).

4.5.4.4 Taxonomía de *Colletotrichum graminicola*

Reino: Fungi

Súper reino: Eukaryota

Sub reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum*
graminicola

Fuente: NCBI. (2015)

El hongo *Colletotrichum graminicola* causa pudrición del tallo y tizón de la hoja. La pudrición del tallo se ha reportado principalmente en zonas cálidas y húmedas en todo el mundo. Los síntomas de la infección se manifiestan claramente en forma de lesiones oscuras, alargadas y angostas (primero cafés y luego negras) a lo largo de la superficie del tallo; aparecen cuando las plantas se acercan a la floración. En las plantas infectadas se observa marchitamiento prematuro (causado por la destrucción total del tejido de la médula) y desgarramiento de los haces vasculares, que adquieren una coloración café oscura. Dado que éste y otros hongos sobreviven al invierno en los tejidos infectados del maíz, se ha reportado que las prácticas de agricultura de conservación, en las que se aplican coberturas orgánicas (mantillo), aumentan la incidencia de la enfermedad (CIMMYT, 2004).

4.5.5 Pudrición de mazorca por *Penicillium* (*Penicillium spp.*) Link: Fr. 1816

4.5.5.5 Taxonomía de *Penicillium spp.*

Reino: Fungi

Súper reino: Eukaryota

Sub reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: *Aspergillaceae*

Género: *Penicillium*

Fuente: NCBI. (2015)

El daño más frecuente es causado por *Penicillium oxalicum*, aunque en ocasiones puede haber otras especies asociadas. Muchas veces la infección está asociada con el daño causado por insectos en la mazorca.

Un polvo de color azul-verdoso muy conspicuo crece entre los granos y sobre la superficie del olote (raquis). Los granos dañados por el hongo desarrollan un color amarillento y rayas visibles en el pericarpio (CIMMYT, 2004).

4.5.6 Pudrición de mazorca por *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus spp.* Link, 1809)

4.5.6.6 Taxonomía de *Aspergillus spp*

Reino: Fungi

Súper reino: Eukaryota

Sub reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: *Aspergillaceae*

Género: *Aspergillus*

Fuente: NCBI. (2015)

Esta enfermedad puede constituir un problema serio cuando se almacenan mazorcas infectadas con alto contenido de humedad. Existen varias especies de *Aspergillus* capaces de infectar las plantas de maíz en el campo. La más común es *A. niger*, que genera masas pulverulentas negras de esporas que cubren los granos y el olote o raquis, a diferencia de *A. glaucus*, *A. flavus* y *A. ochraceus*, cuyas masas normalmente son amarillo-verdosas; y de *A. parasiticus*, la especie menos común, cuya masa es verde hiedra (CIMMYT, 2004). *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* producen micotoxinas, conocidas como aflatoxinas, que resultan tóxicas para mamíferos y aves (CIMMYT, 2004).

4.5.7 Pudrición de mazorca por *Nigrospora* (Anamorfo: *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch 1924 (Teleomorfo: *Khuskia oryzae*, H.J. Huds. 1963))

4.5.7.7 Taxonomía de *Nigrospora oryzae*

Reino: Fungi

 Súper reino: Eukaryota

 Sub reino: Dikarya

 Phylum: Ascomycota

 Subphylum: Pezizomycotina

 Clase: Sordariomycetes

 Orden: Trichosphaeriales

 Familia: *Trichosphaeriaceae*

 Género: *Nigrospora*

Fuente: NCBI. (2015)

Esta enfermedad está ampliamente distribuida y el hongo causante sobrevive generalmente en los residuos de las plantas que quedan en el campo.

Las mazorcas están disecadas (momificadas) y no pesan. Además, los granos están manchados y se desprenden fácilmente del olote. Un examen cuidadoso de los tejidos del olote y de las puntas de los granos muestran pequeñas masas negras de esporas (CIMMYT, 2004).

4.6 Control biológico

La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por hongos, insectos y virus, quienes colonizan diversas partes de la planta, provocando desde la disminución de la calidad del producto y hasta la pérdida total de la planta. El control de plagas y enfermedades depende, en gran parte, de la aplicación de productos químicos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos, ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental y ha generado la selección de organismos altamente resistentes. Es por estas dos razones que se requieren nuevas estrategias para el control de plagas y enfermedades. La utilización de microorganismos en el control biológico de insectos plagas y de enfermedades es una alternativa atractiva (Ibarra *et al.*, 2006).

En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico funciona naturalmente (Cook y Beker, 1983).

El control biológico de los patógenos, es decir la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos por medio de otros organismos, frecuentemente ocurre en la naturaleza. Por ejemplo existen, varias enfermedades en las que el patógeno no puede desarrollarse en ciertas áreas debido a que el suelo, llamado suelo supresor, contiene microorganismos antagónicos al patógeno, o bien por que las plantas que son atacadas por este, también han sido inoculadas en forma natural con microorganismos antagónicos antes o después de que se haya ocurrido el ataque por el patógeno (Agrios, 2013).

El control biológico de plagas y patógenos ha sido utilizado en la agricultura de manera empírica desde sus inicios. La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de control biológico: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos (Serrano y Galindo, 2007). El control biológico es generalmente muy específico y usa organismos que atacan o interfieren con patógenos específicos. En algunos casos es posible encontrar una única

cepa microbiana que sea eficaz en muchos ambientes, pero en la mayoría de los casos, se requieren cepas diferentes en localidades diferentes.

El control biológico es el mejor método de optimizar, las actividades de las especies beneficiosas y conseguir reducir las actividades dañinas en ciertas plagas y enfermedades, pero en cualquier caso siempre hay que controlar las alteraciones que la liberación de los antagonistas puede suponer para el equilibrio de un ecosistema y tratar de minimizar los riesgos (Ezziyyani *et al.*, 2006)

4.6.1 Definiciones de control biológico

Actualmente se entiende por biocontrol a la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar. Este último caso de biocontrol consiste en la utilización de microorganismos naturales o modificados para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos para las plantas. Los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos (Ezziyyani *et al.*, 2006).

El control biológico también es definido como el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano y Galindo, 2007). También es considerado como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker y Cook, 1974).

Zavaleta (2000) define el control biológico como “cualquier forma de control que reduce la incidencia o severidad de la enfermedad, o incrementa la producción del

cultivo, aun cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inóculo, y su impacto nocivo en el ambiente sea mínimo o nulo”.

4.6.2 Tipos de control biológico

4.6.2.1 Control biológico clásico. Consiste en la importación de enemigos exóticos del lugar de origen de la plaga, para tener un control permanente a largo plazo (Jaca *et al.*, 2005). En este sistema los microorganismos antagonistas se obtienen de su medio natural endémico y se utilizan en otro, donde ellos no existían antes. En este lugar la plaga o enfermedad se había establecido porque ha vencido a los microorganismos autóctonos que existían, y ya no tienen enemigos naturales. La introducción de los nuevos organismos de biocontrol conduce a una reducción a largo plazo de la población de la plaga o enfermedad en los hábitats elegidos. Típicamente, el control biológico clásico ha sido el de más éxito en el sistema agroeconómico. La clave para el éxito en casi todos los proyectos de control biológico es el descubrimiento y la importación de enemigos naturales que produzcan altos niveles de parasitismo o depredación en los lugares nativos de la plaga o enfermedad (Ezziyyani *et al.*, 2006)

4.6.2.2 Control biológico conservador. Este es el que menos se asemeja a un verdadero biocontrol, pero es la base del manejo integrado de plagas. Consiste fundamentalmente en favorecer la abundancia de los enemigos naturales de los patógenos causantes de plagas, reduciendo influencias dañinas y resaltando las positivas (Ezziyyani *et al.*, 2006).

4.6.2.3 Control biológico aumentativo. Con este se pueden diferenciar dos tácticas:

4.6.2.3.1 El control inoculativo. Se introduce el enemigo en cantidades más bajas, esperando que se multiplique en el cultivo y de un control de plagas durante un largo periodo, aunque no sea de forma permanente (Jacas *et al.*, 2005). Consiste en favorecer la llegada y el desarrollo de los enemigos naturales que se quieren combatir, previamente al inicio o crecimiento de la cosecha de las plantas a proteger, con el fin de

proceder a su disminución y destrucción. Este método de control biológico es la base para el control de plagas y enfermedades en muchos sistemas de invernadero.

4.6.2.3.2 Control inundativo. Se hacen introducciones repetidas de cantidades elevadas del enemigo para un control suficiente de la plaga (Jacas *et al.*, 2005). Es diferente de las estrategias clásicas e inoculativas, por lo que la liberación de enemigos naturales y no de sus descendientes son agentes activos de control, típicamente, liberaciones a gran escala de enemigos naturales son repetidas varias veces durante el ciclo de cosecha (Ezziyyani *et al.*, 2006).

4.6.3 Importancia del control biológico

Los productos agrícolas que, que van del productor al consumidor, ven mermada su calidad y por lo tanto su comercialización, debido a factores climáticos, ataques de plagas (artrópodos, roedores y malezas) y patógenos (microorganismos causantes de enfermedades). Estos factores ocasionan daños durante el crecimiento y maduración en campo y durante el manejo que va de la cosecha hasta su exposición en el anaquel en el punto de venta. Todos estos factores determinan el éxito o fracaso económico del producto, y por ende el del precio de venta al consumidor. Es también importante considerar el creciente interés público por la calidad del producto en lo que se refiere a la ausencia de residuos de agroquímicos o de patógenos (por ejemplo, contaminación con la bacteria *Salmonella* spp.) a lo cual, de manera genérica, se le ha denominado “inocuidad alimentaria”. Estos factores de calidad pueden no afectar la apariencia del producto pero sí impactar fuertemente tanto en el costo de producción como en el costo al consumidor (Serrano y Galindo, 2007).

En sistemas agrícolas, los patógenos de plantas y sus antagonistas son particularmente importantes. Los patógenos de plantas actúan en el suelo, en la rizósfera o infectan tallos, causando que las plántulas se marchiten y, por tanto, provocan grandes pérdidas. Éstos pueden ser específicos, aunque la mayoría ataca una amplia gama de plantas hospederas. Existen evidencias de que las prácticas agrícolas causan más alteraciones cuantitativas que cualitativas en la comunidad de microhongos del suelo. La

supresión de patógenos de plantas puede resultar intrínseca en los suelos, pero también es posible que se mantenga o incremente con algunas prácticas agrícolas específicas, tales como la incorporación de materia orgánica, plantas utilizadas como cubierta vegetal y la diversificación de cultivos. Algunos elementos biológicos han sido identificados como los principales factores de la supresión de enfermedades. Se ha demostrado experimentalmente que la introducción de antagonistas específicos como *Trichoderma* spp. o *Coniothyrium minitans* pueden reducir la incidencia de una variedad de enfermedades en el suelo. El mantenimiento de la diversidad de hongos del suelo debería, por ende, beneficiar directamente la agricultura sustentable, mediante el suministro de nutrientes, una mejor estructura física del suelo y el control de antagonistas de los patógenos de las plantas en el suelo (Moreira *et al.*, 2012).

La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado paso a la práctica de la inoculación de antagonistas. En efecto, la demanda impuesta por la sostenibilidad está conduciendo el uso de estrategias que mantenga una protección del medio ambiente. En este contexto, el uso de inóculos microbianos, incluyendo algunos que han sido modificados genéticamente, está cobrando nuevamente interés. Los microorganismos más usados pertenecen a los géneros *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., *Streptomyces* spp., etc. Aunque también los hongos micorrizicos, han sido objeto de investigaciones orientadas a su aplicación práctica (Ezziyyani *et al.*, 2006).

A pesar de la gran cantidad de esfuerzos académicos invertidos en el estudio y desarrollo de estos agentes de control biológico, es paradójico que el uso comercial y a gran escala de este tipo de productos ha sido muy limitado. Una de las limitantes más importantes para alcanzar el uso a nivel comercial de los agentes de control biológico es que, a diferencia de los pesticidas o antimicrobianos químicos, que generalmente hacen disminuir rápidamente la densidad de la plaga o la severidad de la enfermedad, la eficacia de los productos biológicos en el campo depende sensiblemente de factores ambientales difíciles de controlar (temperatura, humedad, acidez, exposición a luz ultravioleta, etc.). Además, su espectro de acción contra diferentes plagas o patógenos es menor que el de los plaguicidas o antimicrobianos químicos. Por otra parte, la

comercialización de los agentes de control biológico se ha visto limitada por la falta de métodos rigurosos de evaluación que permitan anticipar de manera racional las complejas interacciones entre planta, la plaga o agente patógeno, el agente de control biológico, el suelo y el ambiente, presentes todos en el campo. Finalmente, el uso de agentes de control biológico en el control de plagas o enfermedades requiere de un manejo y aplicación más complejos que los requeridos para el uso de pesticidas o antimicrobianos químicos. Ello conduce a una mayor variabilidad y mayor tiempo de respuesta para poder observar los resultados en el campo. Esto, a su vez, es uno de los mayores problemas para su comercialización y uso extensivo (Serrano y Galindo, 2007).

Los costos de control biológico pueden resultar menores y de mayor eficiencia, respecto al uso de otras prácticas de control tradicionales, pues, aunque los antagonistas pueden actuar en forma más lenta y en menor escala, su acción puede ser más estable y duradera que el control químico; en este caso, el efecto es temporal y se requieren aplicaciones continuas para lograr una protección adecuada de las plantas (Sarandon y Flores, 2014). En algunos países se tienen ya disponibles a nivel comercial microorganismos antagonistas para controlar algunas enfermedades bióticas de las plantas cultivadas. En México son pocas las investigaciones que se han generado e implementado en el uso de microorganismos antagonistas. La mayoría en laboratorio y muy pocas en campo (Zavaleta, 1999).

4.6.4 Ventajas y desventajas del control biológico

4.6.4.1 Ventajas

- Son de baja toxicidad para el ser humano, lo que permite una mayor flexibilidad en las aplicaciones cercanas a la cosecha y acortan los tiempos de reingreso.
- Son compatibles con diversos productos químicos.
- Facilitan alcanzar certificaciones en mercados donde se exigen dosis menores o ausencia de residuos químicos.
- Existe una tendencia mundial a preferir alimentos más sanos, sin residuos químicos, lo que favorece el desarrollo de estos productos.

- Se degradan más rápidamente que un fungicida convencional, reduciendo riesgos en el ambiente (Apablaza y Barrera, 2009).
- Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluido el ser humano.
- La resistencia de las plagas al control biológico es muy rara.
- El control biológico con frecuencia es a largo plazo, pero permanente.
- La relación costo/beneficio es favorable.
- Evita plagas secundarias. No existen problemas con intoxicaciones (Guedez *et al.*, 2008)
- Tiene efectos suaves sobre el equilibrio edáfico y no elimina los organismos que ayudan a mantener al patógeno controlado.
- No tiene efectos dañinos para el hombre, otros cultivos, árboles, animales, vida silvestre y otros organismos beneficiosos.
- Efectivo en ambientes naturales y artificiales (Sivila y Alvares, 2013).

4.6.4.2 Desventajas

- Con respecto a los pesticidas químicos es que generalmente tienen un espectro de acción menor, una acción de control más lenta y un nivel de control inferior (Apablaza y Barrera, 2009).
- Ignorancia sobre los principios del método.
- Falta de apoyo económico, para la adquisición de equipos indispensables para la producción y comercialización.
- No está disponible en la gran mayoría de los casos. Problemas con umbrales económicos bajos.
- Enemigos naturales más susceptibles a los plaguicidas que las plagas.
- Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata (Guedez *et al.*, 2008)
- No hay una conciencia generalizada del consumo de productos libres de residuos de agroquímicos.

- Insuficiente formación de técnicos y/o extensionistas rurales en manejo agroecológico en general y de control biológico en particular (Sivila y Alvares, 2013).

4.6.5 Hongos como agentes de biocontrol

Los hongos del suelo juegan un papel clave en los procesos de descomposición que mineralizan y reciclan nutrientes de plantas. En el suelo, los hongos interactúan con una compleja comunidad microbiana que incluye: bacterias, actinomicetos y pequeños invertebrados. Los hongos son una parte importante de la cadena alimenticia en el suelo, principalmente para la mesofauna que habita en el suelo. En los ecosistemas agrícolas, los patógenos de plantas actúan en el suelo y en la rizósfera, causando una notable reducción en las cosechas y afectando su calidad (Bonkowski *et al.*, 2000). Las actividades agrícolas pueden afectar la diversidad de organismos presentes en el suelo, los cuales juegan un importante papel en el reciclaje de nutrientes o son mediadores del equilibrio entre los patógenos y sus antagonistas (Moreira *et al.*, 2012).

Los métodos de control biológico que se utilizan para proteger directamente a las plantas del ataque de los patógenos incluyen la acción de microorganismos antagónicos antes o después de que ocurra la infección (Agrios, 2001).

Los microorganismos antagónicos pueden consistir en cepas avirulentas del mismo patógeno, que destruyen o inhiben su desarrollo, como ocurre en los fenómenos de hipervirulencia y la protección cruzada. En años recientes, el hombre ha intentado sacar ventaja de dichos antagonismos biológicos naturales y ha estado desarrollando estrategias que le permitan aplicar eficazmente el control biológico contra diferentes enfermedades de plantas. Aun cuando estén sujetos a numerosas limitaciones ecológicas, así que es de esperarse que los antagonismos biológicos formen una parte importante de las medidas de control empleadas para combatir muchas enfermedades (Agrios, 2013).

La investigación de los hongos como antagonistas se ha enfocado principalmente en su efecto sobre hongos patógenos cuyo modo de acción puede estar basado en la competencia, antibiosis, inducción de resistencia y micoparasitismo. Cabe señalar que el

éxito de los hongos como agentes antagonicos, además de los múltiples mecanismos de acción que presentan, está basado en su rápido crecimiento y diseminación. Esto les permite la proliferación de sus hifas en el suelo y la rizósfera, confiriéndoles mayor potencial comparado con las bacterias (Ferrera y Alarcon, 2007).

En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagonica hacia microorganismos fitopatogénos, entre los antagonistas estudiados en sistemas que involucran patógenos del suelo, de enfermedades como: secadera, pudriciones de raíz y de la corona, así como marchitez vascular, con sus respectivos agentes causales, se a evaluado con éxito a *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Pythium* spp., *Laetisaria* spp., *Sporidesmium* spp., *Coniothyrium* spp., *Verticillium* spp., y *Talaromyces* spp. (Nelson, 1991), *Gliocladium* spp., *Fusarium* spp., y *Pythium* spp. no patogénicos (Jensen y Wolffhechel, 1995). Aunque existe un gran número de especies y aislados de hongos filamentosos como agentes de biocontrol, el género *Trichoderma* spp. sigue siendo el predominante (Ferrera y Alarcon, 2007). Varios investigadores han encontrado a diversas especies de *Trichoderma* spp. como antagonistas muy eficientes de diferentes especies de hongos fitopatogénos. La especie *Trichoderma harzianum* ha sido, hasta el momento, el hongo antagonista más utilizado en el control de enfermedades de las plantas (Sarandon y Flores, 2014). Probablemente debido a su fácil propagación y rápido crecimiento, así como por el amplio espectro de hospederos susceptibles a su ataque (Ferrera y Alarcon, 2007).

Un antagonista es aquel microorganismo saprobio capaz de interferir en el ciclo de vida de los patógenos vegetales (Sarandon y Flores, 2014). Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales. Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características generales: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de las partes de la planta que son de interés, y de persistir en ellas de manera efectiva; mayor habilidad que el patógeno de adquirir los nutrientes y c) capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales. Por otra parte, se

deben considerar otras características específicas del microorganismo antagonista: su estabilidad genética, bajo requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, amplio espectro contra organismos patógenos de frutos y hortalizas, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, mantenimiento prolongado en una formulación, fácil aplicación sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistencia y compatibilidad a fungicidas usados comercialmente y no patogénico sobre el hospedero (Hernandez *et al.*, 2007).

Los procedimientos clásicos microbiológicos para estudiar los hongos del suelo se basan en cultivos que implican el aislamiento de propágulos microbianos o hifas activas que crecen en el suelo, y su crecimiento en un medio de cultivo axénico para su posterior identificación y cuantificación. Las metodologías para aislar y cultivar hongos de ecosistemas complejos, tales como suelos que muestran limitaciones inherentes debido a la naturaleza de las especies y la inhabilidad de los medios de cultivo para copiar con exactitud los hábitats del suelo. Incluso el análisis de abundancia relativa de especies cultivables recuperadas del suelo, puede no ser representativo de la dinámica de las comunidades del suelo, debido a que los medios de cultivo imponen nuevas condiciones selectivas y pueden introducir un sesgo en los análisis. Una medida confiable de las comunidades de hongos en el suelo sin prejuicios requiere del seguimiento de un laborioso programa de aislamientos sistemáticos, con diferentes medios de cultivos y estrategias de aislamiento, que cubran las diferentes idiosincrasias de la diversidad taxonómica y grupos fisiológicos de hongos presentes en los ecosistemas del suelo. No obstante, afirmaciones genéricas de que únicamente el 1% de los “microorganismos” del suelo son cultivables aumentan la dificultad y no tienen en cuenta la inmensa diversidad biológica que realmente representan dichos microorganismos (Moreira *et al.*, 2012).

4.6.6 Mecanismos de acción

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen las enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Ezziyani *et al.*, 2006).

Los mecanismos de acción de los agentes de control biológico con base en la ecología microbiana, incluyen acción directa sobre el patógeno a través de la antibiosis, competencia por nutrientes o nichos, y el parasitismo o lisis del agente patógeno. El otro mecanismo es indirecto y opera por alteración de la fisiología de la planta aumentando su capacidad de resistencia al ataque del patógeno, lo cual se denomina protección sistémica o resistencia inducida (Sarandon y Flores, 2014). Los métodos de control biológico que se utilizan para proteger directamente a las plantas del ataque de los patógenos incluyen la acción de microorganismos antagonistas en el uso de infección antes o después de que ocurra la infección (Agrios, 2001).

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Ibarra, 2006) y efectos tóxicos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y efectos tóxicos indirectos por la actividad metabólica del organismo antagonista (Agrios, 1996).

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existen condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos benéficos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Ibarra, 2006).

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre las plantas o en las heridas. En

general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es importante a tener en cuenta para seleccionar a un antagonista. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción, se han descrito varios mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de los patógenos (Ezziyani *et al.*, 2006).

4.6.6.1 Competencia. Está constituido un mecanismo de acción antagónica muy importante (Fernández, 2001). Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Este tipo de antagonismos se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, etc. (Infante, 2009).

4.6.6.1.1 Competencia por nutrientes. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de poscosecha típicamente dependientes de los nutrientes, como hongos necrotróficos sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Esos nutrientes se encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos (Mondino, 2003).

4.6.6.1.2 Competencia por espacio. Una mayor velocidad de crecimiento, o una mayor eficiencia en el uso de un determinado recurso por parte del antagonista, hace que el mismo no pueda ser utilizado o no quede disponible para el patógeno. Para que exista la competencia el recurso debe ser escaso en el medio (Mondino, 2003).

4.6.6.2 Antibiosis. Es la inhibición o destrucción de un organismo por los productos del metabolismo del otro. En sentido estricto es el antagonismo mediado por metabolitos específicos o no específicos de origen microbiano. Enzimas líticas,

compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas pueden interrumpir la síntesis de la pared celular y la elongación hifal de los hongos patógenos (Sarandon y Flores, 2014).

El biocontrolador produce un compuesto químico como un antibiótico o toxina que mata o tiene algún efecto contra el patógeno (Apablaza y Barrera, 2009). Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para los microorganismos patógenos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). Estos metabolitos volátiles y no volátiles, son del tipo antibiótico como: viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide. De todas estas micotoxinas la más representativa es Trichodermin que actuaría inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos, por lo tanto su reproducción (Sivila y Alvares, 2013).

4.6.6.3 Parasitismo. El antagonista se alimenta del patógeno, resultando en una directa inhibición o destrucción de las estructuras del mismo (Apablaza y Barrera, 2009). El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulosa, B1, 3- glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Fernández, 2006).

4.6.6.4 Interacción directa con el patógeno (Micoparasitismo y lisis enzimática).

El micoparasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, Beta-1-3- glucanasa y proteasa, que lisan (rompen) las paredes de las hifas, o esclerocios de hongos parasitado (Orietta *et al.*, 2001). Un ejemplo es el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma harzianum* sobre las hifas de *Rhizotonia solani* (Sarandon y Flores, 2014).

4.6.6.5 Resistencia inducida. Se entiende como el aumento de las respuestas de defensa de las plantas provocado por un estímulo externo (Hernández, 2008). Algunos agentes de biocontrol producen sustancias inductoras (elicitors) capaces de activar

cambios fisiológicos y bioquímicos en las plantas (Ej. síntesis de fitoalexinas), que incrementan su tolerancia a subsecuentes infecciones por una variedad de patógenos. Así por ejemplo, entre los mecanismos responsables de la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. se incluye la activación en la planta de compuestos relacionados con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección. Ese fenómeno denominado resistencia inducida ocurre a nivel local o en puntos distantes al sitio de infección del antagonista (resistencia sistémica inducida). La resistencia inducida puede ser biótica o abiótica, dependiendo de su origen.

4.6.6.5.1 Inductores bióticos se encuentran involucrados los agentes microbianos, tales como las rizobacterias y algunos hongos saprótrofos (Ej. *Pseudomonas* spp; *Trichoderma* spp.; *Pichia guilliermondii*) o bien razas avirulentas de un patógeno (Ej. *Agrobacterium radiobacter* K84; razas de virus atenuadas; *Fusarium oxysporum*), además de varios compuestos naturales (Ej. quitosano) (Sarandon y Flores, 2014).

4.6.6.5.2 Inductores abióticos son de naturaleza química o física y resultan de la aplicación exógena de diferentes sustancias activadoras o estímulos físicos, respectivamente. Los elicitores químicos incluyen el acibenzolar-S-metil, ácido salicílico, ácido nicotínico, ácidos grasos, glicoproteínas, proteínas, péptidos, glicolípidos, lípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En relación a los elicitores físicos, se han citado tratamientos con calor o bajas dosis de luz ultravioleta que estimulan los mecanismos de defensa de las plantas (Sarandon y Flores, 2014).

Una de las primeras actividades en la exploración de nuevas cepas de antagonistas es la evaluación *in vitro*. En este caso, el antagonismo directo de la inhibición del crecimiento se estima por medio de confrontación en cultivo dual y principalmente por la medición radial del crecimiento del hongo fitopatógeno, y como testigo el crecimiento del patógeno sin confrontación (Chakraborty y Chatterjee, 2008), o al tomar como testigo la distancia más larga del crecimiento en ensayo de confrontación (Escobar *et al.*, 2004).

V. MATERIALES Y METODOS

Para la realización del presente trabajo experimental, sus actividades se desarrollaron en dos etapas:

- 1) Etapa de campo
- 2) Etapa de laboratorio

5.1 Etapa de campo

El muestreo de suelo y la colecta de mazorcas se realizo en una parcela de los municipios indicados en el cuadro 1, dichas parcelas con antecedentes de la presencia de diente de caballo y de *Fusarium* en ciclos previos.

Cuadro 1. Localidades en donde se realizó el muestreo de suelo y colecta de mazorcas infestadas por *Fusarium verticilloides*.

Municipio	Localidad	Altitud m.s.n.m	Variedad de maíz	Clima	Tipo de suelo
Calimaya	San Andrés	2,626	Faisán	Templado subhúmedo con lluvias en verano	Phaeozem, Andosol, Arenosol, Vertisol
Almoleya de Juárez	Mina México	2,605	HC8	Templado subhúmedo con lluvias en verano	Andosol Phaeozem, Vertisol, Luvisol, Cambisol.
Villa Victoria	Laguna Seca	2,729	Criollo	Templado subhúmedo con lluvias durante el verano	Andosol, Luvisol, Feozem. Planosol,

Las parcelas seleccionadas para la realizar el muestreo fueron aquellas en las que se han tenido antecedentes de la presencia de las dos enfermedades. El muestreo se realizó en forma de zig-zag, tomando 10 submuestras de suelo a una profundidad de 10 a 15 cm. Las submuestras se mezclaron para conformar una sola muestra compuesta de suelo por cada municipio.

De cada una de las muestras compuestas se tomaron 2 kg que se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMéx. Las muestras se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su procesamiento. Por otro lado, en los mismos sitios de muestreo, se colectaron esclerocios de *Claviceps gigantea* durante el mes Noviembre. Los esclerocios permanecieron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

La colecta de la mazorca se realizó aleatoriamente dentro de la parcela pero dirigida a las mazorcas que presentaron los signos de la enfermedad.

5.2 Etapa de laboratorio

5.2.1 Aislamiento e identificación de hongos antagonistas

Los aislamientos de hongos antagonistas se obtuvieron mediante el método de disoluciones en placas que consistió:

- 1) De la muestras de suelo homogenizada, se tomó una porción de 10 g de suelo que se diluyó en 90 mL de agua destilada estéril dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL de capacidad. Se agitó durante un lapso de 20 a 30 minutos.
- 2) De la suspensión, se tomó una alícuota de 1 mL que se diluyó en un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril. Estas diluciones se realizaron por cinco ocasiones consecutivas.
- 3) De las últimas tres diluciones se tomó 1 mL que se depositó sobre el medio de cultivo PDA, distribuyendo homogéneamente y se incubaron a 24°C por un periodo de 5 a 8 días para lograr el crecimiento y esporulación de los hongos.

- 4) De los hongos que presentaron crecimiento, se separaron y resembraron en medio PDA hasta obtener colonias puras, y así proceder a las confrontaciones contra *Sphacelia* spp y *Fusarium verticilloides*.
- 5) Los hongos aislados, se identificaron morfológicamente según las claves de Barnett *et al* (1972). Una vez que se tuvo evidencia de su acción antagónica.

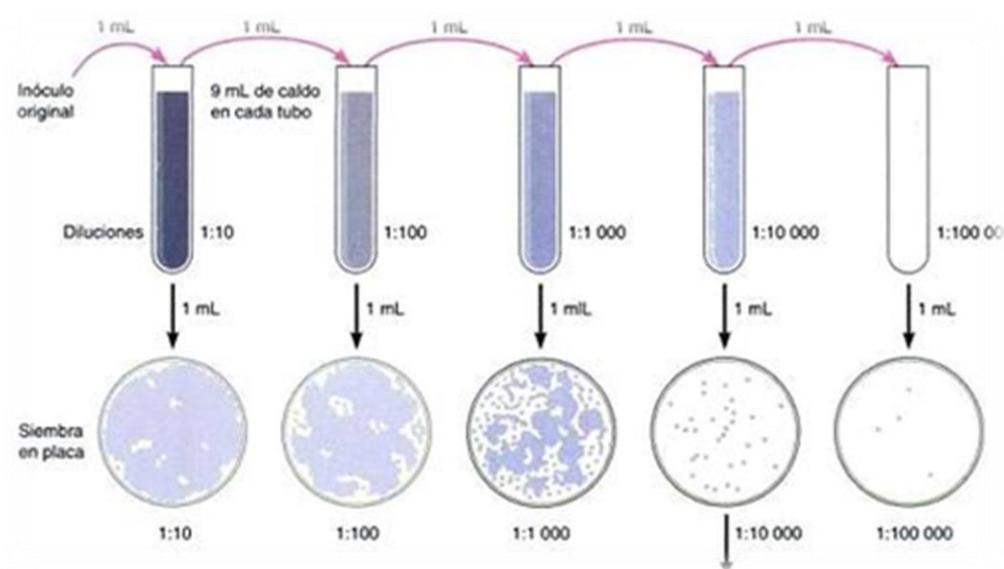


Figura 5. Diluciones de placa realizada en las tres muestras de suelo.

5.2.2 Aislamiento de *Sphacelia* spp. y *Fusarium verticilloides*

5.2.2.1 *Sphacelia* spp.

A partir de la siembra de porciones de esclerocios se realizaron cultivos monospóricos para el aislamiento de *Sphacelia* spp. Las porciones o trozos de los esclerocios se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos, los cuales se sembraron en medio PDA.

De los crecimientos obtenidos, se tomaron conidios en forma individual y unitaria para colocarlos en medio Agua-Agar para su crecimiento. De cada crecimiento se realizó una transferencia del micelio al medio PDA para obtener colonias puras hasta la producción de masas de conidias que permitió su reconocimiento morfológico según las claves de Barnett et al (1972).

Los pasos del proceso de obtención de cultivos monospóricos son:

- Paso 1.

Observar mediante un estereoscopio la masa de conidias del hongo.

- Paso 2.

Tocar, con un alfiler flameado, la masa de conidias para que una de ellas quede adherida a la punta del alfiler.

- Paso 3.

Desprender (sobre el medio de cultivo PDA de una caja Petri) las conidias del alfiler con agua destilada estéril contenida en una pipeta: se vertieron de 4 a 6 gotas del agua en el alfiler suspendido sobre el medio. Esparcir bien, con un triángulo de vidrio, sobre la superficie del medio las gotas de agua con las conidias. Esta operación exige el uso de instrumentos estériles; el triángulo de vidrio, por ejemplo, se debe flamear antes de cada uso para no contaminar el medio.

- Paso 4.

Incubar las cajas Petri del paso anterior a 20°C durante 24, 48 y 72 horas. Pasado ese tiempo, las conidias empiezan a germinar y están listas para ser transferidas individualmente (Castellanos *et al.*, 2011).

5.2.2.2 *Fusarium verticilloides*

Los granos de mazorca se desinfestaron superficialmente y se incubaron primero sobre una rodaja de PDA por siete días a 20°C: luego se transfirieron a cajas Petri con extracto de malta-agar y se dejaron incubar por 10 días (Sosa *et al.*, 1996).

De los crecimientos obtenidos se aumentó el hongo en medio PDA para posteriormente realizar las confrontaciones.

5.2.3 Identificación de los hongos

Se tomaron muestras de cada uno de los crecimientos miceliales obtenidos de las cepas de los hongos aislados, las cuales se observaron por medio del microscopio compuesto, donde se identificaron de acuerdo a las características morfológicas según Barnett y Hunter (1972)

5.2.4 Pruebas de antagonismo *in vitro*

Los crecimientos de *Sphacelia* spp. y *F. verticilloides* se confrontaron con los hongos aislados del suelo. Se tomó un disco de agar de 5 mm de diámetro con crecimiento fungoso de cada tratamiento y otro del patógeno u organismo prueba; se colocaron en los extremos de una caja de Petri de PDA, separados aproximadamente 6 cm uno de otro, tal como lo indican Bell *et al.* (1982). Las cajas se incubaron a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ durante quince días.

Adicionalmente se contó con una cepa de *Trichoderma* spp. para confrontar con *Sphacelia* spp. y *Fusarium* spp. y que servirá como comparativo para las cepas de los hongos nativos.

Al tercer día de confrontación se comenzaron las mediciones de diámetro (cm) de cada uno de los crecimientos de las colonias en dirección al patógeno y al antagonista.

Posteriormente la medición se realizó cada tercer día hasta los 15 días después de la confrontación inicial de los hongos.

5.2.5 Variables a evaluar

Los crecimientos fungosos se midieron (en centímetros) para determinar: 1) crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA) y 2) crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (CDP). Además se determinó la diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DF), y la eficiencia de biocontrol (EB).

Eficiencia de biocontrol: Se determinó empleando la fórmula: $EB = (CDA - CDP / CDA) \times 100$, adaptada de la fórmula de Abbot (Unterstenhofer, 1976); donde: EB = Eficiencia de biocontrol en porcentaje, CDA= crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista en cm y CDP = crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno en cm (Aquino, 2007).

A los 10 días de la confrontación se observaron las siguientes respuestas de antagonismo: a) Sobre crecimiento del micelio del antagonista hacia el patógeno y b) detención del crecimiento de la colonia del patógeno.

5.2.6 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones de cada tratamiento. Los resultados se analizaron estadísticamente para obtener el análisis de varianza con el programa SAS versión 9.0. Para el caso en que existió diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, se realizó la prueba de separación de medias con la prueba de Tukey al 0.05%.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento e identificación de los hongos antagonistas

Se colectaron tres muestras de suelo en tres localidades diferentes del Estado de México. Se obtuvieron 10 aislamientos de hongos (Figura 6). Los cuales se identificaron de acuerdo con características morfológicas según Barnett y Hunter (1972), 6 cepas pertenecen a la localidad de Mina México, Almoloya de Juárez; 3 de Laguna Seca, Villa Victoria y 2 de San Andrés Calimaya (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cepas de los hongos aislados e identificadas en las 3 localidades evaluadas

Mina México	Villa Victoria	Calimaya
<i>Penicillium</i> spp 1MM ¹⁾	<i>Penicillium</i> .3 1VV ²⁾	<i>Pythium</i> spp. 1 Ca ³⁾
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	<i>Penicillium</i> spp 2VV	<i>Alternaria</i> spp. 2Ca
No identificado. 3MM	<i>Penicillium</i> spp. 3VV	
<i>Penicillium</i> spp. 4MM		
<i>Penicillium</i> spp 5MM		

¹⁾ MM: Mina México, ²⁾ VV: Villa Victoria, ³⁾ Ca: Calimaya

Los hongos *Pythium* spp. y *Alternaria* spp. hasta el momento no se han reportado como antagonistas a otros patógenos, aunque si se han reportado como patógenos en otros cultivos, sin embargo en maíz no se reportan como causante de alguna enfermedad. Jensen Wolffhechel (1995) mencionan a *Pythium* spp. no patogénico, como organismo con capacidad antagónica hacia microorganismos patógenos.

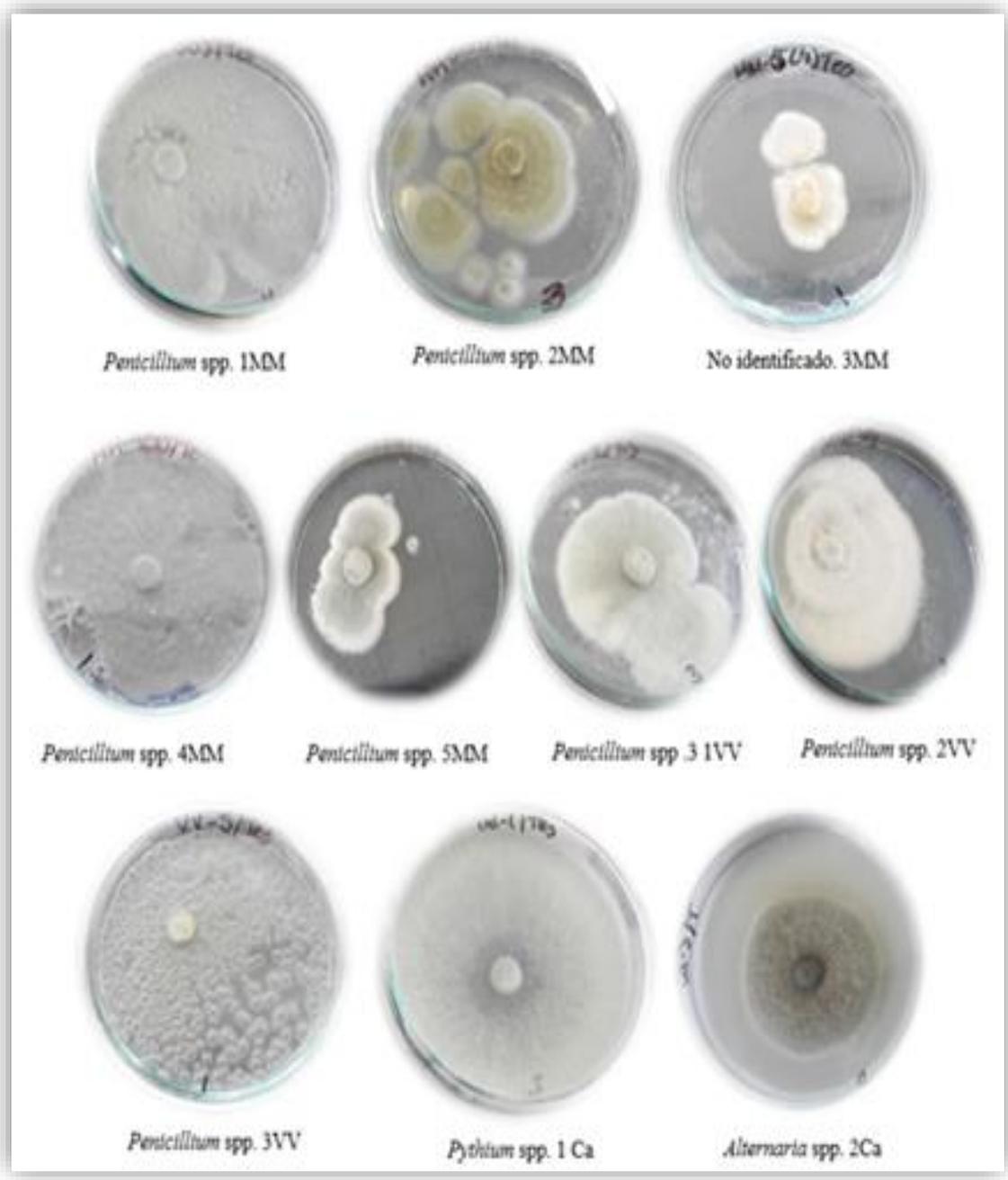


Figura 6. Crecimiento en medio PDA de las cepas de los hogos nativos aislados.

Como se observa en el cuadro 2, el género *Penicillium* spp. predominó entre las cepas aisladas como posibles antagonistas dicho resultado es similar a lo reportado por Mondino (2003). Aunque es pertinente mencionar que este hongo es causante de enfermedades en otros cultivos, sobre todo en la etapa de postcosecha; así mismo en el maíz se reporta como uno de los hongos causantes de pudrición de mazorca (De León, 2008), sin embargo hay investigaciones sobre la especie *Penicillium oxalicum* la cual según (Pascual *et al.*, 2000) como microorganismo capaz de cumplir eficazmente como agente de biocontrol frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, causante de la fusariosis del tomate.

Los resultados del presente ensayo indican que de las siete cepas de *Penicillium* spp. una de Villa Victoria *Penicillium* spp. 3VV y la otra de Mina México *Penicillium* spp. 1MM fueron las que durante la confrontación detuvieron el crecimiento radial de *F. verticilloides*; de tal forma que el hongo antagónico creció hasta colonizarlo en su totalidad (Figura 5 y 6).

Estos resultados concuerdan con lo observado por Alfonso *et al.* (1992) quienes indicaron que *P. oxalicum* es capaz de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en estudios realizados en condiciones “*in vitro*” de crecimiento dual o en confrontación, al tener la capacidad de producir enzimas líticas que degradan la pared celular del patógeno. Aunque en este ensayo no se trata de la misma especie de *Fusarium*, *Penicillium* spp. si actuó como antagonista aplicando sus mecanismos de acción como es la competencia por espacio (Mondino, 2003).

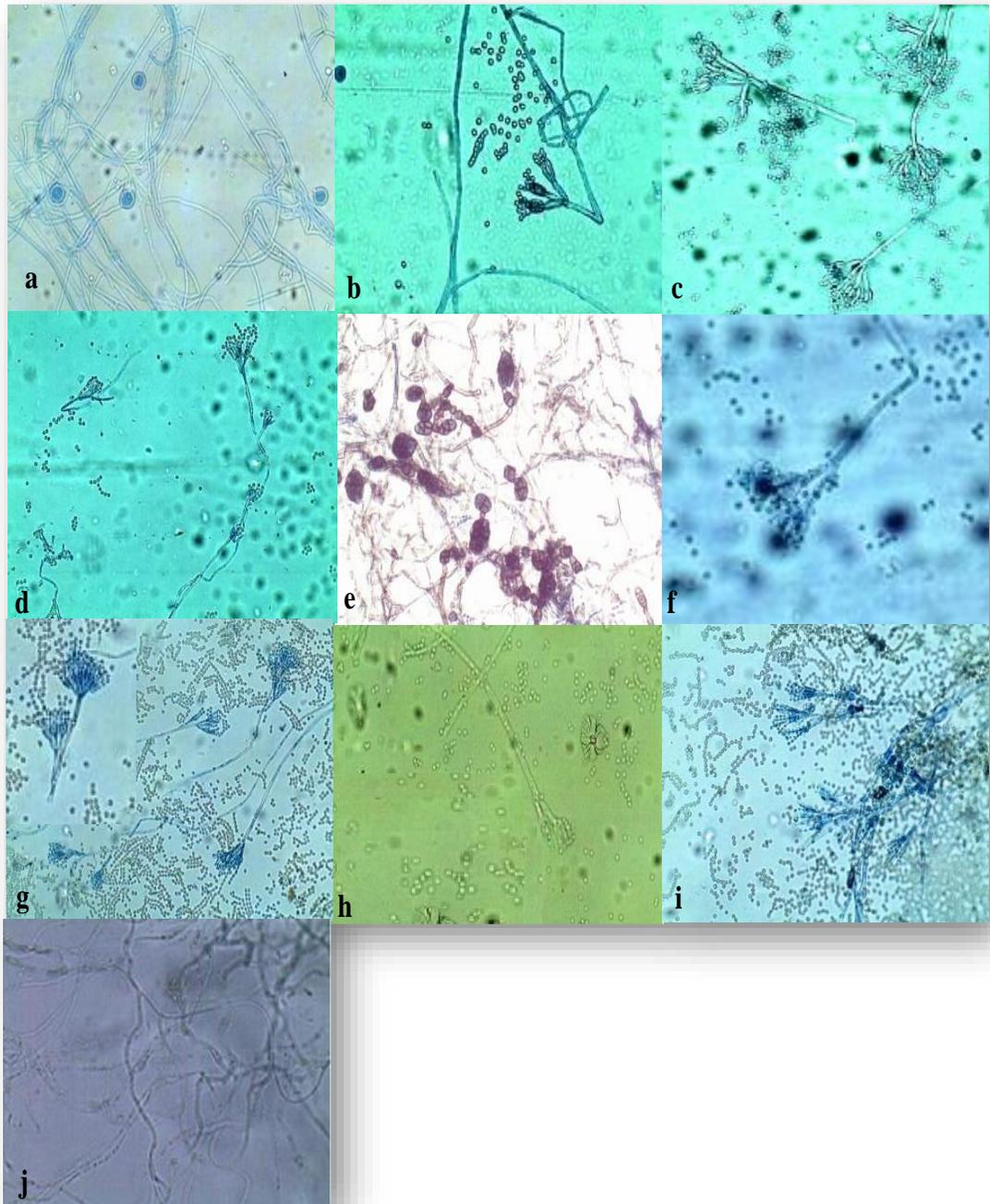


Figura 7. Características morfológicas de los aislados nativos. a) *Pythium* spp., b) *Penicillium* spp. 1MM, c) *Penicillium* spp. 2 VV, d) *Penicillium* spp. 5MM, e) *Alternaria* spp. 2Ca, f) *Penicillium* spp. 1 VV, g) *Penicillium* spp. 2MM, h) *Penicillium* spp. 4MM, i) *Penicillium* spp. 3V, j) No identificado 3 MM.

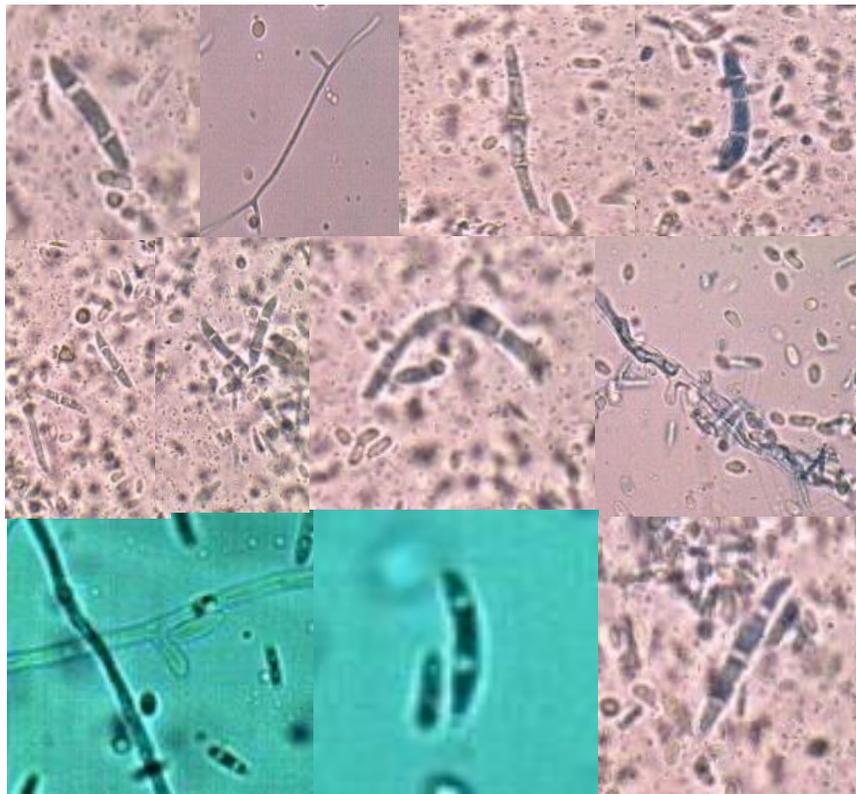


Figura 8. Características morfológicas a nivel género de *Fusarium verticilloides*.

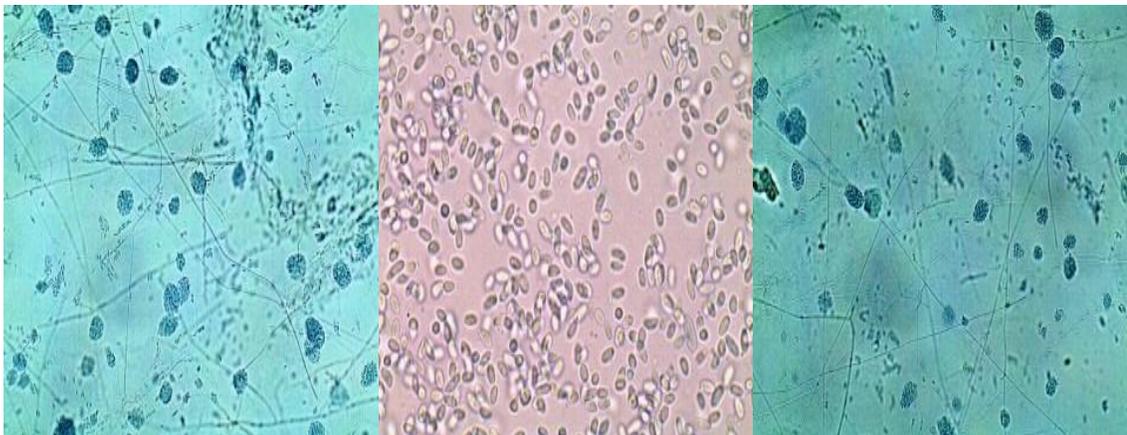


Figura 9. Características morfológicas a nivel de género de *Sphacelia* spp.

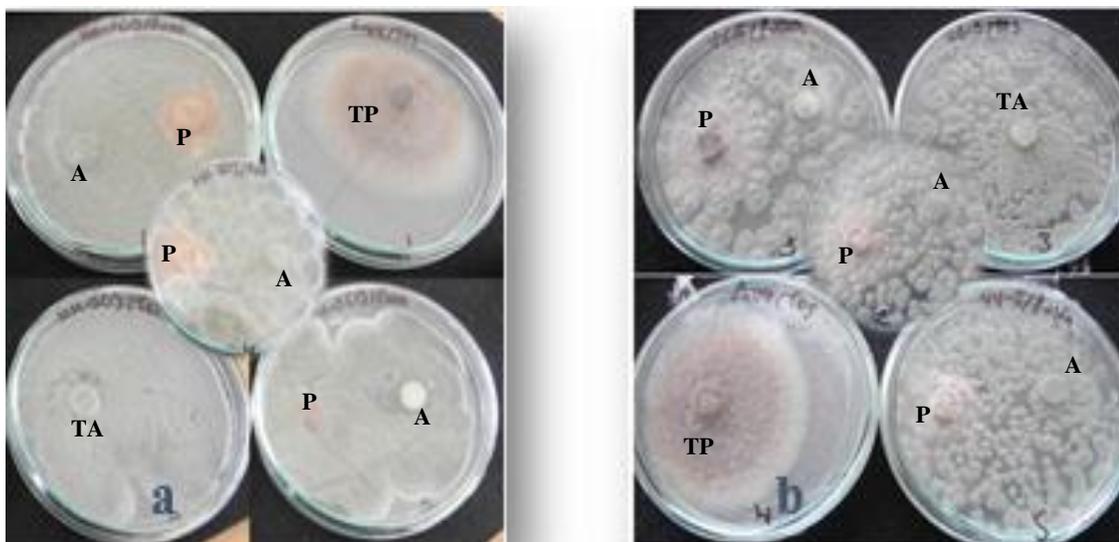


Figura 10. *Penicillium* spp. 1MM, b) *Penicillium* spp. 3VV en confrontación con *Fusarium verticilloides*. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno, TA: corresponde al testigo del antagonista, TP: testigo del patógeno).

6.2 Confrontaciones de *Fusarium verticilloides* con los hongos aislados

6.2.1 Crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA)

La alta diferencia significativa determinada con el análisis de varianza para esta variable indicó la existencia de que al menos un tratamiento fue diferente en el comportamiento del crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista.

F.V.	G.L.	Diámetro del antagonista
Tratamiento	10	41.60**
Error(CME)	33	0.4271780
C.V (%)		9.736888

G.L.: Grados de Libertad; C.V.: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.

La separación de medias con la prueba de Tukey al 0.05% indicó que los mayores crecimientos de diámetro correspondieron a las cepas de los hongos nativos *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV, *Penicillium* spp. 4MM y *Penicillium* spp. 1MM, mientras que, en términos estadísticos, los antagonistas *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV y *Penicillium* spp. 4MM fueron totalmente iguales, teniendo similitud con *Penicillium* spp. 1MM y *Penicillium* spp. 2MM, que fueron estadísticamente similares con *Trichoderma* spp. aunque *Trichoderma* spp. fue estadísticamente igual a los hongos *Alternaria* spp. 2Ca, *Penicillium* spp. 2VV; sin embargo numéricamente hubo diferencias entre estos (Cuadro 4), es decir cada hongo se comportó de manera distinta en el enfrentamiento con *F. verticilloides*.

Cuadro 4. Separación de medias para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA, en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.

Cepa	CDA (cm)
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	9 a*
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	9 a
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	8.81 a
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	8.44ab
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	7.96ab
<i>Trichoderma</i> spp.	6.96bc
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	5.79cd
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	5.41cd
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	5.21d
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	4.36de
No identificado 3MM	2.89e

*Las medias con la misma letra dentro de la columna son iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

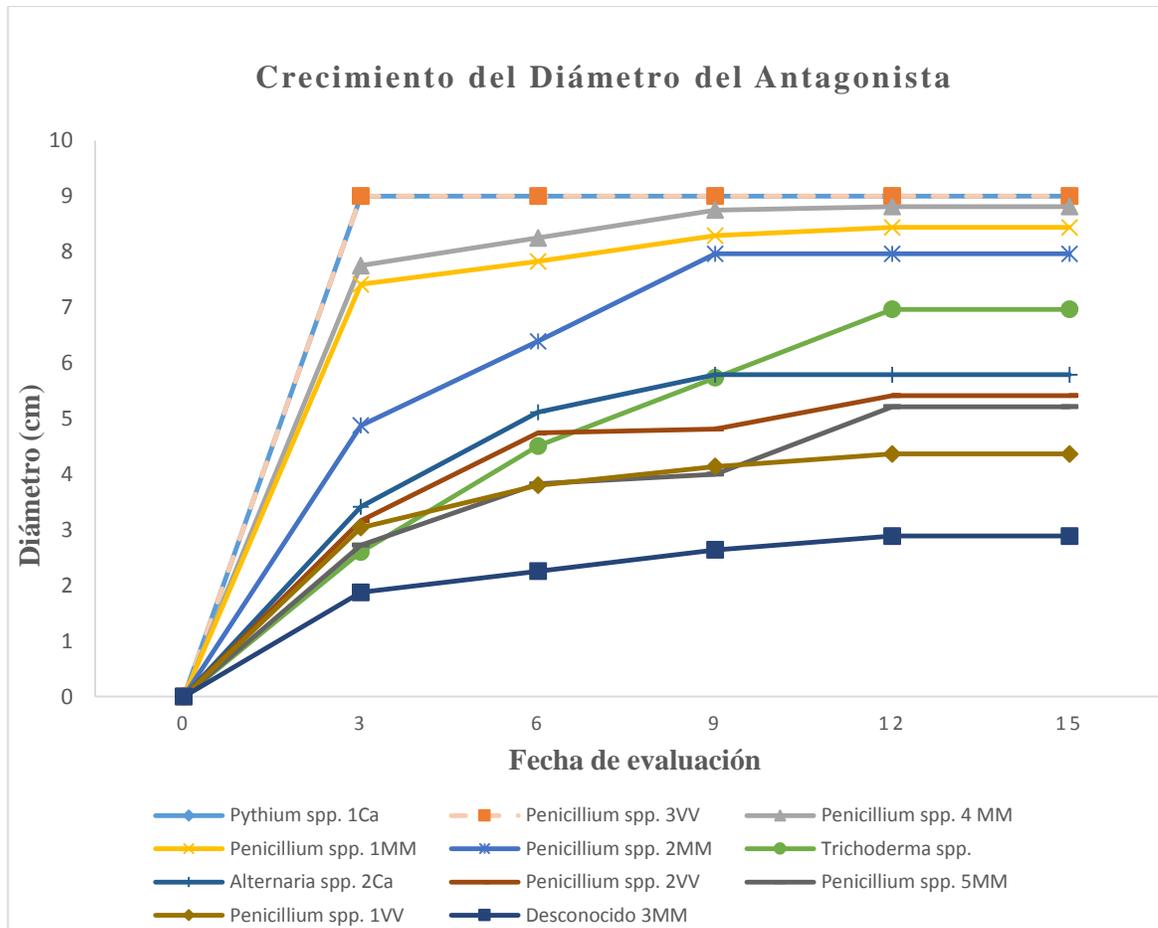


Figura 11. Crecimiento del diámetro del antagonista (cm) en confrontación con *Fusarium verticilloides* hasta los 15 días, la temperatura de incubación fue de 22°C.

Es necesario indicar que la colonia de *Pythium* spp. 1Ca presentó el mayor crecimiento de diámetro, se observó que al tercer día de la confrontación, este hongo ya había cubierto por completo la superficie del medio, cubriendo la colonia del patógeno e impidiendo así su desarrollo. Comportamiento similar tuvieron las cepas *Penicillium* spp. 4 MM, *Penicillium* spp. 1MM, *Penicillium* spp. 3VV quienes presentaron un sobre crecimiento, colonizando toda la superficie del medio reduciendo así la colonia del patógeno (Figura 14). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aquino *et al.* (2007) quienes observaron inhibición de crecimiento del micelio y sobre posición de las colonias por parte de las cepas nativas de *Trichoderma lignorum* sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. Similar efecto se

determinó con el aislamiento comercial biotrol, quienes atribuyeron enfatizar en que el modo de acción se debe al micoparasitismo que ejerce. Aunque los antagonistas encontrados en este trabajo no pertenecen al género *Trichoderma* spp. que bien son los más conocidos y estudiados para el control de hongos del suelo (León *et al.*, 2012). Por otro lado, Mondino (2003) señala que el hongo *Pythium* spp. actúa como hongo antagonista, además es considerado como patógeno de diferentes cultivos, en el caso de la cepa aislada es necesario realizar pruebas de patogenicidad, aunque en maíz no se reporta que cause algún tipo de enfermedad (Rodríguez y De León, 2008).

Se observó que el crecimiento del diámetro de las cepas *Alternaria* spp. 2Ca y *Penicillium* spp. 2VV; estadísticamente fueron iguales, hubo una diferencia numérica mínima (Cuadro 4); esto debido a que en el enfrentamiento con el patógeno el antagonista *Alternaria* spp. 2Ca detuvo su desarrollo micelial, al momento de entrar en contacto con este (Figura 13). En cuanto a *Penicillium* spp. 2VV se observó que su crecimiento colonizó más de 1/3 y menos de 2/3 de la superficie del medio (Figura 15, b). Mientras que los hongos *Penicillium* spp. 5MM, *Penicillium* spp. 1VV, No identificado 3MM fueron estadísticamente similares, siendo estos los que presentaron los menores crecimientos de diámetro (Cuadro 4).

Como se puede observar *Penicillium* spp. presentó varios aislamientos morfológicamente similares, sin embargo cabe señalar que su comportamiento en el crecimiento micelial sobre el medio PDA fue diferente (Figura 6) tanto en el desarrollo de la colonia a través del tiempo, como la manera de responder al estar en enfrentamiento con el patógeno, de igual forma la capacidad antagónica que presentaron por medio de sus diferentes mecanismos de acción; ya que estos pueden verse influenciados por el tipo de suelo, la temperatura, pH, humedad del ambiente y del suelo, tal como lo indica Howell (2003) al evaluar en condiciones *in vitro* a diversos de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate.

6.2.2 Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (CDP)

El análisis de varianza indicó la existencia de diferencia altamente significativa para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno, por lo que al menos un tratamiento fue diferente en su comportamiento.

Cuadro 5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (*Fusarium verticilloides*).

F.V.	G.L.	Diámetro del patógeno
Tratamiento	10	19.77**
Error(CME)	33	0.40632576
C.V (%)		12.38288

G.L.: Grados de Libertad; C.V.: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.

La separación de medias con la prueba de Tukey al 0.05 para la variable crecimiento del diámetro de *F. verticilloides*, en términos estadísticos y numéricos, se observó que al momento de estar confrontado con las cepas de *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. 2VV, *Penicillium* spp. 5MM, *Penicillium* spp. 1VV, Desconocido 3MM tuvo un crecimiento similar (Cuadro 6) esto debido a que el patógeno colonizo al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió a la invasión de los hongos antes mencionados pero sin embargo estos hongos no se dejaron inhibir por *F. verticilloides* ya que se presentó un halo de inhibición (Figura 15).

Cuadro 6. Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno, *Fusarium verticilloides* (CDP en cm) en cultivo dual con los diferentes antagonistas.

Cepa	CDP (cm)
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	6.75a*
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	6.46ab
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	6.46ab
No identificado 3MM	6.02ab
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	6.46ab
<i>Trichoderma</i> spp.	5.41abc
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	4.99bcd
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	4.38cd
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	3.61de
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	3.61de
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	2.60e

*Las medias con la misma letra dentro de la columna son iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

Es pertinente mencionar que el testigo tuvo un crecimiento de diámetro de 9 cm donde colonizó toda la superficie del medio (Figura 12) por lo que en todos los casos de confrontación, el crecimiento del diámetro del patógeno siempre se vio afectado por los antagonistas debido a los posibles modos de acción que tienen estos.



Figura 12. Crecimiento de la cepa de *Fusarium verticilloides* (testigo).

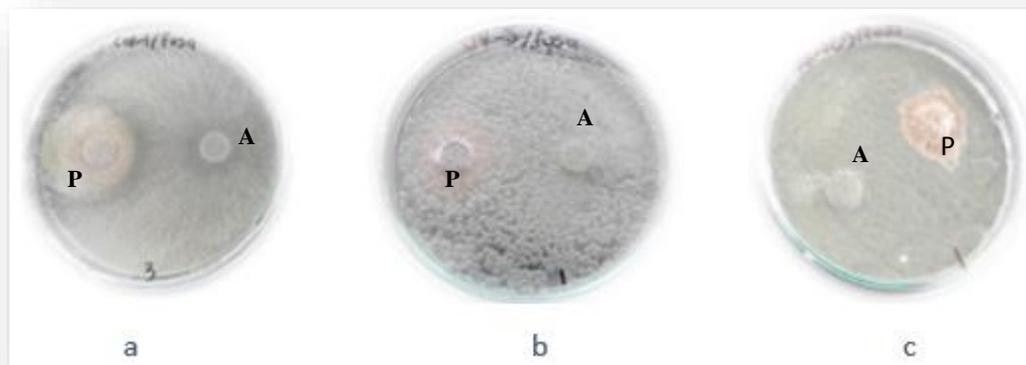


Figura 13. Crecimiento micelial de a) *Pythium* spp. 1Ca, b) *Penicillium* spp. 3VV, c) *Penicillium* spp. 1MM en confrontación con *Fusarium verticilloides*. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

6.2.3 Diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DC).

El análisis de varianza indicó la existencia de alta diferencia significativa para la variable diferencia de crecimiento, por lo que al menos un tratamiento fue diferente en su comportamiento (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable diferencia de crecimiento de la colonia entre el antagonista y el patógeno.

F.V.	G.L.	Diferencia de crecimiento
tratamiento	10	39.61**
Error(CME)	33	1.1614205
C.V (%)		68.87212

G.L.: Grados de Libertad; C.V.: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba de Tukey al 0.05% se encontró similitud respecto a las diferencias de crecimiento micelial dentro de las confrontaciones de *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV, *Penicillium* spp. 4 MM, *Penicillium* spp. 1MM con respecto a *F. verticilloides*, aunque numéricamente fueron diferentes, esto debido a la forma en que actúa cada antagonista frente al patógeno (Cuadro 8); en estas confrontaciones se observó la existencia de zonas de interacción, es decir áreas de la superficie del medio donde el antagonista crece sobre el patógeno, encontrando que, entre mayor fue la zona de intersección mayor fue la capacidad que tuvieron los aislados antagonísticos de colonizar sobre el patógeno (Figura 14), por ello, en estos enfrentamientos, se presentaron los valores más altos de diferencia de crecimiento (Cuadro 8) lo cual indica que prácticamente *F. verticilloides* fue inhibido por los hongos antes mencionados ya que el crecimiento de este se detuvo.

Cuadro 8. Diferencia de crecimiento (DC en cm) entre los hongos antagonistas y el patógeno *Fusarium verticilloides*.

Cepa	DC (cm)
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	6.40a*
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	5.39ab
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	4.44ab
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	4.83ab
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	2.98bc
<i>Trichoderma</i> spp.	1.55cd
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	-0.68de
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	-1.33e
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	-1.11e
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	-2.10e
No identificado 3MM	-3.14e

*Las medias con la misma letra dentro de la columna son iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

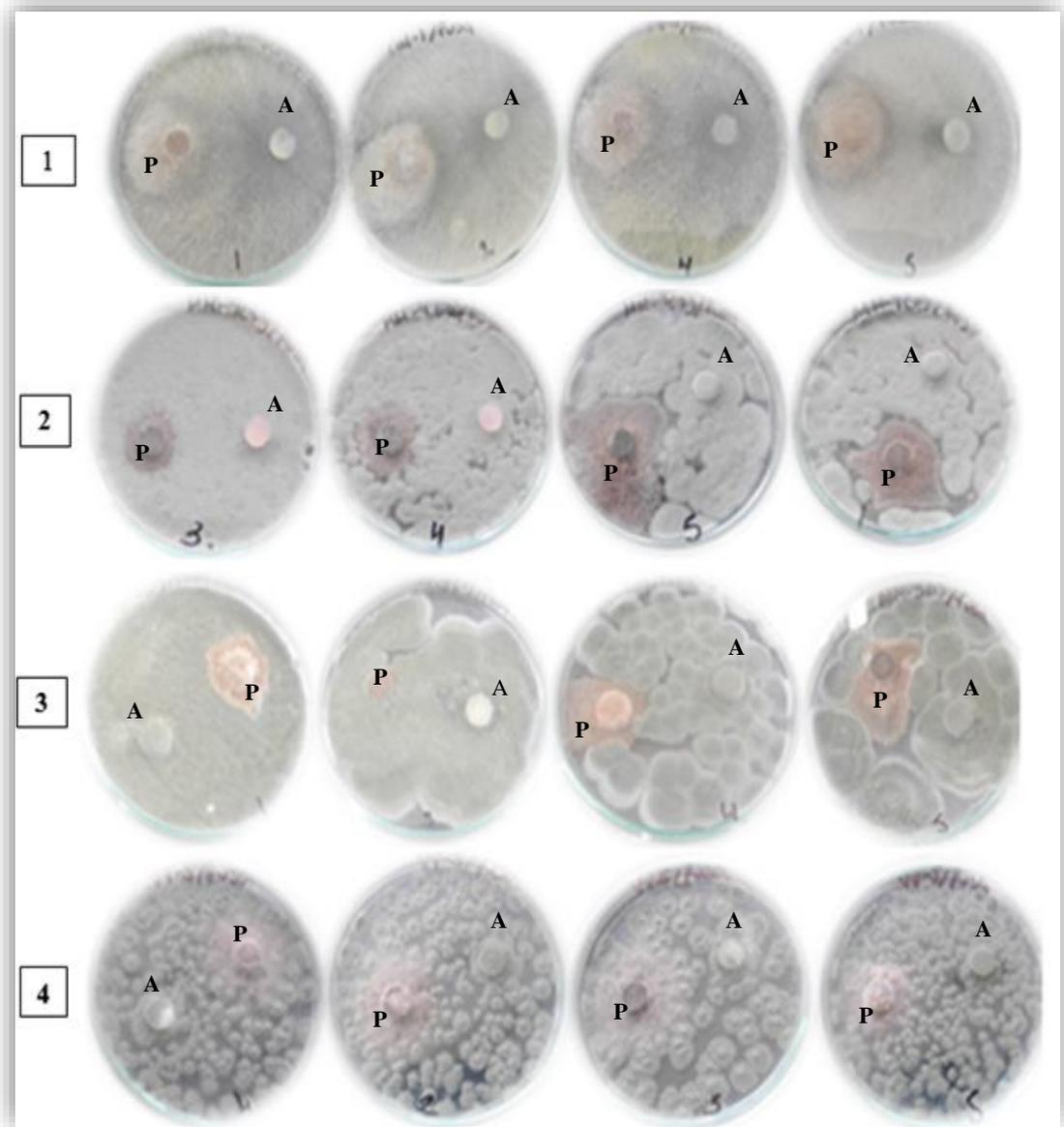


Figura 14. Hongos con mayor crecimiento del diámetro. 1) *Pythium* spp. 1Ca, 2) *Penicillium* spp. 4 MM, 3) *Penicillium* spp. 1MM, 4) *Penicillium* spp. 3VV, en confrontación *Fusarium verticilloides*. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

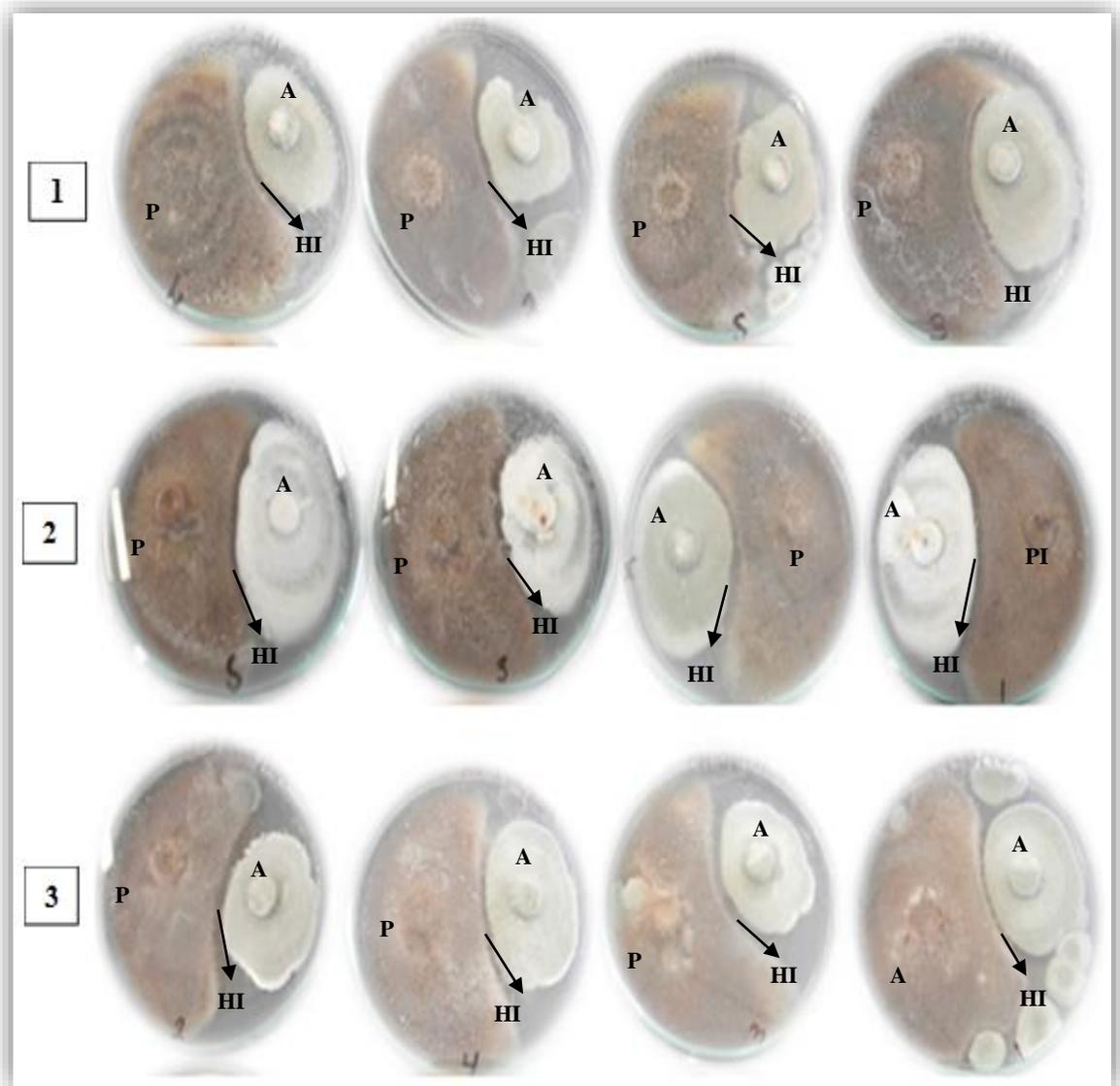


Figura 15. *Penicillium* spp. 1VV, 2) *Penicillium* spp. 2VV, 3) *Penicillium* spp. 5MM. en confrontación con *Fusarium verticilloides* con presencia de halo de inhibición. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno, HI: halo de inhibición).

El hongo *Penicillium* spp. 2MM estadísticamente tuvo similitud con los hongos que presentaron mayor diferencia de crecimiento y con la cepa de *Trichoderma* spp. que tuvo una DC más baja. Esta cepa de *Penicillium* spp. 2MM presentó una diferencia de crecimiento de 2.98 cm (Cuadro 8), lo cual indica que en este enfrentamiento se observó

una zona de interacción entre el antagonista y el patógeno donde el antagonista colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio; cabe resaltar que de las cuatro repeticiones en dos de las confrontaciones el antagonista tuvo mayor crecimiento radial expandiéndose sobre la mayor superficie del medio y desarrollándose sobre la colonia de *Fusarium verticilloides* provocando así la detención del crecimiento de este, mientras que en las dos repeticiones restantes el crecimiento de ambos hongos fue similar (Figura 16) es por esto que este hongo numéricamente tuvo una diferencia de crecimiento menor a la expresada por los hongos de *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV, *Penicillium* spp. 4MM y *Penicillium* spp. 1MM.

En base a lo anterior, se puede indicar que *Penicillium* spp. presentó dominancia por contacto, ya que fue dominante en la interacción ya que al ser más competitivo consiguió proliferar con mayor rapidez, inhibiendo el desarrollo del patógeno y aún continuar creciendo sobre de la cepa de *F. verticilloides*.

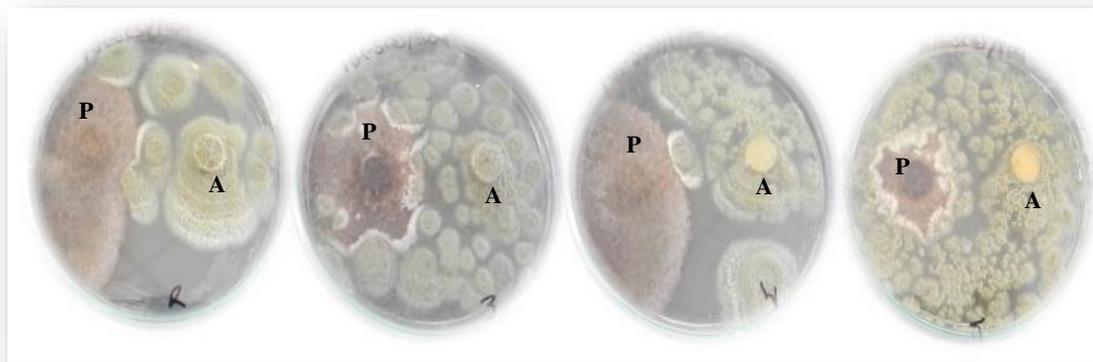


Figura 16. Hongo *Penicillium* spp. 2MM en confrontación con *Fusarium verticilloides*. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

De igual forma, en términos estadísticos, los hongos *Penicillium* spp. 2VV, *Penicillium* spp. 5MM, *Penicillium* spp. 1VV fueron iguales, pero su crecimiento fue menor cuando estuvieron confrontados con el patógeno (expresado con valores negativos en el Cuadro 6), es decir el patógeno tuvo un mayor crecimiento en (cm) respecto al antagonista; cabe mencionar que aunque los valores son negativos en estas confrontaciones no se observó zona de intersección entre el micelio del hongo antagonista y el patógeno, por el

contrario se evidencio la presencia de un halo de inhibición (Figura 15) lo que impidió que hubiera algún tipo de dominancia.

El crecimiento del hongo *Alternaria* spp. 2Ca, estadísticamente fue similar a las confrontaciones de *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. 2VV, *Penicillium* spp. 5MM, *Penicillium* spp. 1VV, y como se observa numéricamente fue el que tuvo una diferencia de crecimiento mínima (Cuadro 8); en esta confrontación no se presentó halo de inhibición solo se observó una zona de intersección donde hubo contacto por parte de *Alternaria* spp con *Fusarium verticilloides* presentando así un antagonismo mutuo por contacto sin predominio de una cepa sobre la otra (Figura 17).

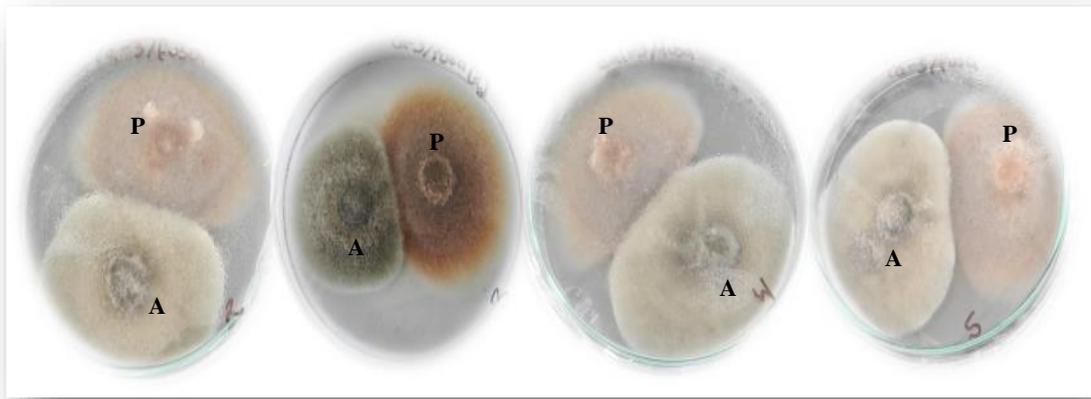


Figura 17. Crecimiento de *Alternaria* spp. en confrontación con *Fusarium verticilloides*. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

El valor más bajo de diferencia de crecimiento se observó en la confrontación del hongo No identificado 3MM contra *F. verticilloides* (cuadro 8) esto debido a que el patógeno tuvo mayor crecimiento de diámetro y se observó la presencia de otro hongo lo cual trajo problemas de contaminación dentro de esta confrontación interrumpiendo así tanto el crecimiento del hongo No identificado como el de *F. verticilloides*, además de que se observó que el crecimiento de este hongo no identificado fue muy lento en comparación con los demás aislados usados como antagonistas.

En el caso de la confrontación de *Trichoderma* spp. con *F. verticilloides*, la diferencia de crecimiento fue de 1.55cm, lo cual indica que el hongo antagonista tuvo mayor crecimiento de diámetro aunque no logró inhibir la cepa de *F. verticilloides*; presentándose un antagonismo mutuo (Figura 18), de igual forma esto pudo deberse a que *Trichoderma* spp. detuvo su crecimiento ya que la temperatura de incubación a la que fue sometida la confrontación fue de 22° la cual no es indicada para el hongo *Trichoderma* spp. que debe ser de entre 26 a 29 °C (García, 2008), solo se observó una zona de intersección entre estos dos, cubriendo así el antagonista las dos terceras partes de la superficie del medio (Figura 14); tal como lo menciona (Pantoja, 2009) al evaluar la actividad anti fúngica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* determinado que las cepas 30, 10, 8 y 31 se ubicaron en la escala 2 de la clasificación de Bell *et al.* (1982), enfatizando que *Trichoderma* spp sobre creció las dos terceras partes de la superficie del medio. Además dicho comportamiento pudo ser causado son selectividad que presenta (Wells *et al.*, 1972), lo que significa que ante determinados patógenos no ejerce su actividad antagónica. Por ello, este género cuenta con más de un mecanismo de acción frente hongos patógenos como son; competencia por espacio, antibiosis, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Infante *et al.*, 2009).

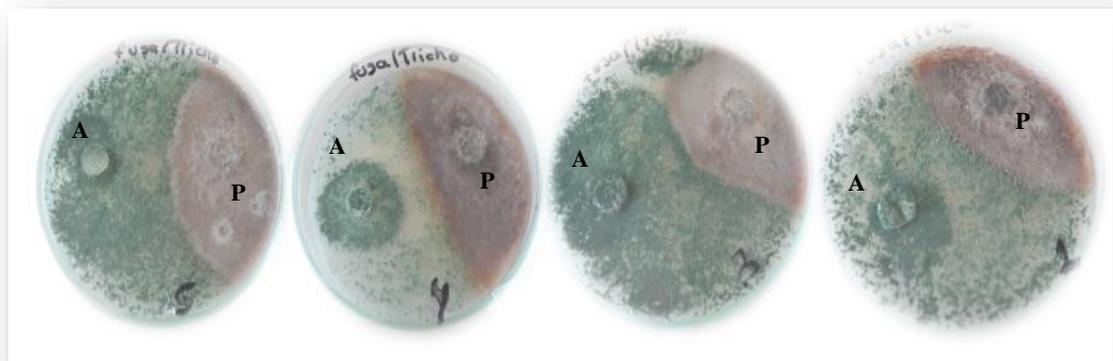


Figura 18. *Trichoderma* spp. en confrontación con *Fusarium verticilloides*. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

6.2.4 Eficiencia de biocontrol

En cuanto a la eficiencia de biocontrol se obtuvieron diferentes tipos de comportamiento, desde un efecto o valor negativo como el que se determinó con la cepa no identificado 3MM (-108.48 a -11.62 %) (Cuadro 9), hasta una inhibición total.

Las interacciones con mayor porcentaje de inhibición se presentaron con las cepas *Penicillium* spp. 3VV, *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 1MM con un rango de 71.11, 59.89 y 57.23 % de eficiencia de biocontrol respectivamente, la inhibición determinada pudo deberse a la velocidad de crecimiento y mecanismos de acción del antagonista, como puede ser su habilidad de competencia por espacio o bien por micoparasitismo, determinando así que las cepas de *Penicillium* spp. fueron dominantes en estas interacciones ya que inhibieron el desarrollo de *F. verticilloides* y posteriormente siguieron creciendo a través y/o sobre de la colonia del patógeno por parte de los antagonistas, en este sentido Rosello (2003) indica que al evaluar las cepas PO y FOG1 en crecimiento dual, durante confrontación y en condiciones de 25°C, la cepa PO fue una especie dominante en la interacción, que mostró mayor crecimiento al ser más competitiva al conseguir dominar en las interacciones, inhibiendo el desarrollo de la cepa FOG1, y posteriormente continuar creciendo a través de la colonia de FOG1. De igual forma estos resultados fueron similares a lo encontrado por Figueroa (2011) donde un grupo de microorganismos del genero *Bacillus* spp. inhibieron el crecimiento de *F. verticilloides* del 62 al 77% en pruebas sobre papa-dextrosa-agar aunque cabe remarcar que existen varios reportes acerca de la actividad de biocontrol, de especies de *Bacillus* spp. contra hongos fitopatógenos (Arias *et al.*, 1999; Wen, 2009).

Por otro lado el hongo *Trichoderma* spp. fue el que presentó menor eficiencia de biocontrol con un 22.27% con respecto a las cepas que tuvieron una mayor eficiencia de biocontrol. Las interacciones que no presentaron una eficiencia de biocontrol como tal fueron los aislamientos, No identificado 3MM, *Penicillium* spp. 1VV, *Penicillium* spp. 2VV con el -108.48%, -48.17%, y el -24.77%; cabe señalar que los valores negativos se deben a que el patógeno tuvo un mayor crecimiento de diámetro respecto al antagónico, aunque se observó la presencia de un halo de inhibición entre los dos hongos por lo que nunca hubo contacto entre el antagonista y el patógeno; con esto se puede deducir que la

cepa de *F. verticilloides* inhibió el crecimiento o las actividades metabólicas de *Penicillium* spp. 1VV, *Penicillium* spp. 2VV, *Penicillium* spp. 5MM por la acción de alguna sustancia producida por el patógeno o bien a la posible presencia de antibiosis por parte del antagonista (Figura 12).

Cuadro 9. Resultados de eficiencia de biocontrol (EB) de los hongos antagonistas a *Fusarium verticilloides*.

Cepa	EB%
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	59.89
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	71.11
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	50.34
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	57.23
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	37.44
<i>Trichoderma</i> spp.	22.27
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	-11.62
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	-24.77
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	-21.40
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	-48.17
No identificado 3MM	-108.48

6.3 Confrontaciones de *Sphacelia* spp. con los hongos aislados

6.3.1 Crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (CDA)

La alta diferencia significativa determinada con el análisis de varianza para esta variable indicó la existencia de que al menos un tratamiento fue diferente en el comportamiento del Crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista (Cuadro 10).

Cuadro 10. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista.

F.V.	G.L.	Diámetro del antagonista
Tratamiento	10	75.98**
Error(CME)	33	0.1564000
C.V (%)		6.2946

G.L.: Grados de Libertad; C.V.: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.

Con respecto a los resultados obtenidos en estos enfrentamientos los aislados usados como antagonistas sobre *Sphacelia* spp., se puede observar que existen diferencias en el crecimiento del diámetro de los antagonistas, estos varían desde los 3.91 cm hasta los 9 cm (Cuadro 11), según el análisis de varianza se observó que se presentó un alta diferencia significativa por lo al menos un hongo antagonista se comporta de manera diferente.

La prueba de separación de medias indicó que *Pythium* spp. 1Ca y *Penicillium* spp. 3VV tuvieron el mayor crecimiento de diámetro y fueron estadística y numéricamente iguales (Cuadro 11) ya que se observó que el desarrollo micelial de las cepas antagónicas fue muy rápido de tal manera que se desarrollaron sobre toda la superficie del medio impidiendo así un mayor crecimiento del patógeno (Figura 19 y 22).

Con respecto al crecimiento de los hongos *Trichoderma* spp. y *Alternaria* spp. 2Ca en términos estadísticos y numéricos los resultados fueron similares (Cuadro 11); ya que estas cepas tuvieron un crecimiento de diámetro semejante, cubriendo así las dos terceras partes de la superficie del medio impidiendo un mayor desarrollo micelial del patógeno.

Estadísticamente *Penicillium* spp. 2VV fue similar *Alternaria* spp. 2Ca y a *Penicillium* spp. 1MM, *Penicillium* spp. 5MM, *Penicillium* spp. 4MM, de igual forma los resultados numéricos fueron similares entre sí, ya que la diferencia de crecimiento entre estos fue de tan solo 1 cm.

Cuadro 11. Separación de medias para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del antagonista. (CDA, en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.

Cepa	CDA (cm)
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	9 a*
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	9 a
<i>Trichoderma</i> spp.	7.77b
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	7.02bc
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	6.25cd
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	5.65ed
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	5.53ed
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	5.52ed
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	4.97ef
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	4.46fg
No identificado 3MM	3.91g

*Las medias con la misma letra dentro de la columna son iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

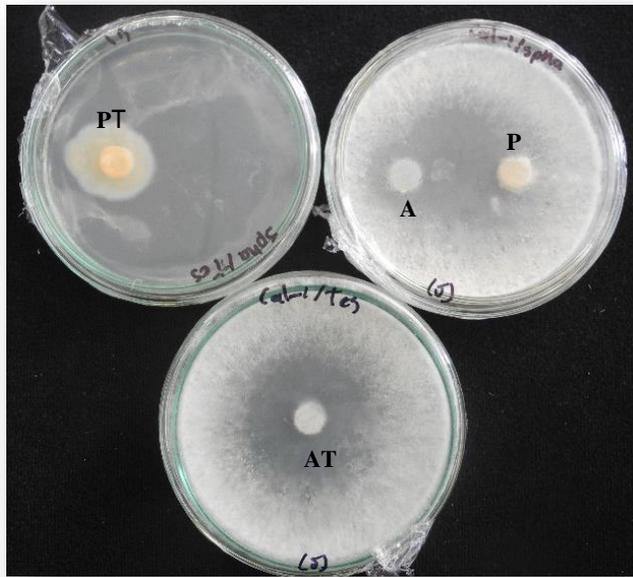


Figura 19. Comportamiento de *Pythium* spp. confrontado con *Sphacelia* spp. en comparación con los testigos de ambos hongos.

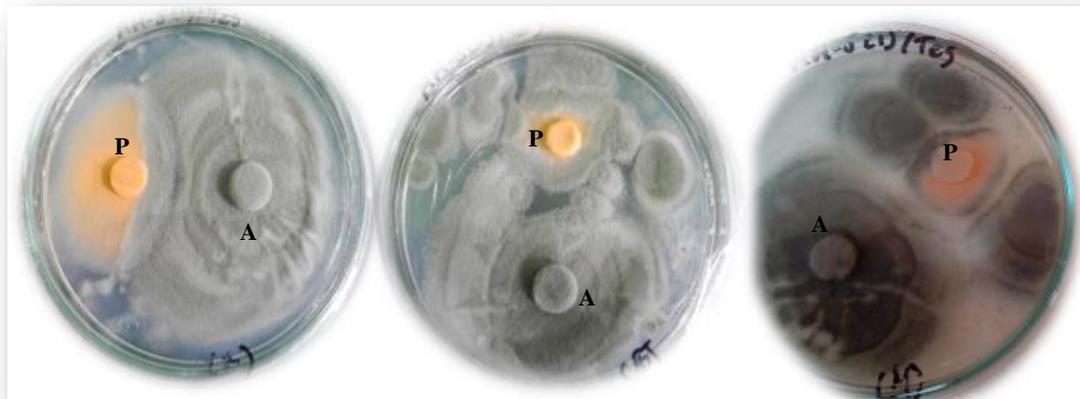


Figura 20. Comportamiento de *Penicillium* spp. 1MM en confrontación con *Sphacelia* spp. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

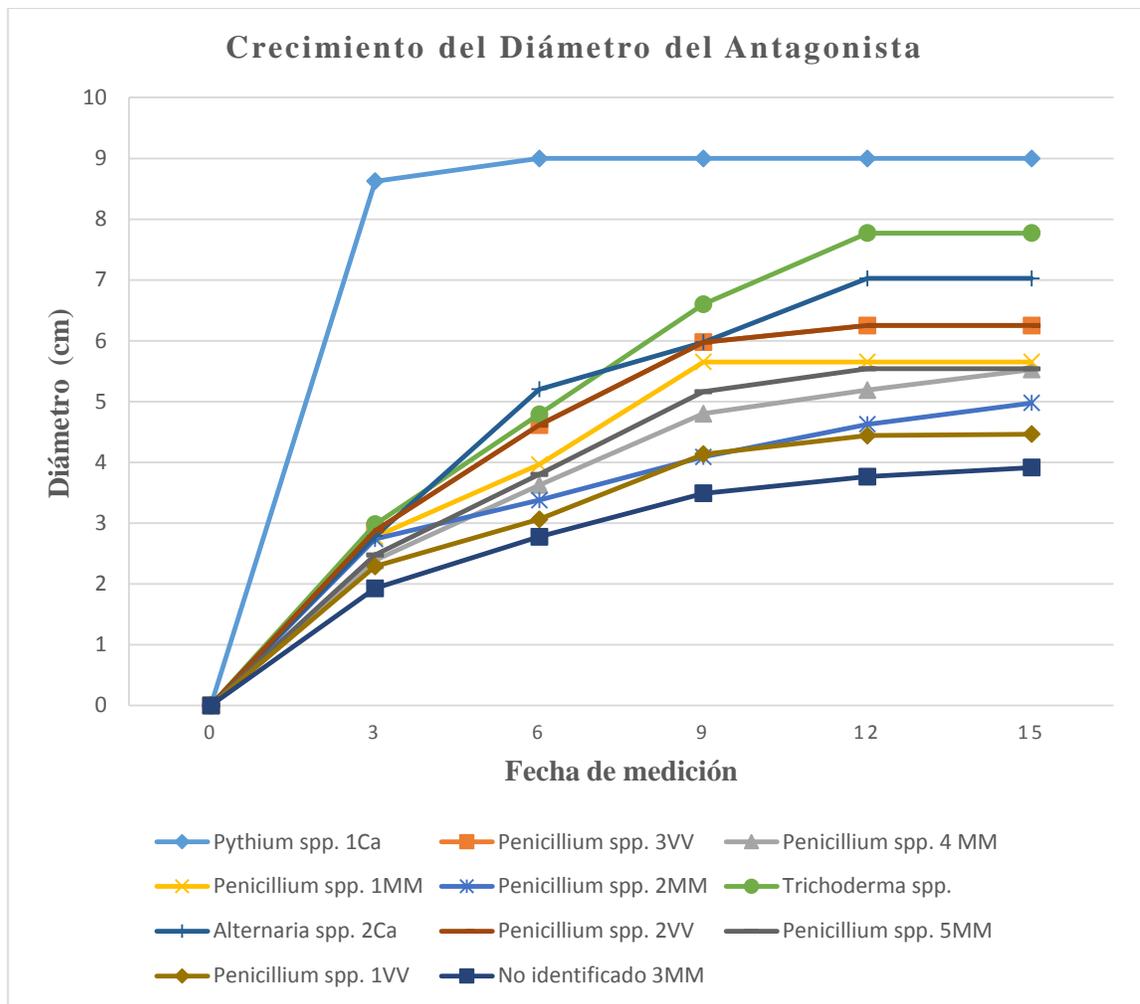


Figura 21. Crecimiento del diámetro del antagonista (cm) en confrontación con *Sphacelia* spp. hasta los 15 días. La temperatura de incubación fue de 22°C.

Por otro lado el hongo *Penicillium* spp. 2MM estadísticamente fue similar con *Penicillium* spp. 1MM, *Penicillium* spp. 5MM, *Penicillium* spp. 4MM y *Penicillium* spp. 1VV presentando un mayor crecimiento de diámetro, en términos numéricos fueron casi iguales con la diferencia de 1 cm de crecimiento.

Mientras que *Penicillium* spp. 1VV en términos estadísticos y numéricos fue similar a los hongos *Penicillium* spp. 2MM y No identificado 3MM (Cuadro 11); siendo estos los que presentaron un menor crecimiento de diámetro debido a que se observó que dentro de estas confrontaciones hubo presencia de otros hongos lo cuales robaron espacio a los hongos en enfrentamiento.

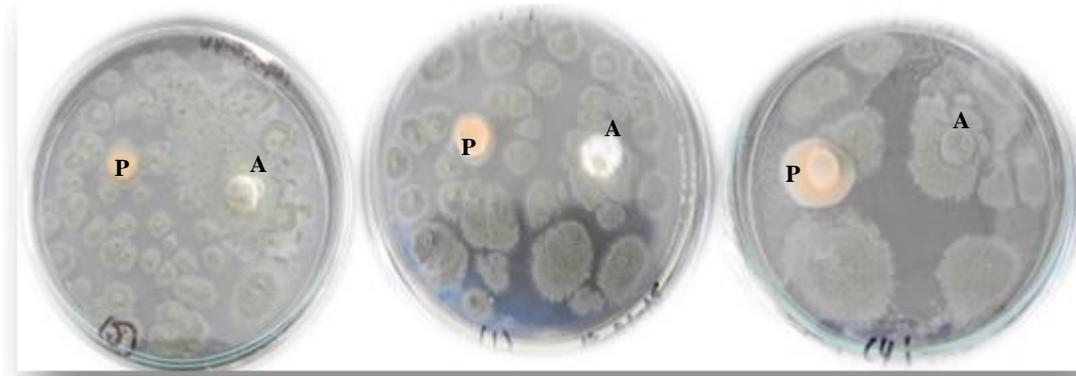


Figura 22. Comportamiento de *Penicillium* spp. 3VV en confrontación con *Sphacelia* spp. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

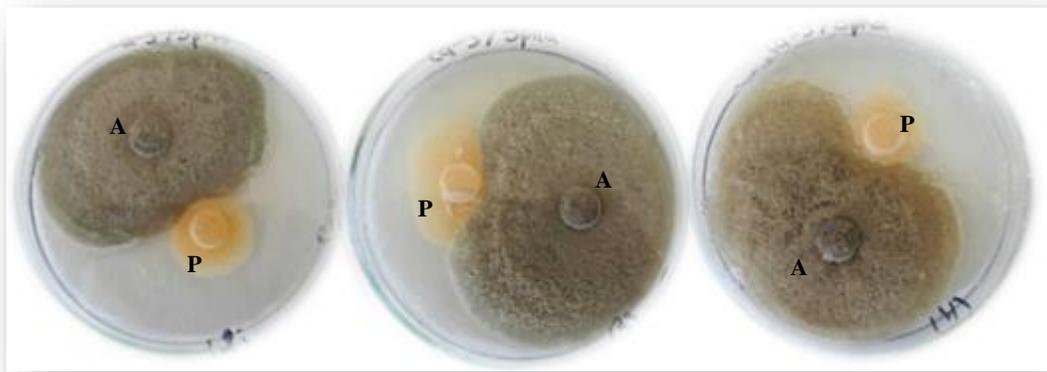


Figura 23. Crecimiento de *Alternaria* spp en confrontación con *Sphacelia* spp. (A: corresponde al crecimiento del antagonista, P: corresponde al crecimiento del patógeno).

6.3.2 Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (CDP)

El análisis de varianza indicó la existencia de diferencia significativa para la variable Crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (*Sphacelia* spp.), por lo que al menos un tratamiento tuvo un comportamiento diferente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno (*Sphacelia* spp.).

F.V.	G.L.	Diámetro del patógeno
Tratamiento	10	9.78**
Error(CME)	33	0.14809697
C.V (%)		14.24590

G.L.: Grados de Libertad; C.V.: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.

La separación de medias con la prueba de Tukey al (0.05) en la variable crecimiento del radio de *Sphacelia* spp, indico que en términos estadísticos *Sphacelia* spp presentó un crecimiento similar cuando se confronto con las cepas *Penicillium* spp. 1VV, *Trichoderma* spp, *Alternaria* spp. 2Ca. Aunque estos mismos crecimientos tienen similitud con los confrontados con las cepas No identificado 3MM, *Penicillium* spp. 1MM y con *Penicillium* spp. 2VV, *Pythium* spp. 1Ca. En cuanto el desarrollo del patógeno frente a las cepas *Penicillium* spp. 2VV, *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV fueron estadísticamente similares (Cuadro 13) que fue indicativo de las cepas de mayor crecimiento de diámetro, invadiendo totalmente la superficie del medio, de tal forma que el crecimiento micelial de *Sphacelia* spp.

Cuadro 13. Separación de medias para la variable crecimiento del diámetro de la colonia del patógeno *Sphacelia* spp. (CDP en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.

Cepa	CDP (cm)
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	3.58a*
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	3.51ab
No identificado 3MM	3.36abc
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	2.80abcd
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	2.57bcd
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	2.56cd
<i>Trichoderma</i> spp.	2.55cd
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	2.53cd
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	2.47cde
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	2.21de
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	1.53e

*Las medias con la misma letra dentro de la columna son iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

Cabe mencionar que en las confrontaciones realizadas con el patógeno *Sphacelia* spp. se observó que su crecimiento fue lento en comparación con las cepas utilizadas como antagonistas, lo anterior posiblemente debido al efecto de la temperatura de incubación que fue de 22°C la cual no fue óptima para que *Sphacelia* spp. tuviera un mayor crecimiento.

6.3.3 Diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DC)

El análisis de varianza indicó la existencia de alta diferencia significativa para la variable diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno, por lo que al menos un tratamiento fue diferente en su comportamiento (Cuadro 14).

Cuadro 14. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la variable diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno

F.V.	G.L.	Diferencia de crecimiento
tratamiento	10	69.50**
Error(CME)	33	0.2821485
C.V (%)		14.83168

G.L.: Grados de Libertad; C.V.: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en estas confrontaciones de los aislados usados como antagonistas sobre *Sphacelia* spp. se puede observar que existieron diferencias en el desarrollo micelial de los diferentes antagonistas sobre el patógeno. En el análisis de la separación de medias con la prueba de Tukey (Cuadro14) indica la existencia de diferencia estadística entre los aislamientos confrontados, pero algunas mostraron similitud entre ellas. Las separación de medias indicó que las cepas *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV mostraron un buen efecto de antagonismo al expresar los mayores valores, siendo estadísticamente similares, aunque con los aislamientos *Trichoderma* spp. y *Alternaria* spp. 2Ca, fueron estadísticamente diferentes, pero también mostraron un efecto antagónico. Los hongos *Penicillium* spp. 4MM, *Penicillium* spp. 1VV, *Penicillium* spp. 2MM y No identificado 3MM, presentaron un mínimo efecto de antagonismo ya que tuvieron una diferencia de crecimiento mínima esto quiere decir que

los crecimientos radiales tanto de los hongos usados como antagonistas como la del patógeno fueron similares (Cuadro 15).

Cuadro 15. Separación de medias para la variable diferencia de crecimiento del diámetro de la colonia entre el antagonista y el patógeno (DC en cm) con la prueba de Tukey al 0.5%.

Cepa	DC (cm)
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	7.46a*
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	6.8a
<i>Trichoderma</i> spp.	5.22b
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	4.49bc
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	3.77cd
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	2.96de
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	2.85de
<i>Penicillium</i> spp. 4MM	1.94ef
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	1.90ef
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	1.46fg
No identificado 3MM	0.55g

*Las medias con la misma letra dentro de la columna, son iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

6.3.4 Eficiencia de biocontrol (EB)

Como se observa en el Cuadro 16, las confrontaciones de *Sphacelia* spp. con los aislados utilizados como antagonistas presentó un rango variado de EB. Siendo así la cepa *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 3VV, *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp. 2Ca, *Penicillium* spp. 2VV las que presentaron una eficiencia de biocontrol mayor al 50 %; en el caso *Pythium* spp. 1Ca se desarrolló a una velocidad mayor que *Sphacelia* spp. ya que al tercer día de enfrentamiento, el antagonista cubrió totalmente la superficie del medio

(Figura, 19) mostrando así sus mecanismos de acción como competencia por espacio y posiblemente parasitismo, *Penicillium* spp. 3VV fue el segundo hongo que mostró una mayor eficiencia de biocontrol ya que se observó que inhibió por completo la cepa del patógeno impidiendo así un mayor crecimiento del diámetro de este.

Los hongos *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp. 2Ca mostraron una EB similar (Cuadro 16), ya que ambos hongos inhibieron el crecimiento de *Sphacelia* spp. de tal manera que ya no permitieron que este siguiera desarrollándose.

En el caso de *Trichoderma* spp. tuvo una eficiencia de biocontrol del 67.18% así un porcentaje de inhibición superior al 50%, ésto con cuerda con lo mencionado por Guedez *et al.* (2012) quienes indican que los aislamientos T813 contra *F. oxysporum*, *R. solani* y *S.rolfsii*, presento una inhibición del 66%, 62% y 60% respectivamente, teniendo así un porcentaje de inhibición superior al 50%; aunque es pertinente mencionar que dichos autores no trabajaron con *Sphacelia* spp., pero el efecto antagónico de *Trichoderma* spp. fue similar a lo encontrado en el presente trabajo.

La menor eficiencia de biocontrol que se tuvo fue en el enfrentamiento del hongo No identificado 3MM esto debido a que durante la confrontación el crecimiento de este fue lento, además de que se observó la presencia de colonias de otros hongos los cuales invadieron la superficie del medio impidiendo el crecimiento del patógeno y antagonista confrontados.

Cuadro 16. Resultados de la eficiencia de biocontrol (EB) de los hongos antagonista a *Sphacelia* spp.

Cepa	EB%
<i>Pythium</i> spp. 1Ca	82.89
<i>Penicillium</i> spp. 3VV	75.44
<i>Trichoderma</i> spp.	67.18
<i>Alternaria</i> spp. 2Ca	63.84
<i>Penicillium</i> spp. 2VV	55.52
<i>Penicillium</i> spp. 1MM	50.44
<i>Penicillium</i> spp. 1VV	42.60
<i>Penicillium</i> spp. 4 MM	34.96
<i>Penicillium</i> spp. 2MM	29.52
<i>Penicillium</i> spp. 5MM	27.12
No identificado 3MM	14.07

VII. CONCLUSIONES

- 1) Se obtuvieron 10 aislamientos de hongos antagonicos de las 3 localidades evaluadas, de los cuales 7 pertenecieron al género *Penicillium* spp, 1 a *Pythium* spp. 1 *Alternaria* spp.
- 2) Se determinó que 3 cepas del género *Penicillium*; 2 pertenecientes a Mina México (*Penicillium* spp. 4 MM, *Penicillium* spp. 1MM) y 1 cepa de Villa Victoria (*Penicillium* spp. 3VV) y 1 del genero *Pythium* spp. de Calimaya (*Pythium* spp. 1Ca) bajo condiciones *In vitro* presentaron antagonismo a *F. verticilloides* a través de los modo de acción de competencia por espacio y nutrimentos, y posiblemente parasitismo.
- 3) 3 cepas pertenecientes al género *Penicillium* spp. (2 de Villa Victoria: *Penicillium* spp. 1VV y *Penicillium* spp. 2VV) y 1 de Mina México (*Penicillium* spp. 5MM) presentaron antagonismo a través del modo de acción antibiosis sobre *F. verticilloides*
- 4) La cepa identificada como *Alternaria* spp. mostro antagonismo a *F. verticilloides* y *Sphacelia* spp. a través del modo de acción competencia por espacio y nutrimentos.
- 5) Los hongos *Pythium* spp. 1Ca, *Penicillium* spp. 1MM, *Penicillium* spp. 3VV en confrontación con *Sphacelia* spp. mostraron antagonismo a través del modo de acción de competencia (por espacio y/o nutrimentos) y posiblemente parasitismo. Comportamiento similar se observó en la confrontación con *F. verticilloides*
- 6) Con respecto a las cepa *Trichoderma* spp. utilizada como referencia se observó el efecto de antagonismo por competencia y nutrimentos ante los dos patógenos evaluados.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. Editorial Limusa. México 838 p.
- Agrios, G. 2001. Fitopatología. Editorial. Limusa. México. pp 183-200.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5a ed. Elsevier. USA. 922 p.
- Agrios, G. 2013. Fitopatología. 2a. ed. Editorial Limusa. México. pp 192-195
- Apablaza, G. y Barrera, V. 2009. Control biológico de enfermedades en hortalizas y flores. *Agronomía y Forestal* 38: 26-29.
- Aquino, M. J.G., Vázquez, G. L.M., y Reyes, R. B.G. 2007. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. Con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:127-137.
- Aquino, M.J.G., Ríos, D. G., y Hernández, S.R.S.V. 2014. Guía para el control de plagas rizófagas y enfermedades de la mazorca del maíz en valles altos del Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria Acuícola y Forestal del Estado de México. 36 p.
- Alfonso, C., Del Amo, F., Nuero, O.M., y Reyes, F. 1992. Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 for its control by nonpathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 99: 169-74.
- Baker, K.F. y Cook, R.J. 1974 *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman. San Francisco. USA.
- Bonkowski, M., Griffith, B. S. and Ritz, K. 2000. Food preference of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*, vol. 44, pp. 666–676.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Macmillan Publishing Company. USA. pp 6-216.
- Bell K, Wells D. and Markham R. 1982 *In Vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.

- Castellanos, G., Jara, C., y Mosquera, G. 2011. Guía Práctica 4: *Fusarium oxysporum*, Manejo del hongo en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. 232 p.
- Chakraborty, M. R. and N. C. Chatterjee. 2008. Control of Fusarium Wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biología Plantarum*. Holanda 52: 582-586.
- CIMMYT.2004. Enfermedades del maíz una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, El Batán, 4ª Edición. 118 p.
- Cook, R., J., Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. 1edición. Minnesota, USA. PP 30-106.
- De León, C. 2008. Principales enfermedades. En: El cultivo del maíz Temas selectos. Mundi-Prensa, México. 127 p.
- De la Torre, H., Sánchez, R. Ma. E., Galeana, S. D., Eduardo, y Plasencia, P, J. 2014. Fumonisinas Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticilloides* maíz. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 17(1), 77-91.
- De la I. de Bauer, M.D. 1991. Fitopatología. Noriega Limusa. México. 320 p.
- Deacon, J.W.1997. Modern Mycology. Blackwell, Boston, USA. 250 p.
- Duncan, K.E. and Howard, R.J. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 6-16.
- Escobar, P., J. Montealegre y R. Herrera. 2004. Respuesta *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* frente a Fe³⁺, salinidad, pH y temperatura, con el fin de ser utilizadas en control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate, Boletín Micológico Chile. 19: 95-102.
- Ezziyani, M. A., Sid Ahmed, C., Pérez, S.M.E. Requena, M.E. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Tecnología de producción. Sanidad vegetal. 15 p.

- FAOSTATS (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2012.
Disponible en:
http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/browse/rankings/countries_by_commodity/E. Consultado el 30 de octubre del 2014.
- Fernández, L.O.V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control. Fitosanitario. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. LA Habana Cuba. pp 96-100
- Fernández, L.O. 2006. Los microorganismos en el control biológico. Alternativas de producción en Cuba. Memorias del Curso Internacional Manejo Agroecológico de Plagas en el Sistema de Producción. Inisav, La Habana, Cuba.
- Fernández, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. pp 96-100.
- Figueroa, L.A.M. 2011. Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticilloides*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Guasave, Sinaloa, México. pp 34-62
- Ferrera, R., y Alarcón, A. 2007. Microbiología Agrícola; hongos, bacterias, micro y macro fauna, control biológico y planta-microorganismo. Mecanismos microbianos en el control biológico. México. Trillas. 568 p.
- Fucikovsky, L. y M. Moreno. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the State of México, México. Plant Disease Rep. 55: 231-233.
- García, C.J.C. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma spp.* sobre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora cinnamomi*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 45 p.
- Gilbertson, R.L., Brown, M. Jr., Ruppel, E.G. Capinera, J.L. 1986. Association of corn stalk rot *Fusarium spp.* and western corn rootworm beetles in Colorado. Phytopathology. 76, 1309-1314.

- Guedez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. y Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Pp 32:44-49
- Guedez, C., Castillo, C., Cañizales, L. Olivar, R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Escuela Técnica Agropecuaria Adolfo Navas Coronado. Venezuela. pp 50-74
- Hernández, A., Bautista, S., Velázquez, M., Hernández, A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. Revista mexicana de Fitopatología: 66-74.
- Hernández, P.M.R. 2008. Aislamiento de hongos causantes de enfermedades de postcosecha y algunos potenciales antagonistas de frutos de mango (*Magnifera indica*) c.v. Tommy Atkins. Tesis de licenciatura en biología Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias biológicas y Agropecuarias. Zapopan, Jalisco. pp 23-30
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolutions of current concepts. Plant Dis: Pp 4-10.
- Ibarra, J.E., Del Rincón, M.C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Revista latinoamericana de microbiología. Vol. 48, No. 2. Pp 113-120
- Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección vegetal. 21 p.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2007. Resultados del censo agropecuario 2007.
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/censos/agropecuario2007>
Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2014.

- Jacas, J., Caballero, P. y Avilla J., 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea. Universidad de Jaume I. D.L. 209 p.
- Jensen, D.F., y Wolffhechel, H. 1995. Biological Control: Bnefits and Risks.(Series: Plant and microbial biotecnology research. En: M.T.H., Heikki y J.M. Lynch (Eds.). The use of fungi, particularly *Trichodrema* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and Damping-off diseases. Cambridge: Cambridge, University Press. Pp.177-189
- Leslie, J.F y Summerell, B.A. 2006.The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, 1st Edition.
- Moreira, F., E. J. Huising y D.E. Bignell. 2012. Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. Capítulo 8 Pfenning, L. H., y de Abreu, L. M. Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. Instituto Nacional de Ecología, México, 337 pp.
- Moreno, M.C.E. 2014. Tesis de maestría, Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. pp 8-12.
- Mondino, P. 2013.Control biológico de enfermedades de plantas. Pp 201-205.
- Murillo, I., Cavallarin, L. and San Segundo, B. 1999. Citology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. Phytopathology. 89, 737-747.
- Nelson, E.B. 1991. Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants. En Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., Knudesen, G.R. (Eds.). Current limits to biological control of fungal phytopathogens. New York, USA. Marcel Dekker, Inc. pp-327-355.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) Taxonomy Browser
Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax>. Consultado el 28 de Agosto.
- Orietta, F.V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana. Cuba.
- Osada, S. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción hospedante-parasito (*Zea mayz* L.- *Claviceps gigantea* Fuentes et al). Tesis doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 86 p.

- Ortega, R. C. y Ochoa, B. R. 2003. El maíz: un legado de México para el mundo. Claridades Agropecuarias. pp 3-16.
- Pantoja, G.L.F. 2009. Actividad antifúngica in vitro de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotium*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 101p.
- Pascual, S., De Col, A., Magan, N. Melgarejo, P. 2000. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. Journal of Applied Microbiology 89 (5): 847- 853.
- PROMEAR. 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Proyecto especial de producción de maíz de alto rendimiento. 137 p.
- Quiroz S. V., Ferrera R. C., Alarcón A. y Lara H. M. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia Hongos Filamentosos que Afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Micología: 27-34.
- Roselló, C.J.L. 2003 Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios eco fisiológicos. Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Valencia. pp 67-194.
- Rodríguez, R., y De león, C. 2008. El cultivo del maíz Temas selectos. México: Mundi-Prensa
- Sánchez-Pale. J.R. 2011. Análisis espacio temporal del carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *Zea* (Kuhn) Langdon y Fullerton) del maíz en el Estado de México. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma del Estado de México. p 223
- Sarandón S.J., Flores C.C. 2014. Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables.,1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata., pp 314-341.
- Serrano, C.L. y Galindo, F. E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. pp 79-88.
- Salinas, M.Y., Soria, R.J. y Espinosa, T.E. 2010. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias., Centro de Investigación Regional del Centro., Campo Experimental Valle de México Coatlinchan, Estado de México., Folleto Técnico Núm. 42. ISBN.

- SIAP. (Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera). 2013. Anuario estadístico de la producción agrícola. Fuente: www.siap.gob.mx. Consultado el 20 de diciembre del 2014.
- Sivila, N. y Álvarez, S. 2013. Producción artesanal de *Trichoderma*. Universidad Nacional de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias. Jujuy, Argentina. Pp 13-20
- Sosa, C., Perdomo, F., & W., C. 1996. Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. México: IICA/MEXICO.
- Urbina, M. 2011. Fitopatología especial: unidad III enfermedades del cultivo del maíz y arroz. Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco. Honduras. 25p.
- Velluti, P. A.2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumosinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Universidad de Lleida. Tesis de doctorado. Lleida, España. Pp 22-40
- Wells, D.H., D. K. Bell., Jaworski. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 62: 442-447
- Wen-Teish, C., Cheng-Hong, H., Hung-Sheng, H., and Chinshuh, C. 2009. Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:375-382.
- Zavaleta, M, E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. *Terra Latinoamericana*. 17, (3): 201-207
- Zavaleta, M.E. 2000. Alternativas ecológicas de manejo de las enfermedades de los cultivos. in: Martínez C. C. y Ramírez F.L. *Lombricultura y Agricultura sustentable*. Primera edición, Editorial Futura. Texcoco, México. Pp 221-230.