



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium spp* CON CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma spp* EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum Mill*)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÍCOLA
PRESENTA

FERNÁNDEZ MENDIOLA JONATHAN ALFREDO

ASESOR: Biol. MARCOS ESPADAS RESÉNDIZ
COASESOR: Dra. GLORIA DE LOS ÁNGELES ZITA PADILLA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

Control biológico de Fusarium spp con cepas nativas de Trichoderma spp en plántulas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill).

Que presenta el pasante: **JONATHAN ALFREDO FERNÁNDEZ MENDIOLA**
Con número de cuenta: **30723532-1** para obtener el Título de: **Ingeniero Agrícola**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de septiembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Gloria de los Ángeles Zita Padilla	
VOCAL	Dra. Rosa Navarrete Maya	
SECRETARIO	M.C. Alfonsina Judith Hernández	
1er SUPLENTE	Ing. Ángel López Cortés	
2do SUPLENTE	Ing. Asunción Martínez Vázquez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)
IHM/ntm*

AGRADECIMIENTOS

Iniciare agradeciendo a quien ha permitido que este ciclo de vida concluya de la mejor manera; gracias a Dios, porque sus tiempos no son antes ni después, son justos en momento y forma.

Gracias a mis padres, por ser un excelente ejemplo a seguir, por el valioso apoyo brindado y aún más por los valores y principios con los que he crecido, y por darme la mejor herencia que se pueda tener, mi educación.

A mis hermanos por formar parte de mi vida y juntos complementar a mi familia, por todo su apoyo y sus consejos. Por llenar mi vida de grandes momentos compartidos y de una excelente unión familiar.

Un entero agradecimiento a mis asesores de tesis el Biol. Marcos Espadas y la Dra. Gloria Zita, quienes han compartido parte de su tiempo y valiosos conocimientos para concluir esta etapa de mi formación académica y por nunca dejar de creer en mí.

A todos mis profesores de la carrera de Ingeniería Agrícola, quienes me enseñaron tanto de la profesión como de la vida, en especial al Ing. José Luz Hernández Castillo y al M.C. Juan Roberto Guerrero Agama; a los laboratoristas Alberto y Martín, y a cada una de las personas que conformaron mi jurado, quienes junto con mis profesores han aportado más que un granito de arena con sus atenciones y tiempo para el desarrollo de mi proyecto de tesis y quienes ahora son parte de mis amigos.

Gracias a Isabel, quien le dio ese toque de locura, brillo y color a mi vida, por compartir conmigo momentos únicos a lo largo de este proyecto, por nunca dejar de creer en mí y apoyarme en todo momento.

A la generación 35 compañeros de grandes vivencias y aventuras; a mis amigos quienes siempre estuvieron día a día demostrándome su apoyo en cada momento y con quienes disfrute momentos inolvidables durante mi paso en Ingeniería Agrícola.

Y termino agradeciendo a la UNAM institución que me ha arropado desde mi formación media superior y que ahora me da la dicha de ser egresado de tan grande casa de estudios.

“Sembrar la tierra con semillas de conciencia
para cosechar nuevas sociedades”

Ing. Agrícola
FES-C

Contenido

Índice de Tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Introducción.....	1
Objetivos e Hipótesis.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos particulares.....	4
Hipótesis.....	4
Capítulo 1. Marco teórico y conceptual.....	5
1.1 Conceptos de Control biológico.....	5
1.2 Tipos de control biológico.....	6
1.2.1 Control biológico por conservación.....	6
1.2.2 Control biológico clásico.....	7
1.2.3 Control biológico aumentativo.....	7
1.3 Agricultura protegida.....	8
1.4 Descripción general del cultivo del tomate (<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>).....	10
1.4.1 Producción de plántulas de tomate.....	12
1.5 Situación actual del cultivo del tomate.....	14
1.5.1 Situación mundial.....	14
1.5.2 Situación nacional.....	14
1.5.3 Situación estatal.....	16
1.6 Enfermedades del tomate causadas por hongos del suelo.....	17
1.6.1 Marchitez sureña.....	17
1.6.2 Marchitez por <i>Verticillium</i>	17
1.6.3 Moho blanco.....	18
1.6.4 Pudrición de la corona y raíz.....	18
1.6.5 Marchitez del tomate.....	18
1.6.6 Damping off o ahogamiento del tallo.....	19
1.7 Situación actual de plaguicidas químicos y bioplaguicidas.....	20
1.8 Taxonomía de los hongos <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> (NCBI, 2015).....	22
1.9 Características del género <i>Fusarium</i>	24
1.9.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	26

1.10 Características del género <i>Trichoderma</i>.	30
1.10.1 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i>	31
1.11 Biofungicidas comerciales a base del hongo <i>Trichoderma</i>.	36
Capítulo 2. Metodología.	38
2.1 Descripción de la zona de estudio.	38
2.2 Colecta de Muestras.	41
2.3 Medios de cultivo.	44
2.4 Aislamiento.	45
2.4.1 Dilución en serie.	45
2.5 Cepa pura.	46
2.6 Cultivo monospórico.	46
2.7 Conservación de cepas.	47
2.7.1 Papel filtro estéril.	47
2.7.2 Desecación en sílica gel.	47
2.8 Identificación.	48
2.8.1 Características macroscópicas.	49
2.8.2 Microcultivo.	50
2.9 Prueba de patogenicidad.	51
2.10 Pruebas duales.	53
2.10.1 Micro prueba dual.	55
2.11 Producción del prototipo de biofungicida.	56
2.11.1 Aumento de inóculo y preparación de sustrato.	56
2.11.2 Inoculación del sustrato.	57
2.11.3 Incubación de sustrato inoculado con <i>Trichoderma harzianum</i> M4-1.....	57
2.11.4 Molienda y tamizado del sustrato.	58
2.11.5 Mezclado del arroz con tierra de diatomeas.	58
2.12 Control de calidad del biofungicida.	59
2.12.1 Prueba de viabilidad.	59
2.12.2 Prueba de pureza.	60
2.13 Prueba <i>in vivo</i> en plántulas de tomate.	60
Capítulo 3. Resultados y Discusión.	63
3.1 Aislamientos.	63
3.2 Identificación morfológica de especies de los géneros <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>.	64

3.2.1 Identificación morfológica de especies del género <i>Trichoderma</i> .	64
3.2.2 Identificación morfológica de especies del género <i>Fusarium</i> .	72
3.3 Prueba de patogenicidad.	75
3.4 Pruebas de antagonismo en cultivo dual.	78
3.5 Micro prueba dual.	86
3.6 Pruebas de control de calidad del biofungicida.	87
3.6.1 Prueba de viabilidad.	87
3.6.2 Prueba de pureza.	88
3.7 Prueba <i>in vivo</i> con plántulas de tomate.	88
3.7.1 Longitud de raíz.	90
3.7.2 Longitud de follaje.	91
3.7.3 Longitud de plántula.	92
3.7.4 Peso seco de plántulas.	93
Conclusiones.	96
Literatura citada.	97
Anexos.	105

Índice de tablas.

Tabla 1. Temperatura óptima, máxima y mínima del tomate.....	11
Tabla 2. Principales estados productores de tomate por superficie sembrada en México.	16
Tabla 3. Algunas especies de <i>Fusarium</i> que causan daño a diferentes cultivares.	26
Tabla 4. Formas especiales (f. sp.) de <i>F. oxysporum</i> patogénicas de diferentes cultivos.	27
Tabla 5. Especies de <i>Trichoderma</i> mexicanas que se han probado como agentes de control biológico en México.....	35
Tabla 6. Productos a base de <i>Trichoderma</i> comercializados en México.....	36
Tabla 7. Principales municipios productores de tomate por superficie sembrada en el estado de México.	40
Tabla 8. Principales cultivos por superficie sembrada en el municipio de Coatepec Harinas.	41
Tabla 9. Distribución de unidades para una prueba dual.	54
Tabla 10. Escala de clases Bell <i>et al.</i> 1982.....	55
Tabla 11. Distribución de los tratamientos del diseño experimental.....	61
Tabla 12. Aislamientos obtenidos de tres comunidades en el municipio de Coatepec Harinas.....	63
Tabla 13. Evaluación del grado de antagonismo en cultivo dual a los 10 días.....	78
Tabla 14. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).....	81
Tabla 15. Velocidad media de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> en 10 días.....	83
Tabla 16. ANOVA de la longitud de raíz en plántulas de tomate.	90
Tabla 17. DMS de la longitud de raíz en plántulas de tomate.....	90
Tabla 18. ANOVA de la longitud de follaje en plántulas de tomate.	91
Tabla 19. DMS de la longitud de follaje en plántulas de tomate.	91
Tabla 20. ANOVA de longitud de plántulas de tomate.	93
Tabla 21. Resumen de medias de longitud de plántulas de tomate.	93
Tabla 22. ANOVA del peso seco de plántulas de tomate.	93
Tabla 23. Resumen de medias de peso seco de plántulas de tomate.	94

Índice de figuras.

Figura 1. Gráfica de la participación en la producción mundial de tomate para el año 2013.....	14
Figura 2. Gráficas de la superficie nacional sembrada con tomate (2004-2014).	15
Figura 3. Uso de fungicidas en México (gráfica 2000-2013).	21
Figura 4. Tipos de conidios, conidióforos y fructificaciones asexuales.	24
Figura 5. Características morfológicas del género <i>Fusarium</i>	25
Figura 6. Ciclo de la enfermedad en tomate causada por el hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	29
Figura 7. Características morfológicas del género <i>Trichoderma</i>	31
Figura 8. Colecta de muestras de suelo.	42
Figura 9. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad Ixtlahuaca de Villada.	42
Figura 10. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad de Chiltepec.	43
Figura 11. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad de Chiltepec.	43
Figura 12. Ubicación satelital de invernadero en le comunidad de Acuitlapilco.	44
Figura 13. Técnica de aislamiento dilución en serie.	46
Figura 14. Cultivo monospórico de <i>Trichoderma</i>	47
Figura 15. Conservación de cepas.	48
Figura 16. Caracterización macroscópica de <i>Trichoderma</i>	49
Figura 17. Técnica de microcultivo.	50
Figura 18. Prueba de patogenicidad de los fitopatógenos.	53
Figura 19. Distribución de unidades para una prueba dual.	54
Figura 20. Micro prueba dual.	56
Figura 21. Preparación del biofungicida.	59
Figura 22. Preparación e inoculación de semilleros.	62
Figura 23. Síntomas de daño de <i>Fusarium oxysporum</i> en raíz de plántula de tomate.	77
Figura 24. Comparación de raíces inoculadas en contra del testigo.	78
Figura 25. Pruebas de cultivos duales.	79
Figura 26. Cinética de crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i>	80
Figura 27. Gráficas de regresión polinómica de las cepas de <i>Trichoderma</i>	84
Figura 28. Gráfica de comportamiento del crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i>	85
Figura 29. Gráfica de velocidad de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i>	85
Figura 30. Micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> M4-1 ante <i>F. oxysporum</i>	86
Figura 31. Enrollamiento de las hifa de <i>T. harzianum</i> M4-1 sobre <i>F. oxysporum</i>	87
Figura 32. Pruebas de calidad del biofungicida.	88
Figura 33. Síntomas de necrosis en raíz causadas por <i>F. oxysporum</i>	89
Figura 34. Daño en plántulas de tomate del tratamiento 3 (F.o+T.h).	89
Figura 35. Gráfica de DMS de la longitud de raíz en plántulas de tomate.	90
Figura 36. Gráfica de DMS de la longitud de follaje en plántulas de tomate.	92
Figura 37. Plántulas de los tres diferentes tratamientos.	94

Introducción.

El uso de agroquímicos en los cultivos agrícolas es uno de los insumos más caros dentro del sistema de producción, ya que estos productos alcanzan elevados precios en el mercado; además de que tienen un impacto negativo para el ambiente.

El control biológico es una opción para poder combatir las plagas y enfermedades que causan daños y pérdidas en los rendimientos de los cultivos agrícolas. Por tal motivo, es importante profundizar en la investigación sobre los organismos que son benéficos para la agricultura. Es importante implementar esta tecnología hacia los productores, ya que además de disminuir sus costos de producción, no ocasiona un deterioro al medio ambiente, ni son causa de problemas de salud provocadas a las personas en comparación con el uso de fungicidas, obteniendo así productos agrícolas inocuos de mayor calidad. Se ha demostrado que el uso excesivo de agroquímicos afecta la fertilidad del suelo, al igual que provoca la resistencia de las plagas agrícolas haciendo que estas sean más difíciles de erradicar.

El presente trabajo tuvo como finalidad aislar cepas de fitopatógenos del género *Fusarium*, y antagonistas del género *Trichoderma*, de suelos donde se produce tomate, bajo invernaderos donde se presentaron plantas con síntomas de marchitamiento y donde nunca se haya aplicado algún producto a base de cepas de *Trichoderma*; esto en el municipio de Coatepec Harinas el cual es un importante productor de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) en el estado de México.

A nivel mundial México se posiciona en el séptimo lugar entre los países con mayor superficie de hectáreas bajo agricultura protegida (OIEDRUS, 2011). A nivel nacional, el estado de Sinaloa ocupa el primer lugar con mayor superficie de hectáreas bajo agricultura protegida (22.03%), el segundo lugar lo ocupa el estado de Jalisco (15.37%) y Baja California el tercer lugar (12.29%) (OIEDRUS, 2011; SAGARPA, 2012).

Por su parte, en el estado de México el municipio de Coatepec Harinas zona de estudio de la presente investigación, ocupa el quinto lugar por superficie sembrada de tomate con 83

hectáreas, cultivadas en su totalidad bajo agricultura protegida, con un rendimiento de 136.93 toneladas por hectárea; siendo el mayor rendimiento entre los municipios productores de tomate del Estado de México. Inclusive, en el Estado de México se tienen rendimientos superiores al estado de Sinaloa (SIAP, 2016).

Una de las limitantes de la producción de tomate en la zona de estudio es la marchitez de plantas causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium*. El género *Fusarium* se encuentra dentro del complejo de los hongos causantes de la enfermedad conocida como damping off o secadera de plántulas. Este hongo ataca a las raicillas de las plántulas, penetrando el micelio hasta alcanzar los vasos conductores, los cuales quedan obstruidos causando una podredumbre de la raíz, marchitamiento y finalmente mata a las plántulas (Agrios, 2005; Leslie y Summerell, 2006; Ramírez y Saínz, 2010).

A nivel plántula los síntomas de la enfermedad son en la base del cuello y se observa por una necrosis que produce un estrangulamiento circular del tallo, interfiriendo en la circulación de la savia, así como una podredumbre y posterior necrosis de las raíces (Ramírez y Saínz, 2010).

Hoy en día existe un grupo de hongos y bacterias que juegan un papel antagónico para el control de hongos fitopatógenos del suelo y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico para combatir patógenos vegetales. Entre estos microorganismos se encuentran algunas bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, y hongos de los géneros *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Epicoccum* y *Trichoderma* (Fernández y Vega 2001; Hernández, 2011; Hoyos, 2012).

El género *Trichoderma* se ha caracterizado como un potencial controlador biológico por sus diversos mecanismos de acción para inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos como son el micoparasitismo, la competencia, la actividad antibiótica y la inducción de resistencia a plantas (Elad *et al.* 1983; Samuels, 1996; Howell, 2003; Hernández *et al.* 2015).

Con el uso de cepas nativas de *Trichoderma* se puede tener un mejor control de los parásitos del suelo, ya que las cepas están adaptadas a las condiciones ambientales de México, en comparación con las cepas comerciales que son importadas de otros países y comercializadas en nuestro país.

Se identificaron siete cepas del hongo antagonista *Trichoderma* y cuatro del fitopatógeno *Fusarium*; se realizaron pruebas de patogenicidad en plántulas de tomate utilizando las cepas del fitopatógeno *Fusarium*, esto para determinar la cepa patogénica y con mayor virulencia hacia el cultivo de tomate; posteriormente se realizaron pruebas *in vitro* de control con cepas nativas de *Trichoderma*; con base en los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* se realizó un prototipo de un biofungicida a base de la cepa con mayor potencial; posteriormente se probó su efectividad de control en una prueba piloto *in vivo* bajo invernadero en plántulas de tomate, demostrando su control hacia la enfermedad. Al igual, se observó un mayor crecimiento longitudinal de las plántulas que fueron inoculadas con este antagonista.

Esta investigación constituye los primeros pasos para la producción y comercialización de un biofungicida, el cual podrá beneficiar a los productores tanto económicamente como al permitirles realizar una agricultura más sustentable y amigable con el ambiente reduciendo el uso y aplicación de fungicidas.

Objetivos e Hipótesis.

Objetivo general.

- Evaluar la efectividad del prototipo de un biofungicida formulado a base de una cepa nativa de *Trichoderma spp* de Coatepec Harinas, Estado de México, para el control biológico de *Fusarium spp*, a nivel *in vitro* e *in vivo* en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*).

Objetivos particulares.

- Aislar e identificar los hongos del género *Fusarium spp* causantes de damping off, así como los hongos antagonistas del género *Trichoderma spp* a partir de suelo del estado de México.
- Seleccionar la especie del género *Fusarium spp* con mayor virulencia hacia plántulas de tomate.
- Evaluar *in vitro* el potencial de controlador al patógeno *Fusarium spp* causante del damping off en plántulas de tomate mediante cepas nativas de *Trichoderma spp*.
- Elaborar un prototipo de un biofungicida a base de una cepa nativa de *Trichoderma spp* para el control biológico de *Fusarium spp*.
- Realizar pruebas *in vivo* con plántulas de tomate para evaluar la efectividad del biofungicida.

Hipótesis.

El biofungicida realizado a partir de una cepa nativa de *Trichoderma spp* reduce la enfermedad de damping-off en plántulas de tomate causada por *Fusarium spp*.

Capítulo 1. Marco teórico y conceptual.

1.1 Conceptos de Control biológico.

El control biológico ha tenido diferentes definiciones a través del tiempo, las cuales tienen gran similitud entre ellas; sólo se han ido actualizando con nuevos términos. La primera definición de Control Biológico fue hecha por DeBach en 1964, quien la define como “la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia” (Zavaleta *et al.* 2015).

Cook y Baker en 1983 definieron al control biológico como “la reducción de la cantidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno que se logra mediante la acción de uno o más organismos además del hombre” (Bautista *et al.*, 2008).

Nigam y Mukerji (1988) definen al control biológico como “el uso de uno o más procesos biológicos para bajar la densidad de inóculo del patógeno o reducir sus actividades patogénicas” (Zavaleta *et al.* 2015).

En 1987 La Academia Nacional de las Ciencias de los Estados Unidos de América lo definió como “el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir el efecto de organismos indeseables (plagas) y favorecer organismos deseables como cultivos, arboles, animales e insectos y microorganismos benéficos”; según Erwin y Ribeiro (1996).

Una definición más reciente es la propuesta por Van Driesche y Bellows en 1996 quienes expresan que “el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plaga, haciendo esta menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de estos” (Guédez *et al.* 2008; Bautista *et al.* 2008).

En fitopatología el termino control biológico se refiere al “uso o manipulación de organismos vivos, nativos o introducidos que estimulen la resistencia de la planta o supriman la actividad en poblaciones de uno o más fitopatógenos” (Hoyos, 2012; Pal y McSpadden, 2006).

Aun en la actualidad se admite la definición de Baker y Cook en 1974, propuesta hace más de 40 años; “la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar”, siendo ellos los pioneros en el control biológico de fitopatógenos. Esta definición es la más aceptada, ya que estos investigadores toman en cuenta factores ambientales y al hospedero, ya que el fitopatógeno o plaga que se requiera controlar va a tener diferente comportamiento en diferentes ambientes, hospederos y suelos. Al igual que van a presentar diferente comportamiento en diferentes variedades o cultivares, o al variar el lugar y la fecha de siembra; presentándose así casos específicos de control dependiendo los factores ambientales, hospedero y fitopatógeno (Zavaleta *et al.* 2015; Guédez *et al.* 2008; Bautista *et al.* 2008).

1.2 Tipos de control biológico.

1.2.1 Control biológico por conservación.

Este tipo de control biológico consiste en preservar en el agroecosistema a los enemigos naturales de las plagas intactos, así como modificar el hábitat en beneficio de los enemigos naturales para así potenciar sus actividades de control, y reducir el efecto de las plagas. Para ello, se necesita hacer un estudio de las especies de plagas agrícolas de la zona que se encuentran dentro del agroecosistema y conocer cuáles son sus enemigos naturales con mayor potencial de control. Las labores culturales que se pueden realizar para modificar el hábitat y por ende potenciar la actividad y reproducción de los enemigos naturales consiste en el manejo de cubiertas vegetales, utilizando la siembra de policultivos, manipulación de la vegetación que rodea el cultivo, formando corredores biológicos, preservando plantas

hospederas de los enemigos naturales o provisión de plantas hospederas alternativas, formando cortinas rompe vientos vivas (Gúédez *et al.* 2008; Paredes *et al.* 2013).

Este tipo de control biológico no representa un mayor costo adicional para el agricultor ni para el medio ambiente, ya que no se realizan liberaciones de plagas exóticas o de organismos que no sean autóctonos de la región. La principal desventaja de esta estrategia de control son los largos y costosos estudios para conocer las especies de organismos plaga y control dentro del agroecosistema (Alomar y Albajes, 2005; Gúédez *et al.* 2008).

1.2.2 Control biológico clásico.

El control biológico clásico se basa en la introducción de un enemigo natural de la plaga a combatir en un nuevo ambiente; es decir, introducir un enemigo natural exótico con el fin de que este se establezca y se quede de forma permanente en el agroecosistema regulando de manera sostenida a la plaga. Para poder decir que un programa de control biológico clásico tuvo éxito, es necesario evaluarlo durante varios años; se estima que se deben de esperar de 6 a 7 generaciones de la plaga antes de evaluar el éxito; al igual, el enemigo natural debe de establecerse, adaptarse y realizar su función de controlador en el nuevo ambiente (Van *et al.* 2007, Silva, 2011; Villacide y Corley, 2012).

Este tipo de control biológico da mayores resultados en agroecosistemas con especies perennes como en cultivo de frutales, áreas naturales y forestales; ya que en estos agroecosistemas se permite que la interacción plaga-enemigo natural sea por periodos de tiempo más prolongados (Villacide y Corley, 2012).

1.2.3 Control biológico aumentativo.

Este tipo de control biológico se basa en realizar una producción y liberación masiva del enemigo natural nativo que ya está presente en el área afectada, pero en una población muy baja la cual no alcanza a realizar un control efectivo; al igual este tipo de control tiene como objetivo el realizar liberaciones periódicas de enemigos naturales exóticos que no se han

podido establecer en la zona afectada, esto para poder generar presión sobre el enemigo natural y conseguir el establecimiento de manera permanente. Las liberaciones de enemigos naturales se pueden realizar de dos maneras: liberaciones inundativas o inoculativas (Van *et al.* 2007; Villacide y Corley, 2012).

- Liberación inundativa: consiste en la liberación de un gran número de individuos de enemigos naturales, ejerciendo así una rápida reducción de la población plaga. Realizando así un control por acción directa de la liberación del enemigo natural efectuando un control rápido por supresión de la plaga por parte del biocontrolador y no por el establecimiento, adaptación y reproducción del mismo (Villacide y Corley, 2012).
- Liberación inoculativa: consiste en hacer liberaciones periódicas y de un número reducido de individuos de enemigos naturales, esperando que se regule la población de la plaga de una manera más persistente, dando mayor oportunidad al biocontrolador de adaptarse al agroecosistema y realizar un control permanente por medio de la descendencia (Villacide y Corley, 2012).

1.3 Agricultura protegida.

La agricultura protegida es aquella que se realiza bajo métodos de producción donde se controlan los factores externos como la temperatura, luz, agua, humedad, calor y fertilización. Permitiendo obtener mayores rendimientos en los cultivos, minimizando los daños por malas condiciones climáticas que puede ocasionar la producción a cielo abierto. Con el uso de cubiertas plásticas se producen alimentos inocuos¹, además de poder aprovechar ventanas de mercado con productos fuera de temporada en campo abierto y que se pueden producir bajo la agricultura protegida. La agricultura protegida se realiza bajo estructuras como invernaderos, malla sombra y casa sombra, macro túnel y micro túnel (Morales y Payán, 2010).

¹ Un alimento inocuo es aquel que garantiza que no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido, de acuerdo con los requisitos higiénico-sanitarios.

- Invernadero: es una construcción ligera cuya cubierta es traslúcida y con ventilación cenital, facilitando el calor durante el día y resguardándolo durante la noche; un invernadero tiene como objetivo simular las condiciones climáticas adecuadas para el crecimiento y desarrollo de las plantas, protegiéndolas de los factores climáticos perjudiciales del exterior como son altas y bajas temperaturas, lluvias torrenciales, vientos, granizadas, cantidad y calidad de luz. Los invernaderos se clasifican en relación a su nivel de tecnología en: tecnología alta, media y baja. El nivel de tecnificación de un invernadero va a depender de los equipos necesarios que tenga instalados para controlar temperaturas, luminosidad, humedad ambiental y del sustrato, aporte de CO₂, ventilación, aireación, pantallas térmicas y sistema de riego computarizado (Juárez *et al.* 2011; Estrada, 2012).
- Malla sombra y casa sombra: son sistemas alternativos a los invernaderos que tiene función disminuir la radiación directa (10-95% del total de radiación solar) y reducir la velocidad del viento, así como impedir el paso de insectos al utilizarlas en invernadero. El uso de malla sombra y casa sombra ha resultado una alternativa viable y económica para la producción de semilleros de hortalizas, hortalizas y una gran cantidad de ornamentales. La desventaja del uso de malla y casa sombra es que no se puede tener un control ambiental dentro de la zona de cultivo como lo es con el uso de un invernadero (Juárez *et al.* 2011; Estrada, 2012).
- Macro túnel y micro túnel: estructuras que no tienen las características apropiadas en ancho y largo de canal para ser considerados invernaderos, son de una altura media y son estructuras sencillas de construir y operar, tienen un menor costo que los invernaderos. La principal función del macro túnel es brindar una barrera física ante los eventos climáticos del exterior, así como aislar a las plantas de plagas y enfermedades. La diferencia entre un macro túnel y un micro túnel es el tamaño, teniendo los primeros un tamaño de 4 a 5 metros de ancho y de 2 a 3 metros de altura en la parte más alta, permitiendo así poder realizar labores dentro del túnel; mientras que el micro túnel por sus reducidas dimensiones (30 a 90 cm de altura y de 90 a 150

cm de anchura) no es posible que se puedan realizar las labores desde el interior por lo que las labores se realizan desde el exterior. Una de las ventajas del macro túnel en comparación de un invernadero es su bajo costo y fácil construcción (Juárez *et al.* 2011; Estrada, 2012).

A nivel mundial México se posiciona en el séptimo lugar entre los países con mayor superficie de hectáreas bajo agricultura protegida. Para el año 2010 la Asociación Mexicana de Horticultura Protegida (AMHPAC), reportó una superficie sembrada de 15,300 hectáreas; los invernaderos abarcan el 44% de la superficie sembrada, el 49% lo constituyen las mallas sombra y el resto los macro y micro túneles. A nivel nacional, el estado de Sinaloa ocupa el primer lugar con mayor superficie de hectáreas bajo agricultura protegida (22.03%), el segundo lugar lo ocupa el estado de Jalisco (15.37%) y Baja California el tercer lugar (12.29%). Los principales cultivos que se producen bajo agricultura protegida son el tomate, pepino, pimiento, fresa, chile habanero, ornamentales y aromáticas (OIEDRUS, 2011; SAGARPA, 2012).

La producción de tomate en campo abierto tiene un rendimiento promedio de 70 ton/ha, mientras que la producción bajo invernadero reporta un rendimiento promedio de 350 ton/ha (SAGARPA, 2012).

1.4 Descripción general del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

El tomate es una planta perenne de la familia *Solanaceae*, aunque se cultiva como una planta de ciclo anual. Su centro de origen se localiza en la región de los Andes, región que se compone por los países de Colombia, Bolivia, Chile y Perú; por su parte México es considerado el principal centro de domesticación del tomate. Es un cultivo con amplio rango de adaptación; se cultiva en climas templados en casi toda la República Mexicana (Mondragón, 2007; SFA, 2010).

Existen variedades de crecimiento determinado e indeterminado². Su sistema radical comprende una raíz principal pequeña, con raíces secundarias grandes, fuertes y vigorosas; en el tallo cerca del suelo la planta desarrolla raíces adventicias. Tallo principal con grosor de 2-4 cm de diámetro sobre el cual se desarrollan hojas, así como una diferenciación de crecimiento de tallos secundarios. Hojas alternas, compuestas e imparipinadas, con foliolos (7-9) peciolados, con borde dentado y recubiertos de pelos glandulares. Las flores se agrupan en inflorescencias que se desarrollan en las axilas cada 2-3 hojas; flor perfecta compuesta por 5 sépalos y 5 pétalos, estos últimos de color amarillo; con mismo número de estambres que se alternan entre los pétalos. El fruto es una baya bi o plurilocular; constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Mondragón, 2007; Ramírez y Sainz, 2010; SFA, 2010).

El producir hortalizas bajo invernadero tiene como ventaja que cuando las condiciones climáticas a campo abierto son adversas estas condiciones se pueden controlar, con lo que se logra una mayor producción y calidad de la hortaliza. Los rangos de temperatura que se deben de considerar para la producción de tomate son de 20° a 25°C, procurando tener siempre una temperatura optima entre los 23° y 24°C. (Tabla 1). El tomate requiere una oscilación de temperatura entre el día y la noche de entre 8 y 12°C, que favorece su crecimiento y formación de mayor número de frutos (Mondragón, 2007; Velasco *et al.* 2011).

Tabla 1. Temperatura óptima, máxima y mínima del tomate.

Etapa fenológica	Temperatura			
	Optima	Máxima	Mínima	Diurna/Nocturna
Germinación	25 a 28°C	> 30°C	< 10°C	-
Crecimiento	21 a 26°C	> 35°C	< 10°C	24°C/17°C
Floración	23 a 26°C	> 35°C	< 12°C	24°C/16°C
Fructificación	18 a 24°C	> 29°C	< 8°C	14 a 18°C/23 a 26°C

Elaboración propia con datos de Nuño, 2007 y Velasco, 2011.

La humedad relativa óptima para el cultivo de tomate es del 50 al 60%. La humedad relativa mayor del 80% favorece el desarrollo de enfermedades fungosas como tizón temprano

² **Determinado:** Plantas arbustivas con tamaño de planta definido, el tamaño de la planta varía según el cultivar.

Indeterminado: Plantas donde su crecimiento vegetativo es continuo, pudiendo llegar a alcanzar su tallo hasta por más de 12 metros.

(*Alternaria solani*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y botrytis o moho gris (*Botrytis cinerea*). El exceso de humedad en el suelo provoca el desarrollo de hongos como *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*, los cuales provocan daño en la raíz y en el cuello de la planta, causando marchitamientos (Mondragón, 2007; Velasco *et al.* 2011).

El cultivo de tomate necesita altas intensidades de luz, sobre todo desde la emergencia hasta la maduración de los primeros frutos. El tomate es una planta de fotoperiodo largo, es decir, necesita días largos (mayores a 12 hora de luz), ya que bajo esta condición la planta tiene un ciclo vegetativo más corto y por lo tanto la fructificación se ve favorecida, además de que se tiene un mayor incremento de peso en el fruto, lo cual favorece el rendimiento (Mondragón, 2007; Nuño, 2007).

1.4.1 Producción de plántulas de tomate.

Un almacigo o semillero es una superficie que se localiza en un lugar adecuado para el manejo y cuidado de plantas para trasplante; el cual comúnmente se encuentra bajo alguna cubierta plástica. La producción de plántula en una producción agrícola es fundamental ya que de esta dependerá el éxito de la plantación, teniendo plántulas sanas libres de plagas y enfermedades. La producción de plántula de tomate puede ser una opción del agricultor para obtener plántulas de calidad para obtener una producción homogénea en campo; así como ganar un poco de tiempo al poderlas producir bajo invernadero antes de que las condiciones ambientales del exterior sean las adecuadas para la germinación de la semilla; se logra mayor rentabilidad al poder reducir el tiempo de permanencia del cultivo en el terreno definitivo, obteniendo así un adelanto en la producción estableciendo plantas con un avance en el crecimiento y desarrollo (Lardizabal, 2007; Reveles *et al.* 2010).

El sustrato es fundamental para asegurar una buena calidad de plántula, ya que es en este donde crece el sistema radicular formando un cepellón; la mezcla de sustrato debe de tener una buena retención de humedad, aireación del sistema radicular, buen drenaje, capilaridad, que sea liviano y barato. Se utilizan charolas germinadoras ya sean de poliestireno expandido

o de unicel; normalmente para plántulas de tomate se utilizan charolas de 200 cavidades. Las charolas se deben de desinfectar para asegurar la asepsia en la plántula. La siembra en las charolas se debe de realizar con la mayor precisión posible tratando de colocar una sola semilla en el centro de cada cavidad de las charolas a una profundidad de 2 a 3 mm y posteriormente cubrirlas con el mismo material y realizar un riego pesado para humedecer totalmente el sustrato; la siembra de la semilla puede realizarse de manera manual o automatizada (Reveles *et al.* 2010).

El riego es un factor clave para una buena calidad de plántula, ya que un mal manejo de riego puede ocasionar la aparición de enfermedades; la charola debe de tener una uniformidad de riego; se recomienda que los riegos sean por aspersión o microaspersión esto para evitar que las gotas de agua sean grandes y con la fuerza al caer puedan arrancar la plántula. Los riegos se pueden hacer manuales o en compañías dedicadas a la producción de plántulas el riego se realiza mecanizado por medio de sistemas de riego con boquillas por microaspersión (Lardizabal, 2007).

La temperatura al igual es un factor clave para obtener una buena calidad de plántulas, la cual debe de estar de 25 a 28°C para asegurar una buena germinación y desarrollo de plántula (Velasco *et al.* 2011).

La fertilización en las plántulas influye tanto en su desarrollo, como en el comportamiento y productividad en campo. Para la producción de plántula se considera importante la fertilización de nitrógeno, fosforo y potasio, siendo el nitrógeno el elemento que tiene mayor impacto en el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Reveles *et al.* 2010; Velasco *et al.* 2011).

Una plántula de calidad se distingue por presentar tallos vigorosos, con una altura de 7 a 12 cm, sin amarillamiento o clorosis de hojas, libre de plagas y enfermedades y lo más importante con un buen sistema radical (Lardizabal, 2007; Reveles *et al.* 2010).

1.5 Situación actual del cultivo del tomate.

1.5.1 Situación mundial.

En el año 2013 se tuvo una producción mundial de más de 214 millones de toneladas de tomate, siendo China el principal productor mundial con 50,664,255 toneladas lo cual corresponde al 23.66% de la producción mundial. El segundo lugar fue la India con una producción de 18,227,000 toneladas (8.51%), posicionándose en tercer lugar Estados Unidos de América con 12,574,550 toneladas anuales de tomate (5.87%). México se posicionó en el décimo lugar con una producción anual de 3,282,583 toneladas (1.53%) (Figura 1) (FAO, 2015).

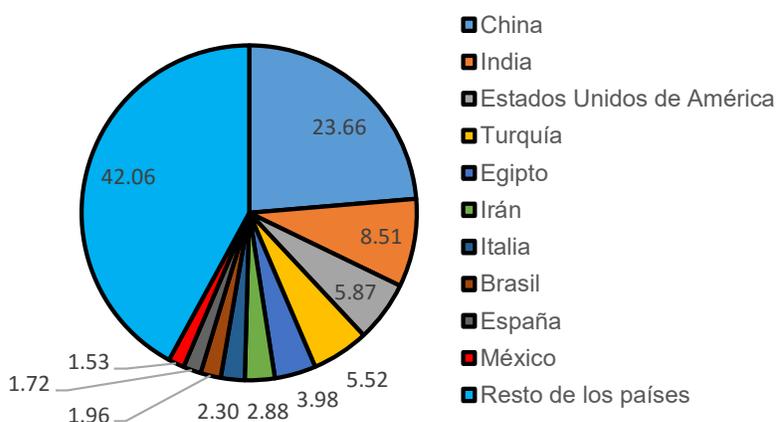


Figura 1. Gráfica de la participación en la producción mundial de tomate para el año 2013 (%).

Producción mundial de 214,098,294 toneladas.

Fuente: Elaboración propia con datos de la FAO, 2015.

1.5.2 Situación nacional.

La producción de tomate en México a lo largo de los últimos diez años ha tenido un decremento en la cantidad de hectáreas sembradas; lo cual no se ve reflejado en la producción, ya que a pesar de que ha disminuido la superficie sembrada, el rendimiento de tomate ha ido en aumento. En el año 2004 se tenía una superficie sembrada de 76,605.26

hectáreas con una producción de 2,314,629.90 toneladas, mientras que para el año 2014 la cantidad de hectáreas sembradas fue de 52,374.91, con una producción de 2,875,164.08 toneladas³. (Figura 2) Del año 2012 en adelante, se han obtenido mayores rendimientos en la producción de tomate, esto reflejándose en que la producción se ha incrementado (SIAP, 2016).

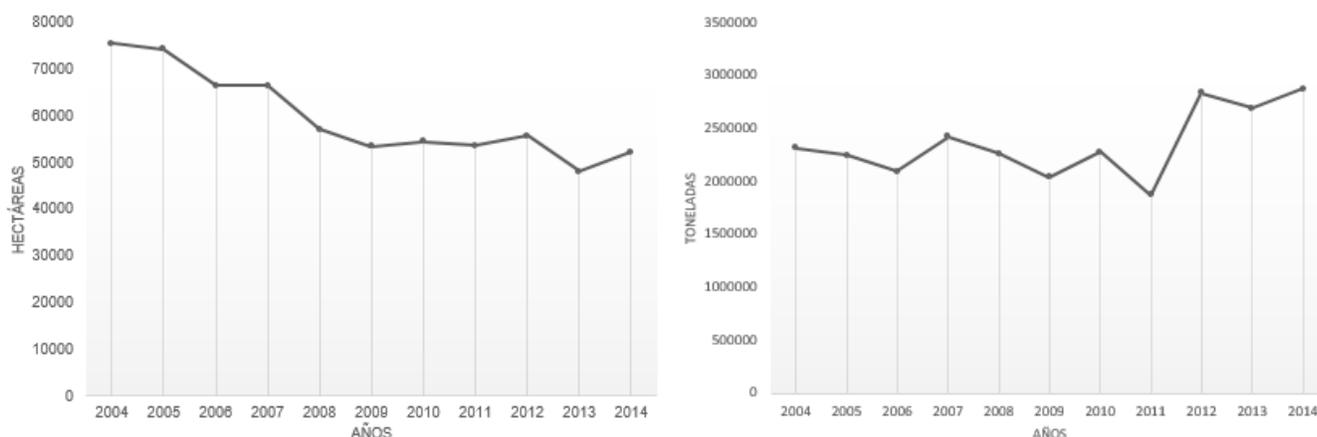


Figura 2. Gráficas de la superficie nacional sembrada con tomate (izq.), producción nacional de tomate (der.) periodo 2004-2014.

Fuente: Elaboración propia con datos del SIAP, 2016.

El principal estado productor de tomate es el estado de Sinaloa con el 30% de la producción nacional, seguido por Michoacán (5.90%) y Zacatecas (5.27%). El estado con mayores rendimientos es Sonora, obteniendo una cosecha de 78.81 toneladas por hectárea (Tabla 2) (SIAP, 2016).

³ Datos varían según fuente.

Tabla 2. Principales estados productores de tomate por superficie sembrada en México.

Ciclo: Cíclicos y Perennes 2014							
Modalidad: Riego + Temporal							
Tomate rojo (Jitomate)							
Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)	
1	Sinaloa	15,307.13	14,629.13	867,832.04	59.32	3,655.80	3,172,619.21
2	Michoacán	6,008.50	5,983.50	169,768.98	28.37	5,384.98	914,201.74
3	Zacatecas	2,698.47	2,693.47	151,691.99	56.32	4,316.73	654,813.76
4	San Luis Potosí	2,694.80	2,646.80	196,011.25	74.06	5,640.26	1,105,553.91
5	Baja california sur	2,691.20	2,567.20	141,236.90	55.02	6,960.92	983,138.65
6	Jalisco	2,263.20	2,259.20	158,561.46	70.18	8,563.92	1,357,907.88
7	Morelos	2,245.20	2,244.20	81,415.20	36.28	6,158.30	501,379.22
8	Veracruz	2,190.50	2,094.50	48,387.12	23.1	6,348.17	307,169.52
9	Baja california	2,022.50	1,999.00	135,741.05	67.9	10,616.92	1,441,151.63
10	Nayarit	1,589.00	1,395.34	50,963.76	36.52	4,653.03	237,135.85
11	Sonora	1,549.30	1,540.30	121,387.29	78.81	5,147.22	624,807.45
12	Tamaulipas	1,448.80	1,359.80	38,116.90	28.03	6,243.37	237,977.79
13	México	1,326.67	1,314.67	96,159.44	73.14	6,481.27	623,234.89
14	Chiapas	997.55	997.55	35,636.39	35.72	7,719.10	275,080.82
15	Guerrero	985.47	985.47	18,714.12	18.99	5,671.82	106,143.10
16	Otros	6356.62	6252.52	563540.19	1278.61	101361.5	3193190.89
Total nacional		52,374.91	50,962.65	2,875,164.08	56.42	5,472.91	15,735,506.33

Fuente: SIAP, 2016

1.5.3 Situación estatal.

El estado de México aporta el 3.34% de la producción nacional de tomate, con una producción de 96,159.44 toneladas (Tabla 2). Cifras del SIAP de producción del año 2014, reportan que el estado de México tiene un rendimiento de 73.14 ton/Ha; superando al estado de Sinaloa cuyo rendimiento es de 59.32 ton/Ha, al igual que el valor de la producción en el estado de México es superior al estado de Sinaloa (SIAP, 2016).

1.6 Enfermedades del tomate causadas por hongos del suelo.

1.6.1 Marchitez sureña.

Agente causal: *Sclerotium rolfsii*

El principal síntoma es un marchitamiento en toda la planta hasta que esta muere; enfermedad que produce ahogamiento o pudrición en tallo, raíces, semillas o frutos. En la base del tallo así como en la raíz se observa un crecimiento micelial blanco que se puede extender en los alrededores del suelo. Formación de esclerocios de 1 a 2 mm, estructuras de resistencia que se forman en masas de micelio, de color café. Estas estructuras pueden encontrarse en las zonas dañadas del tallo cercanas al cuello de la raíz. Este patógeno se disemina principalmente por el riego o por suelo infestado con esclerocios, los cuales cuando encuentran condiciones favorables germinan e infectan al cultivo. El fruto puede infectarse si está en contacto con el suelo infestado; el fruto se vuelve suave y blando en la parte donde fue infectado, y en tres días se observa la presencia de micelio blanco y formación de abundantes esclerocios (Ramírez y Saínz, 2010; Velasco *et al.* 2011; Gómez *et al.* 2011).

1.6.2 Marchitez por *Verticillium*.

Agente causal: *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*

Los primeros síntomas son amarillamientos de hojas, empezando en el margen de un foliolo; las hojas más viejas se van tornando amarillas y posteriormente se secan. El amarillamiento progresa hacia el tallo, con lo que solo las hojas superiores permanecen verdes. Los frutos permanecen pequeños, y con manchas amarillas; las plantas infectadas pueden presentar achaparramientos. El hongo penetra por la raíz, creciendo rápidamente hacia los canales de conducción de savia interfiriendo en la distribución de agua y nutrientes, *Verticillium* produce una toxina que contribuye a la marchitez de las hojas (Productores de hortalizas, 2006; Ramírez y Saínz, 2010).

1.6.3 Moho blanco.

Agente causal: *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*

Esta enfermedad ocasiona la pérdida de vigor en la planta, seguido por marchitamiento y muerte de la planta. Alta humedad relativa, días nublados favorecen el desarrollo de este hongo. Es común encontrar en la base de la planta crecimiento micelial blanco; el hongo ocasiona una pudrición en el tallo, provocando un ahuecamiento del mismo; dentro del tallo se llegan a formar esclerocios, los cuales son estructuras de resistencia que sobreviven en el suelo de una temporada a otra. El hongo daña hojas, tallos, pecíolos y frutos; causando en estos últimos una pudrición blanda (FAO, 2003; Álvarez y Delgadillo, 2004; Ramírez y Saíenz, 2010).

1.6.4 Pudrición de la corona y raíz.

Agente causal: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Los síntomas se presentan durante la etapa de fructificación; los primeros síntomas son un ligero amarillamiento en los bordes de las hojas más viejas y sucesivamente avanza hacia las hojas superiores. El amarillamiento progresa hacia el peciolo ocasionando la muerte de la hoja. En plantas muy afectadas se presenta en el tallo una necrosis vascular de color café oscuro que se extiende hasta 30 cm por encima del cuello del tallo. Se ocasiona una pudrición seca en la raíz principal y numerosas lesiones de color café en las raíces laterales; en la mayoría de las plantas afectadas se puede observar una coloración purpura en el tejido de las raíces. En la mayoría de las veces las plantas se van marchitando lentamente y logran sobrevivir hasta el final de la temporada (Álvarez y Delgadillo, 2004; Ramírez y Saíenz, 2010).

1.6.5 Marchitez del tomate.

Agente causal: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Las plantas comienzan con un amarillamiento de las hojas más viejas y mientras avanza la enfermedad la marchitez se extiende a todas las hojas. Las hojas afectadas mueren aunque queden adheridas al tallo. Al hacer un corte transversal del tallo, se puede observar una coloración café oscura en forma de anillo en los conductos xilemáticos del tallo. Cuando las raíces y los tallos son invadidos se muestran síntomas de una pudrición negra, principalmente sobre las raíces laterales, lo cual acelera el marchitamiento del follaje. La enfermedad se disemina por medio de las semillas, riego, labores del suelo y viento (Productores de hortalizas, 2006, Gómez *et al.* 2011, Ramírez y Saíenz, 2011).

1.6.6 Damping off o ahogamiento del tallo.

Agentes causales: *Pythium* spp, *Phytophthora* spp, *Fusarium* spp y *Rhizoctonia* spp.

Enfermedad que se presenta en los almácigos o semilleros, ocasionando una pudrición en el cuello de la plántula, aunque se puede presentar en plantas después del trasplante. Se consideran dos tipos de damping off, pre-emergente y post-emergente (Ramírez y Saíenz, 2011; Velasco *et al.* 2011).

- Pre-emergente: Es la pudrición de semilla o la muerte de la plántula, la cual ocurre al iniciarse el desarrollo de la radícula, es decir, antes de que la planta emerja. Esta condición provoca confusión al hacer pensar que la semilla es vana o de poca germinación (Velasco *et al.* 2011).
- Post-emergente: Se provoca una necrosis en el tallo, cerca de la superficie del suelo o por debajo de esta. El tejido del tallo que se encuentra cerca del suelo se vuelve blando y acuoso y se ve manifestado en el marchitamiento de las hojas y las plántulas se vuelven flácidas y posteriormente se doblan (Velasco *et al.* 2011).

Los síntomas de la enfermedad están en función al hongo que este atacando la plántula. El género *Phytophthora* causa pudriciones en el cuello de la plántula de color café, la pudrición puede alcanzar una altura en el tallo de hasta 10 cm y puede atacar también al follaje. Por su parte el género *Pythium* ocasiona una pudrición en la semilla causando problemas para la

germinación; los síntomas son un amarillamiento de hojas debido a lesiones acuosas en el cuello de la planta. *Rhizoctonia* causa marchitamiento en plántulas debido a daños ocasionados en el cuello de la plántula y una pudrición en la raíz principal; en el tallo se llega a observar un cancro de color café, lo cual es una característica principal de este género. Por último, el género *Fusarium* ocasiona la pudrición y estrangulamiento del cuello de la raíz, provocando que las plántulas recién emergidas se marchiten rápidamente; se puede apreciar una coloración negruzca por encima del cuello de la raíz, y en plantas más afectadas se observa una necrosis de color café oscuro en el tallo (Ramírez y Saínez, 2011; Velasco *et al.* 2011; Gómez *et al.* 2011; González *et al.* 2013).

1.7 Situación actual de plaguicidas químicos y bioplaguicidas.

En México se comercializan alrededor de 2 mil 300 plaguicidas, de los cuales el 90% son sintéticos y el 10% son bioplaguicidas. En México se producen fungicidas, herbicidas e insecticidas, siendo el ingrediente activo en su mayoría importado de otros países principalmente de Estados Unidos y Alemania y solo algunas compañías mexicanas se dedican a realizar el formulado, ya que este último también en su mayoría es importado. México tuvo un valor de mercado de plaguicidas de 13,000 millones de pesos para el año 2013; y un valor de producción de plaguicidas en el año 2011 de 8,746 millones de pesos. En el año 2011, México tuvo una producción de 60,000 toneladas de fungicidas (Biofabrica, 2012; Romero, 2013).

De acuerdo a la información de la FAO (2016), en 10 años el uso de fungicidas en México aumentó, durante el año 2000 se tenía un uso de fungicidas de 23,424 toneladas, mientras que para el año 2010 se reportó un uso de 55,331 toneladas, siendo esta cifra la más alta en el periodo comprendido del 2000 al 2013; cabe mencionar que el reporte más reciente de uso de fungicidas es del año 2013, con un uso de 42,223 toneladas, esto refleja una disminución del uso de fungicidas a partir del año 2010 (Figura 3), esto se puede deber a las políticas y reglas de inocuidad que se han elaborado en los últimos años, haciendo conciencia del daño que estos productos químicos causan al medio ambiente; así como a la introducción de

producir alimentos orgánicos, libres de productos químicos, siendo estos últimos exigidos por mercados de exportación (FAO, 2016).

Año	Toneladas
2000	23424
2001	19806
2002	7994.54
2003	10658.09
2004	12407.29
2005	49542.3
2006	49738.37
2007	46718.45
2008	50845.36
2009	46366.56
2010	55331
2011	53091
2012	41293
2013	42223

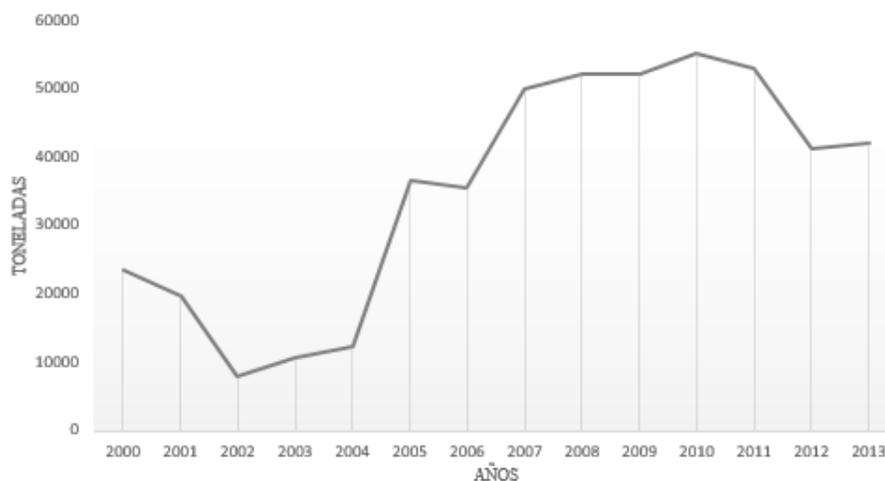


Figura 3. Uso de fungicidas en México (gráfica 2000-2013).

Elaboración propia a partir de FAO, 2016.

Se estima que durante el 2010 el tamaño del mercado mundial de bioplaguicidas ascendió a 1,213 millones de dólares, y se espera que para el año 2017 tenga un tamaño de 3,222 millones de dólares. En cuanto al mercado de biofungicidas se estima que para el año 2011 fue de 600.5 millones de dólares, y se espera que se te tenga un incremento para el año 2017 con un valor de mercado de 1,445 millones de dólares. Para el caso específico de América Latina en el año 2011 el mercado de biofungicidas tuvo un valor de 62.5 millones de dólares y se espera un crecimiento hasta 148.8 millones de dólares para el año 2017. Estos indicadores son parte importante para las empresas dedicadas a la formulación y comercialización de bioplaguicidas, ya que la demanda de los biofungicidas a través del paso de los años cada vez es mayor, siendo impulsado este mercado por factores como la

tecnología y el desarrollo de productos innovadores de bioplaguicidas que puedan ser rentables y accesibles para los productores agrícolas; al igual que las exigencias por parte de los mercados alimenticios donde la exigencia de productos orgánicos y libres de pesticidas químicos por parte de los consumidores va en aumento (Bettiol *et al.* 2014).

1.8 Taxonomía de los hongos *Fusarium* y *Trichoderma* (NCBI, 2015).

Súper Reino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Subreino: *Dikarya*

División: *Ascomycota*

Subdivisión: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Nectriaceae*

Género: *Fusarium*

Súper Reino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Subreino: *Dikarya*

División: *Ascomycota*

Subdivisión: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocreaceae*

Género: *Trichoderma*

Tanto el hongo *Fusarium* como *Trichoderma*, pertenecen a la división *Ascomycota*; este grupo de hongos es el más numeroso, abarcando más de 64 mil especies. Esta división se caracteriza por tener ejemplares en una gran cantidad de hábitats presentándose en el suelo como saprobios, otros asociados con algas, cianobacterias para formar líquenes o con las raíces de las plantas para formar ectomicorrizas. Además, dentro de esta división existe una diversidad de hongos que se usan para la fermentación dentro de la industria panadera, vinícola y cervecera. En este grupo se incluyen hongos parásitos de gran importancia económica, causantes de gran cantidad de enfermedades de las plantas cultivadas. Algunos hongos producen hormonas, alcaloides tóxicos y micotoxinas (Agrios, 2005; Universidad de Almería, sin año; Ferrera y Alarcón, 2010).

Los Ascomicetos se diferencian del resto de los hongos verdaderos por la producción de esporas sexuales en ascas⁴ (ascosporas), presentan micelio con hifas septadas, cada septo presenta un poro simple que permite a los núcleos emigrar de una célula a otra (Ferrera y Alarcón, 2010).

La reproducción asexual se puede llevar a cabo por, fisión, fragmentación del micelio, formación de clamidosporas o de conidiosporas. Los conidios son producidos mediante la fragmentación o gemación por células conidiógenas llamados conidióforos que se forman a partir de hifas especializadas. En algunas especies estas estructuras aparecen en cuerpos más complejos como picnidios, sinema, esporodoquio, acérvulo (Figura 4) (Universidad de Almería, sin año; Agrios, 2005; Ferrera y Alarcón, 2010).

⁴ Asca: Célula en forma de saco o bolsa que generalmente contiene un número definido de ascosporas (típicamente ocho), que se forman (por un proceso llamado formación de células libres) por lo común después de la cariogamia y la meiosis. Estructuras homólogas a los basidios de los basidiomicetes, aunque difieren en que los segundos originan esporas exógenas, en tanto que las primeras las producen endógenas (Ulloa y Hanlin, 2006).

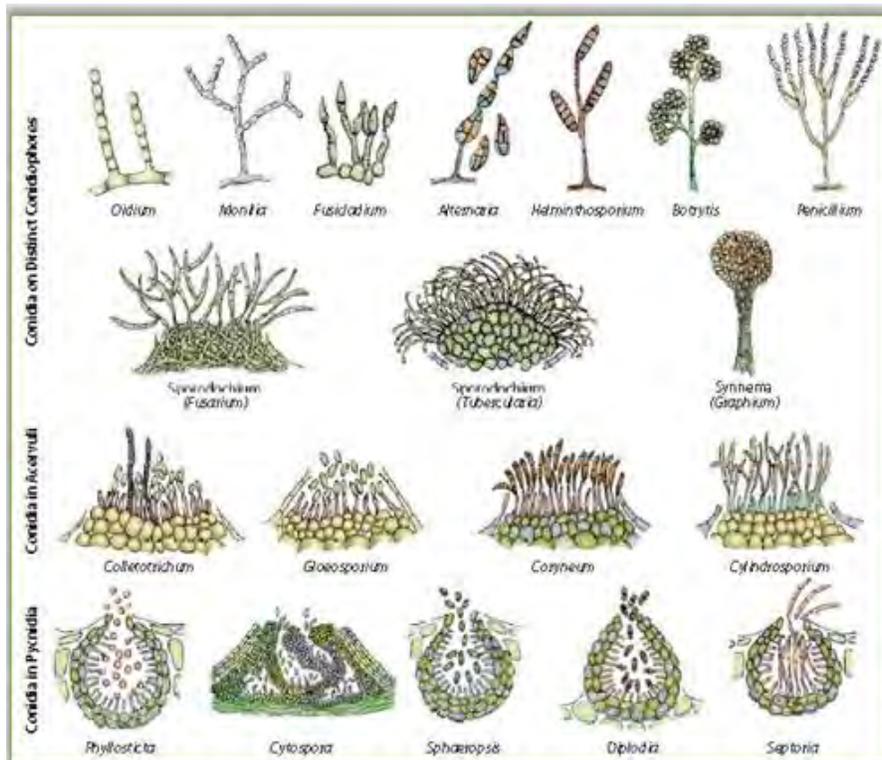


Figura 4. Tipos de conidios, conidióforos y fructificaciones asexuales.
Fuente: Agrios, 2005.

1.9 Características del género *Fusarium*.

Fusarium es un hongo cosmopolita, ampliamente distribuido en diversas regiones y climas, colonizando diferentes plantas o viviendo como saprobio en el suelo. Se han descrito 70 especies de este género. *Fusarium* es un hongo que existe en diversas formas patogénicas, parasitando más de cien especies de plantas (*Gymnospermas* y *Angiospermas*); además de especies con gran especificidad en plantas hospedantes. Parasito de las plantas vasculares, género asociado a diversas enfermedades de importancia económica como marchitez vascular, necrosis en tallos y raíces en gran cantidad de cultivos agrícolas. Al menos 80% de las plantas cultivadas tienen una enfermedad causada por especies del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006; Figueroa *et al.* 2010; Fernández *et al.* 2015).

Las especies del género *Fusarium* tienen conidióforos simples, delgados raramente ramificados, en general producen dos tipos de conidio que se forman a partir de una célula

conidiógena llamada monofiálide, o algunas especies pueden producir polifiálides (Figura 5) Los microconidios son unicelulares, pueden tener uno o dos septos, son de forma ovoide, globosa, piriforme o napiforme; nacidos en falsas cabezas o en cadenas a partir de una célula conidiógena. El macroconidio es típico del género, en algunos casos la morfología del macroconidio es suficiente para la identificación de algunos géneros. El macroconidio tiene una forma de canoa, con una curvatura ventral bien marcada, espora septada con célula apical y célula basal que pueden estar en forma puntiaguda a encorvada, en forma de pie. La mayoría de las especies del género *Fusarium* producen una estructura de resistencia llamada clamidospora, la cual puede permanecer en latencia en el suelo hasta por más de 40 años. Las clamidosporas se caracterizan por tener una pared celular gruesa, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a sobrevivir en ausencia de hospedantes; las clamidosporas pueden estar solitarias, en pares, agrupadas o en cadenas (Holliday, 1980; The University of Adelaide, 2016).

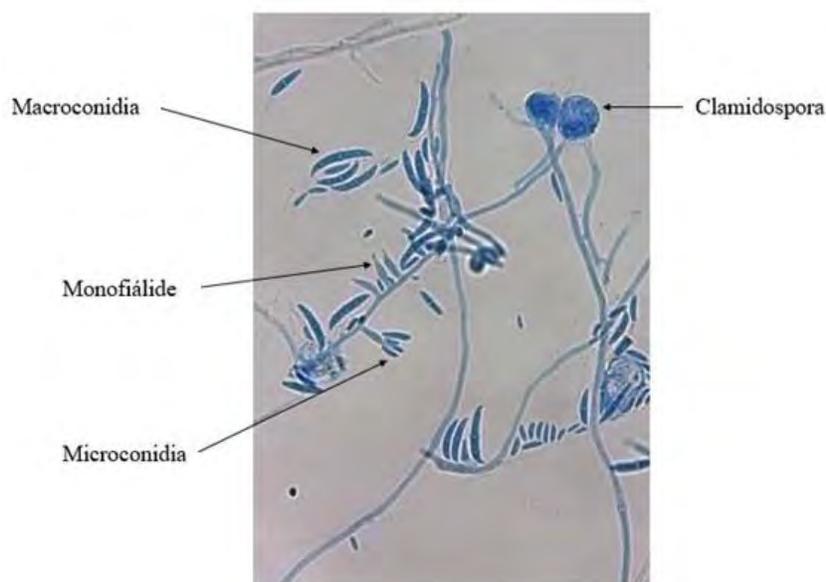


Figura 5. Características morfológicas del género *Fusarium* (40x).

Fuente: Elaboración propia.

El hongo *Fusarium* causa enfermedades a diversas especies de plantas cultivadas (Tabla 3), provocando marchitamientos vasculares, manchas en las hojas, pudrición de raíces y tallos, pudrición de frutos, granos y semillas; siendo la especie *F. oxysporum* la más ampliamente

dispersa de las diversas especies de *Fusarium*, encontrándose alrededor de todo el mundo y en todos los tipos de suelos (Leslie y Summerell, 2006).

Tabla 3. Algunas especies de *Fusarium* que causan daño a diferentes cultivares.

Especie	Hospedero	Distribución geográfica
<i>F. begoniae</i>	Híbridos de begonia	Alemania
<i>F. camptoceras</i>	Plátano y cacao	Regiones tropicales y subtropicales
<i>F. circinatum</i>	Pinos y otras especies de coníferas	Estados Unidos, Sudáfrica, México, España, Japón y Chile
<i>F. globosum</i>	Maíz y trigo	Sudáfrica y Japón
<i>F. konzum</i>	Pastos	Kansas, USA
<i>F. lateritium</i>	Platas leñosas, particularmente arboles	Todo el mundo
<i>F. mangiferae</i>	Mango	Brasil, Egipto, India, Israel, Malasia, Sudáfrica y USA
<i>F. musarum</i>	Plátano	Panamá
<i>F. nisikadoi</i>	Nuez, trigo y bamboo	Japón
<i>F. nygamai</i>	Sorgo, algodón, maíz, pastos y arroz	Regiones áridas y calurosas
<i>F. poae</i>	Semillas y granos, plantas leñosas	Ampliamente distribuido en todas las regiones
<i>F. proliferatum</i>	Maíz, sorgo, mango y espárragos	En todo el mundo
<i>F. sacchari</i>	Caña de azúcar, sorgo, maíz y orquídeas	Asia y México

Fuente: Elaboración propia a partir de Leslie y Summerell, 2006.

1.9.1 *Fusarium oxysporum*.

La especie *Fusarium oxysporum* es una de las de mayor importancia fitopatológica por la gran cantidad de plantas hospedantes, parasitando más de 100 especies de plantas (*Gimnospermas* y *Angiospermas*) y es la especie que mayor daño económico ocasiona entre los patógenos de las plantas cultivadas, provocando principalmente marchitamientos vasculares, pudrición de raíces, seguido de muerte de las plantas afectadas. (Arbeláez, 2000)

Al cultivarlo en PDA produce colonias de rápido crecimiento incubado a 25°C; morfológicamente puede producir micelio aéreo algodonoso, con coloraciones de blanco a rosado, con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar, y también puede tener un crecimiento de tipo pionotal con la formación de escaso o sin presencia de micelio

aéreo. Producción de conidias, fiálides y clamidosporas típicas del género (Arbeláez, 2000; Garcés *et al.* 2001).

Esta especie de hongo es reconocida por producir distintas formas especiales (Tabla 4). Una forma especial es un taxón en el que se clasifican formas de una misma especie, las cuales presentan características morfológicas imperceptibles, pero que son fisiológicamente diferentes por su capacidad específica para parasitar y enfermar a cierta especie de planta hospedera. Garcés *et al.* 2001 reportan que la especie de *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* causante de la marchitez vascular en plantas de marihuana, produce un daño del 100% al ser inoculado en estas plantas, mientras que al ser inoculado en plantas de achiote y tomate produjo un 25% y 12.5% de daño; esto se produce debido a que la f. sp. *erythroxyli* es específica para la planta de marihuana y solo va a comportarse como un fitopatógeno con un alto grado de patogenicidad al estar en contacto con esta especie de planta. Diversas investigaciones se han realizado para utilizar al fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* en forma de micoherbicida como una alternativa para el control de plantaciones ilícitas de marihuana en Colombia, lo cual no se ha aceptado debido al daño que podría causar dicha especie no solo al cultivo si no que podría generar severos daños al medio ambiente y la salud humana (Cahuache, 2001).

Se han reconocido 72 formas especiales de la especie *Fusarium oxysporum*, parasitando a cultivos de gran importancia económica (Arbeláez, 2000; Garcés *et al.* 2001).

Tabla 4. Formas especiales (f. sp.) de *F. oxysporum* patogénicas de diferentes cultivos.

Especie de <i>Fusarium</i> f. sp.	Hospedante
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	Esparrago (<i>Asparagus officinalis</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>betae</i>	Col o repollo (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cannabis</i>	Marihuana (<i>Cannabis sativa</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Cebolla (<i>Allium cepa</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>citri</i>	Cítricos

Continuación...	
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>coffea</i>	Café (<i>Coffea arabica</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Plátano o banana (<i>Musa paradisiaca</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	Ciclamen (<i>Cyclamen spp</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i>	Vid (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>glycines</i>	Soya (<i>Glycine max</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lentis</i>	Lenteja (<i>Lens culinaris</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	Lino (<i>Linum usitatissimum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Melón (<i>Cucumis melo</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>nicotianae</i>	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Sandia (<i>Citrullus lanatus</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Pisi</i>	Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ricini</i>	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>sesami</i>	Ajonjolí (<i>Sesamum indicum</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i>	Tulipán (<i>Tulipa spp</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Algodón (<i>Gossypium herbaceum</i>)

Fuente: Elaboración propia modificado de EOL, 2014.

La selectividad patogénica de cada forma especial de la especie *F. oxysporum* se debe a que solamente la planta hospedante y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales de cada hongo, por lo cual, solamente cada forma especial de este hongo puede crecer y desarrollarse en cada tipo de planta específica (Figura 6) (Arbeláez, 2000).

En el cultivo de tomate se han encontrado dos formas especiales de la especie *F. oxysporum*, las cuales causan importantes daños en el cultivo, y puede llegar a causar una pérdida total de la producción si no se controla o erradica a tiempo la enfermedad. *F. oxysporum* f sp.

lycopersici causa la marchitez del tomate, mientras que la pudrición de la corona y raíz está causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Ramírez y Sainz, 2010).

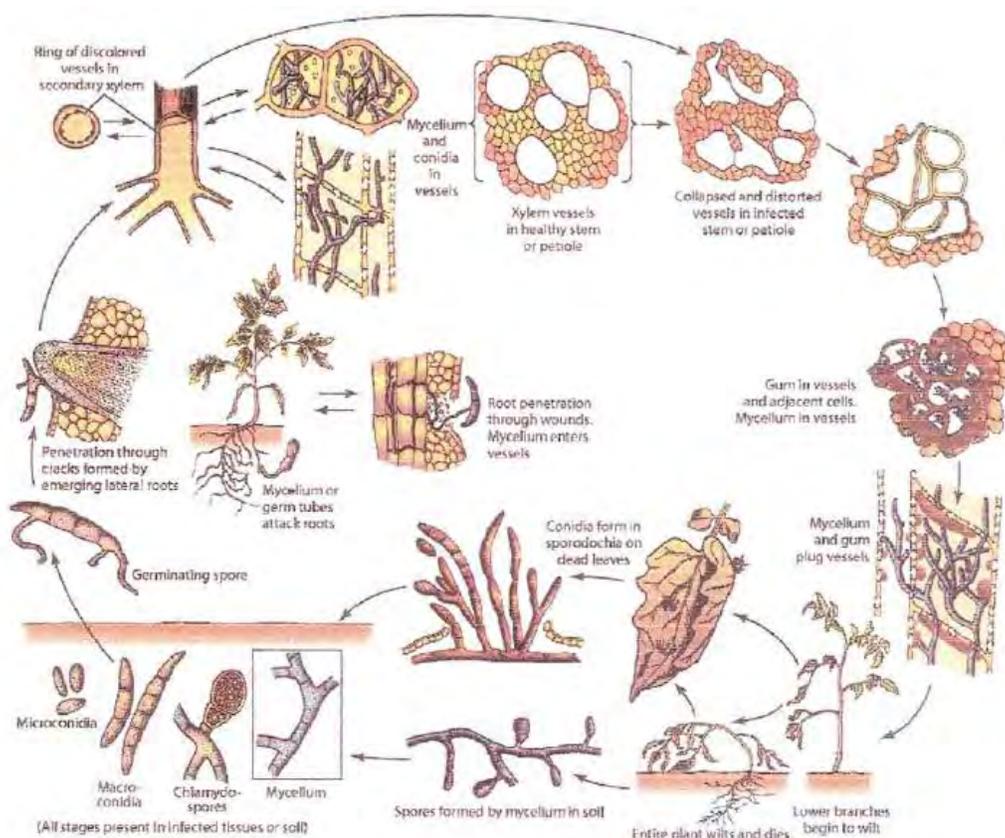


Figura 6. Ciclo de la enfermedad en tomate causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Fuente: Agrios, 2005

Algunas formas especiales de *F. oxysporum* producen razas fisiológicas o patotipos, esto debido a la gran variabilidad genética del hongo; las razas fisiológicas se distinguen entre sí por el grado de patogenicidad en distintas variedades de una misma especie de planta. Para determinar la raza de una forma especial de *F. oxysporum* es necesario realizar pruebas de patogenicidad en diferentes variedades de una misma especie vegetal resistentes y susceptibles a diferentes razas; siendo el grado de virulencia el principal criterio para diferenciar las formas especiales y sus razas fisiológicas del fitopatógeno *F. oxysporum* (Arbeláez, 2000; Garcés *et al.* 2001).

Hasta ahora se han identificado tres razas fisiológicas de *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* que causen daño a diversas variedades de tomate. Es por eso que las compañías semilleras se han dedicado a generar nuevos cultivares de tomate resistentes a las tres diferentes razas (Ramírez y Sainz, 2010; Hernández *et al.* 2014).

1.10 Características del género *Trichoderma*.

El género *Trichoderma* es abundante en la naturaleza; especies de este género se localizan principalmente en material en descomposición que se encuentra en el suelo, también se ha encontrado en restos de madera en descomposición. Este género cuenta con más de 200 especies ampliamente distribuidas en un amplio rango de regiones geográficas en la mayoría de las zonas climáticas (Gams y Bissett, 1998; Druzhinina *et al.* 2006; Hoyos, 2012; Atanasova *et al.* 2013).

El hongo *Trichoderma* ha sido utilizado en todo el mundo por su producción de celulasas, enzimas utilizadas en la industria textil, papelera, alimenticia, farmacéutica, y actualmente en la producción de biocombustibles. En la parte agrícola, algunas especies han sido utilizadas para la bioremediación de suelos, ya que degradan la residualidad de algunos plaguicidas. Este hongo al vivir como saprobio del suelo se encuentra involucrado en diferentes tipos de interacciones biotróficas como la descomposición de materia orgánica, parasitismo y endofitismo, siendo de gran importancia e interés en la agricultura (Hoyos y Bissett, 2012).

El género *Trichoderma* tiene micelio septado con conidióforos hialinos re-ramificados, normalmente con el eje principal más largo que las ramificaciones; con fiálides solas o en grupos de forma langeniforme, ampuliforme o subulada; conidiación acropleurógena naciendo a partir de las fiálides (Figura 7). Conidios (fialosporas) hialinos a verdes, verde-grisáceo o verde-amarillento en masas, unicelulares, de forma ovoide, subglobosos, elipsoidales a oblongo o clavado, de pared conidial lisa o verrugosa. Clamidosporas pueden estar presentes o ausentes, de pared lisa y gruesa, de forma globosa a elipsoidal, solitarias terminales o dispuestas de manera intercalar en las hifas, algunas veces en cadenas o en masas

multicelulares. Olor característico de algunas especies a coco o alcanfor (Gams y Bissett, 1998; Atanasova *et al.* 2013; The University of Adelaide, 2016).



Figura 7. Características morfológicas del género *Trichoderma* (40x).

Fuente: Elaboración propia.

El género *Trichoderma* se ha utilizado y estudiado por su acción biocontroladora y antagonista natural de fitopatógenos y que habitan principalmente en el suelo; destacando hongos fitopatógenos de importancia económica de los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia spp*, *Mycosphaerella spp*, *Pyrenophora tritici-repentis*, entre otros (Infante *et al.* 2009).

1.10.1 Mecanismos de acción de *Trichoderma*.

Se han descrito diversos mecanismos de acción biocontroladora por parte del hongo *Trichoderma* hacia diversos hongos causantes de enfermedades de muchos cultivos agrícolas. (Tabla 5) Los mecanismos de acción pueden ser de acción directa frente al hongo fitopatógeno como la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis; o de acción indirecta como inducción de resistencia en las plantas, así como estimular crecimiento radical (Howell, 2003; Benítez *et al.* 2004; Infante *et al.* 2009; Hoyos y Bissett, 2012; Zavaleta *et al.* 2015).

- Micoparasitismo.

El micoparasitismo es la propiedad de parasitar a los fitopatógenos, extendiendo sus hifas y envolviendo al fitopatógeno; posteriormente produce apresorios⁵, los cuales rompen la pared del hongo parasitado y se produce la destrucción de la pared celular del hongo fitopatógeno, por medio de la producción de enzimas líticas; en *Trichoderma* se han encontrado varias clases de enzimas líticas como las quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales degradan los polímeros de la pared celular del fitopatógeno (Benítez *et al.* 2004; Infante *et al.* 2009; Zavaleta *et al.* 2015).

Las especies de *Trichoderma* crecen quimiotrópicamente hacia el fitopatógeno durante el proceso de micoparasitismo; el cual es un crecimiento directo hacia un estímulo químico; es decir, *Trichoderma* puede detectar a distancia al fitopatógeno y sus hifas crecen en dirección a él; los exudados del fitopatógeno atraen a *Trichoderma*. Algunos aislamientos de este antagonista son específicos a algunos hongos fitopatógenos, reconociendo al fitopatógeno a controlar, esto implicado por moléculas de lectinas⁶ que se enlazan a los carbohidratos de la pared celular del patógeno; una vez que *Trichoderma* ha reconocido al fitopatógeno lo envuelve y se adhiere a las hifas por medio de los apresorios, degradando así la pared celular del fitopatógeno (Hoyos *et al.* 2012; Zavaleta *et al.* 2015).

- Antibiosis.

La antibiosis es la acción directa de producción de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por parte de *Trichoderma* para inhibir el desarrollo o muerte de fitopatógenos que son sensibles a estos. Esto ocurre durante la interacción *Trichoderma*-hongo por las enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso molecular secretados por *Trichoderma*. Los componentes químicos de los antibióticos producidos por *Trichoderma* pueden ser compuestos volátiles o no volátiles, los cuales causan un efecto negativo sobre el

⁵ Apresorio: hinchamiento aplanado que se forma en el tubo de germinación de una espora o en una hifa vegetativa, y que se adhiere a la superficie del hospedante antes de penetrarlo con una hifa infectiva que se origina de dicho hinchamiento; característico de hongos fitoparásitos (Ulloa y Hanlin, 2006).

⁶ Lectinas: Son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular.

crecimiento o metabolismo del fitopatógeno (Benítez *et al.* 2004; Hoyos *et al.* 2012; Zavaleta *et al.* 2015).

- Antibiosis por compuestos no volátiles: Los metabolitos no volátiles tienen efecto a corta distancia, actuando cerca de la hifa del patógeno. Entre los antibióticos no volátiles que producen diferentes especies de *Trichoderma* se encuentra la trichodermina, gliovirin, gliotoxina, viridina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos, trichorzianina y otros metabolitos peptídicos (Benítez *et al.* 2004; Hoyos *et al.* 2012; Zavaleta *et al.* 2015).
- Antibiosis por compuestos volátiles: Los metabolitos volátiles se producen en altas concentraciones en el ambiente del suelo, influenciando a la comunidad microbiana. La toxicidad de estos compuestos volátiles está relacionada con la capacidad de adsorberse en las membranas celulares, formando una capa hidrofóbica sobre la pared celular, que impide la absorción del agua por las células del hongo fitopatógeno. Dennis y Webster, citado por Infante *et al.* (2009) reportaron que aislamientos más activos de *Trichoderma* poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista, mientras que Hoyos y Bissett (2012) reportan que el compuesto 6-Pentil- α -pirona, d-lactona insaturada tiene actividad antifungal y posee un fuerte aroma a coco. La enzima endoquitinasa que actúa como antibiótico inhibe la germinación de conidios y el crecimiento del tubo germinativo de varios hongos (Benítez *et al.* 2004; Hoyos *et al.* 2012; Zavaleta *et al.* 2015).

El mecanismo de acción de antibiosis no debe de ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que puede existir el riesgo de que cepas de fitopatógenos se vuelvan resistentes a los antibióticos de los biocontroladores (Infante *et al.* 2009).

- Competencia.

La competencia por nutrientes, espacio o sitios específicos, es otro de los mecanismos implicados en el biocontrol de hongos fitopatógenos. Infante *et al.* (2009) define al mecanismo de acción de competencia como el comportamiento desigual de dos o más

organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización del sustrato por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de control va a estar influenciado por las características del controlador biológico como su plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por factores ajenos al antagonista como el tipo de suelo, pH, temperatura, humedad.

Especies de *Trichoderma* compiten eficientemente contra otros hongos, ya que su capacidad de movilizar y obtener nutrientes es mayor, debido a sus características como una alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la alta gama de sustratos sobre los que puede crecer y desarrollarse. *Trichoderma* compite principalmente por nutrientes como nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas, entre otros) y microelementos como el fierro; la competencia por carbono es la responsable de la fungistasis (inhibición de germinación de esporas) de algunos hongos del suelo (Howell, 2003; Zavaleta *et al.* 2015).

Hoyos y Bisset (2012) reportan que el micoparásito *Trichoderma* realiza una competencia rizosférica, lo cual se refiere a la capacidad que tienen algunos aislamientos de este género de poder asentarse en el entorno rizosférico y realizar interacciones histológicas propias de endófitos o simbiosis con las plantas; estudios demuestran que este hongo puede establecer interacciones con capas internas de los tejidos radicales, colonizando la epidermis y corteza superficial en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), provocando un engrosamiento de las paredes en los tejidos de la plantas, así como la inducción de una alta producción de glucanasas, quitinasas, celulosas y peroxidasas, induciendo la actividad de defensa de la planta por acción del hongo *Trichoderma*.

- Inducción de desarrollo y defensas a las plantas.

Algunos aislamientos del género *Trichoderma* tienen efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo cual ayuda a reducir efectos de enfermedades. Se han estudiado aislamientos de especies de *Trichoderma* que favorecen el crecimiento longitudinal en raíces de maíz y algunos pastos, haciéndolos más resistentes a las sequías (Hoyos y Bissett, 2012).

En un estudio realizado por Jiménez *et al.* 2011, observaron que al inocular una cepa de *Trichoderma harzianum* sobre semilleros y plántulas de tomate se obtuvo un mayor crecimiento de la parte aérea de la planta así como de la parte radical; Benítez *et al.* 2004 reportó un mayor crecimiento radicular en plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) al ser inoculadas con *Trichoderma harzianum* CECT 2413, así como una disminución de plantas enfermas inoculadas con el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

Algunas especies de hongos han sido reportadas como productoras de auxinas, como es el caso de *Trichoderma*, siendo este un atributo de ciertos aislamientos de hongos; no particularmente de alguna especie, si no de ciertas cepas aisladas del género. En aislamientos de *T. koningii* se ha encontrado la existencia de Koninginina A, Ciclonerodiol y Koninginina B, compuestos asociados a la estimulación de crecimiento de las plantas. Otras especies son capaces de producir moléculas similares a citocininas; otras acidifican el ambiente que las rodea mediante la secreción de ácidos orgánicos que solubilizan fosfatos, micronutrientes y cationes minerales como el hierro, manganeso y magnesio (Howell, 2003; Hoyos y Bissett, 2012; Zavaleta *et al.* 2015).

Tabla 5. Especies de *Trichoderma* mexicanas que se han probado como agentes de control biológico en México.

Especie	Patógeno	Cultivo
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. subglutinans</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>In vitro</i> Plátano (<i>in vitro</i> e invernadero) Alfalfa, algodón, frijol, melón y tomate
	<i>Sclerotium ceviporum</i> <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> <i>F. oxysporum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>R. solani</i> <i>Sclerotinia</i> sp.	Ajo (Invernadero) Clavel (<i>in vitro</i> e invernadero) Garbanzo (<i>in vitro</i> y campo) Lechuga (campo)
<i>Trichoderma virens</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. subglutinans</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. subglutinans</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. subglutinans</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma minutisporum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. subglutinans</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma lignorum</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> <i>F. oxysporum</i> , <i>S. rolfsii</i> , <i>R. solani</i> <i>Sclerotinia</i> sp.	Plátano (<i>in vitro</i> e invernadero) Clavel (<i>in vitro</i> e invernadero) Garbanzo (<i>in vitro</i> y campo) Lechuga (campo)

Continuación...		
	<i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Sphaceloma</i> sp., <i>Helminthosporium</i> sp., <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F.</i> <i>rigidiuscula</i> , <i>Botryodiplodia</i> sp., <i>Diplodia</i> sp., <i>Glomerella</i> sp., <i>Macrophomina</i> sp., <i>Sclerotium</i> sp., <i>P. capsici</i> , <i>Pythium</i> <i>mamillatum</i> , <i>P. ultimum</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Phymatotrichum omnivorum</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma</i> <i>pseudokoningii</i>	<i>P. omnivorum</i>	<i>In vitro</i>
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>P. omnivorum</i> , <i>P. capsici</i>	Chile (<i>in vitro</i> e invernadero)

Fuente: Modificado de Zavaleta *et al.* 2015.

1.11 Biofungicidas comerciales a base del hongo *Trichoderma*.

Los biofungicidas son productos agrícolas compuestos de microorganismos benéficos tales como hongos o bacterias, preparados a partir de elementos minerales y partes vegetales que poseen propiedades para afectar el crecimiento o actuar sobre la erradicación de enfermedades en las plantas. (FAO, 2013)

El hongo *Trichoderma* es uno de los micoparásitos más estudiados en el control biológico de enfermedades debido a sus mecanismos de acción, cualidades que lo hacen atractivo para la producción masiva del hongo y fabricación de formulados comerciales (Tabla 6).

Tabla 6. Productos a base de *Trichoderma* comercializados en México.

Compañía	Producto comercial: antagonista	Patógeno(s)	Cultivo(s)
Agrícola Innovación	Bioben a base de: <i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i>	Amplia variedad de cultivos
Agrobionsa	Trichosin a base de: <i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Colletotrichum</i>	Chile, tomate, berenjena, tomatillo, papa
Agrobiosol de México S.A. de C.V. ABS promotora de México	Bioderma a base de: <i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Phymatotrichum</i> <i>omnivorum</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Spongospora</i>	No indicado
Agroproductos y Servicios Orgánicos de Uruapan, S. de RL	Spectrum bio a base de: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Verticillium</i>	No indicado

Continuación...			
Agroorgánicos Nacionales	Biothork a base de: <i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Phymatotrichum omnivorum</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Spongospora</i>	No indicado
Asesoría Integral Ambiental (AIA)	No indicado: <i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i>	Zarzamora, aguacate, guayaba.
Biokrone S.A. de C.V.	Natucontrol a base de: <i>T. harzianum</i>	<i>Colletotrichum</i> , <i>Botryotinia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Thanatephorus</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Botrytis</i>	Fresa
Biotropic S.A. de C.V.	Biotrol a base de: <i>T. lignorum</i>	No indicado	No indicado
Fagro de México	Fusyvert a base de: <i>Bacillus subtilis</i> , extractos de <i>T. harzianum</i> y otros componentes orgánicos	<i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i>	Tomate, tomate de cascara, espárrago, agave, ornamentales (flores de corte), cereales
	Biorgan-SF a base de: <i>Bacillus subtilis</i> , enzimas y filtrados de <i>T. harzianum</i> y otros componentes orgánicos	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Botrytis</i>	Papa, tomate, sandía, espárrago, ajo, chile, cítricos, melón, pepino, fresa
GUARILAB, Microorganismos Benéficos	JUQ a base de: <i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. fasciculatum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Meloidogyne</i>	Tomate, chile, berenjena, calabaza, brócoli, col, coliflor, sandía, pepino, flores de corte, papa, cebolla, gladiola, aguacate, durazno, manzana, guayaba, zarzamora, frambuesa
ISLAVEL S.A. de C.V.	TRICOVEL a base de: <i>T. viride</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Phythium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Armillaria</i> , <i>Rosellinia</i>	No indicado
Plant Health Care de México S.A. de C.V.	PHC-T22 a base de: <i>T. harzianum</i>	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cylindrocladium</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Tabaco, cacahuete, maíz, sorgo, frijol, trigo, cebada, papa, chile, tomate, fresa.
	PHC RootMate a base de: <i>T. virens</i>	<i>Phytophthora</i>	No indicado
Sehusa S.A. de C.V.	Biocop a base de: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>T. harzianum</i>	No indicado	No indicado

Fuente: Modificado de Zavaleta *et al.* 2015.

Capítulo 2. Metodología.

2.1 Descripción de la zona de estudio.

La zona de estudio corresponde al municipio de Coatepec Harinas, Estado de México, ubicado a 35 km al sur de la ciudad de Toluca, asentado en las faldas del Nevado de Toluca, con una extensión territorial de 282.36 km², siendo el 1.2% del total de la superficie del estado de México; con una altitud que varía por su conformación territorial que va de los 1,900 a 3,000 msnm (INAFED, 2010).

El clima predominante del municipio es templado subhúmedo con una temperatura media anual entre 12°C y 18°C, temperatura del mes más frío entre -3°C y 18°C siendo los meses más fríos de Noviembre a Febrero, y la temperatura de los meses más calientes por debajo de los 22°C, siendo Mayo y Junio los meses más calurosos; con una precipitación media anual de 1162 mm con una estación húmeda en verano, la precipitación del mes más bajo es menor de 40 mm y porcentaje de lluvia invernal del 5 al 10.2% del total anual (Anexo 1) (SMN, 2010).

La temporada de lluvias inicia a finales del mes de Abril, pero suele interrumpirse durante el mes de Mayo, continua durante los meses de Junio y Julio y se agudiza en los meses de Agosto y Septiembre (SMN, 2010).

El periodo de heladas se presenta entre los meses de Octubre y Noviembre y prolongándose hasta el mes de Enero y raras veces hasta el mes de Febrero (SMN, 2010).

Los vientos soplan de suroeste a noreste y se presentan generalmente durante los meses de Febrero y Marzo; en Noviembre y Diciembre generalmente son más intensos que los primeros meses del año, las lluvias suelen llegar del sureste ingresando al municipio por el sistema montañoso del Nixcongo, conocido localmente como las Malinche (SMN, 2010; INEGI, 2009; SEDESOL, 2013).

El municipio se encuentra dentro de la región hidrológica Balsas. El abasto de recurso hídrico es a través de las corrientes de agua perennes como lo son el río Nava, Jabalí, Los Tizantes, Agua Blanca, El Molino, Chiltepec. Las flores, De las Flores y Almoloya, La Tortuga, entre otros; y algunos arroyos intermitentes (INAFED, 2010; INEGI, 2009).

La población municipal para el año 2010 es de 36,174 habitantes, de la cual el 66.24% de la población se encuentra en situación de pobreza. El mayor grueso de la población es rural; la población ocupada se encuentra dentro del sector de actividad económica primario (Agricultura, ganadería, aprovechamiento forestal, pesca y caza) con 6,825 habitantes económicamente activos. Estos dedicándose principalmente a la agricultura (CONEVAL, 2010; SNIM, 2010; SEDESOL, 2013; INEGI, 2009).

El principal uso de suelo de la región es de Bosque con el 51.2% del total del territorio seguido por el uso de suelo agrícola (45.53%), pastizal (2.35%) y zona urbana (0.92%). Los tipos de suelo de la región son los Andosol, Luvisol, Cambisol, Vertisol, Leptosol y Phaeozem; siendo la agricultura la principal actividad económica del municipio (INEGI, 2009; IGCEM, 2013).

El municipio de Coatepec Harinas ocupa el quinto lugar por superficie sembrada de tomate en el estado de México (Tabla 7). En primer lugar se localiza el municipio de Tepetlixpa con 320 Ha, seguido de Ozumba con 221 Ha, Atlautla con 110 Ha, Jocotitlan con 84 Ha y Coatepec Harinas con 83 hectáreas sembradas, con un rendimiento de 136.93 toneladas por hectárea, aportando el 11.8% de la producción estatal; el cien por ciento de la producción de tomate en el municipio se realiza bajo cubiertas plásticas. El tomate se sitúa dentro de uno de los cultivos con mayor valor de la producción (SIAP, 2016).

Tabla 7. Principales municipios productores de tomate por superficie sembrada en el estado de México.

		Ciclo: Cíclicos y Perennes 2014					
		Modalidad: Riego + Temporal					
		Tomate rojo (Jitomate)					
Municipio	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de pesos)	
1 Tepetlixpa	320	320	8,608.00	26.9	5,306.57	45,678.95	
2 Ozumba	221	221	5,933.85	26.85	5,206.78	30,896.25	
3 Atlautla	110	110	3,036.00	27.6	5,213.64	15,828.61	
4 Jocotitlán	84	84	33,432.00	398	6,020.42	201,274.68	
5 Coatepec Harinas	83	83	11,365.00	136.93	7,341.67	83,438.09	
6 Zacualpan	82	82	3,158.00	38.51	7,712.06	24,354.70	
7 Luvianos	73	73	2,237.00	30.64	6,456.84	14,443.94	
8 Tonatico	52	52	2,915.00	56.06	7,057.81	20,573.52	
9 Almoloya de Alquisiras	51	51	1,067.00	20.92	6,255.11	6,674.20	
10 Ixtapan de La Sal	34	34	1,550.00	45.59	5,042.29	7,815.55	
11 Otros	216.67	204.67	22857.59	8198.25	412284.7	172256.4	
Total Nacional	1,326.67	1,314.67	96,159.44	73.14	6,481.27	623,234.89	

Fuente: SIAP, 2016.

En el municipio se cultivan granos como maíz y avena, verduras como haba fresca, elote, chícharo, tomate y algunos frutales como lo son el durazno y guayaba (Tabla 8). Además, el municipio tiene importancia en la floricultura, ya que Coatepec Harinas se localiza dentro del corredor florícola del estado de México. Particularmente, en la zona se puede encontrar cultivos de gladiola, liliium, crisantemo, clavel, entre otros (SIAP, 2016).

Tabla 8. Principales cultivos por superficie sembrada en el municipio de Coatepec Harinas.

Ciclo: Cíclicos y Perennes 2014							
Municipio Coatepec Harinas							
Modalidad: Riego + Temporal							
Cultivo	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de pesos)	
1 Maíz grano	3,769.00	3,769.00	20,446.25	5.42	4,086.48	83,553.12	
2 Avena forrajera	2,759.00	2,759.00	46,262.10	16.77	464.87	21,505.99	
3 Aguacate	2,046.00	1,931.00	26,213.34	13.58	9,838.44	257,898.42	
4 Durazno	1,598.5	1,598.5	23,977.50	15	6,265.41	150,228.87	
5 Avena grano	887	887	842.65	0.95	3,433.3	2,893.07	
6 Aba verde	819	819	4,302.00	5.25	5,644.03	24,280.63	
7 Chicharo	694	694	3,430.50	4.94	4,848.09	16,631.36	
8 Elote	348	348	4,234.50	12.17	2,272.62	9,623.43	
9 Guayaba	345	345	4,260.75	12.35	6,109.61	26,031.52	
10 Crisantemo (gruesa)	243	243	852,540.00	3,508.40	105.58	90,014.72	
11 Clavel (gruesa)	207	207	1,611,702.00	7,786.00	60.86	98,088.18	
12 Gladiola (gruesa)	140	140	161,310.00	1,152.21	129.66	20,915.21	
13 Maíz forrajero	117	117	3,776.00	32.27	489.08	1,846.77	
14 Tomate verde	110	110	1,371.00	12.46	6,443.50	8,834.03	
15 Tomate rojo (Jitomate)	83	83	11,365.00	136.93	7,341.67	83,438.09	
16 Ebo (veza)	79	79	1,166.80	14.77	460.61	537.44	
17 Frijol	69	69	77.1	1.12	14,787.5	1,140.12	
18 Papa	53	53	1,042.00	19.66	6,578.53	6,854.82	
19 Otros	302.5	297.5				147226.18	
Total Nacional	14,669.00	14,549.00				1,051,541.97	

Fuente: SIAP, 2016.

2.2 Colecta de Muestras.

La colecta de muestras de suelo se realizó en cuatro diferentes predios de tres diferentes comunidades del municipio de Coatepec Harinas, Estado de México. La colecta fue dirigida a suelos de invernaderos cultivados con tomate donde existiera presencia de plantas con síntomas de marchitez donde el agente causal pudiera ser el fitopatógeno *Fusarium*⁷, y que

⁷ Primer postulado de Koch: "El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen".

fueran suelos donde no se han aplicado productos hechos a base de *Trichoderma*. Las muestras de suelo se tomaron con una barrena para muestreos de suelos a una profundidad de 10 a 15 centímetros; antes de tomar cada muestra la barrena se desinfectó con hipoclorito y posteriormente se enjuagó con agua destilada (Figura 8). Cada muestra de suelo se colocó en una bolsa de plástico, cada una etiquetada correspondientemente con los datos de colecta. (Anexo 2)



Figura 8. Colecta de muestras de suelo.

La primera muestra se colectó en la comunidad de Ixtlahuaca de Villada en un invernadero ubicado a 2191 msnm en las coordenadas geográficas N18°55.403' WO 99°48.501' (Figura 9), en el invernadero se podía observar presencia de plantas con síntomas de marchitez; pero el mayor daño que se podía observar era moho gris y mancha fantasma.⁸



Figura 9. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad Ixtlahuaca de Villada.
Google Earth, 2015.

⁸ El moho gris y la mancha fantasma son causadas por *Botrytis cinerea*, esta enfermedad ataca a los tallos, hojas y frutos. Los daños empiezan en las hojas más viejas y en las heridas producidas por la poda; en las hojas se observan manchas oscuras que se recubren de un crecimiento fungoso de color grisáceo, el hongo invade el tallo rodeándolo y matando la planta (Rámirez y Sáinz, 2010).

La segunda muestra se colectó en la comunidad de Chiltepec en un invernadero ubicado a 2347 msnm en las coordenadas geográficas N18°55.070' WO99°48.890' (Figura 10), en este invernadero se podía apreciar mayor número de plantas con severos síntomas de marchitamientos.



Figura 10. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad de Chiltepec.
Google Earth, 2015.

La tercera muestra se colectó en la comunidad de Chiltepec en un invernadero ubicado a 2372 msnm en las coordenadas geográficas N18°54.911' WO99°49.983' (Figura 11), en dicho invernadero se podía observar presencia de algunas plantas con síntomas de marchitamiento, amarillamiento de hojas y síntomas de moho gris.



Figura 11. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad de Chiltepec.
Google Earth, 2015.

La cuarta y última muestra fue colectada en la comunidad de Acuitlapilco en un invernadero ubicado a 2226 msnm en las coordenadas geográficas N18°54.930' WO99°46.982' (Figura 12), en este invernadero se podía apreciar síntomas de amarillamiento y manchas cafés en hojas causado por el Tospovirus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), así como algunas plantas con síntomas de marchitamiento y moho gris.



Figura 12. Ubicación satelital de invernadero en la comunidad de Acuitlapilco.
Google Earth, 2015.

Las muestras de suelo posteriormente se extendieron y secaron en charolas de plástico lavadas y desinfectadas con hipoclorito al 10%; los recipientes se colocaron dentro del laboratorio de Fitopatología en la FES-Cuautitlán a temperatura ambiente, las charolas se cubrieron con pliegos de papel filtro para evitar posible contaminación del suelo.

2.3 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo son sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio utilizados para el crecimiento y posterior observación de los microorganismos, como lo son los hongos y bacterias (Fox, 1993; Casado *et al.* 2012).

A lo largo del experimento se utilizaron los siguientes medios de cultivo; a todos los medios se les aplicó 2 mililitros por litro del antibiótico cloranfenicol con una concentración de 200 microgramos por mililitro, esto para evitar el crecimiento de bacterias en el medio.

- PDA (papa-dextrosa-agar)
- V8A (jugo ocho verduras-agar)
- Medio Komada's
- CLA (hojas de clavel-agar)
- SDA (sabouraud- dextrosa-agar)

Los materiales para la preparación de los medios se pueden ver en el anexo 3.

2.4 Aislamiento.

Para poder conocer los microorganismos que habitan en los suelos estudiados, es necesario utilizar la técnica de dilución en serie para poder así aislarlos directamente del suelo (Echandi, 1971; Fox, 1993; Cuervo *et al.* 2012).

2.4.1 Dilución en serie.

La técnica de dilución en serie permite conocer la diversidad de microorganismos que se encuentran presentes en el suelo (Figura 13); esta técnica permite observar las diferentes colonias de microorganismos que crecen en la placa de medio de cultivo, así como conocer las poblaciones de ciertos patógenos o saprobios que se encuentran viviendo en el suelo y que estos últimos pueden ser antagonistas de especies de fitopatógenos (Echandi, 1971); Fox, 1993; Agrios, 2005; Cuervo *et al.* 2012).

Se realizó una dilución en serie para cada una de las muestras de suelo. Las diluciones en serie (1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6}) se sembraron en medio de cultivo PDA, y posteriormente las cajas se incubaron a 26°C, durante 7 días.

A partir de las diluciones en serie realizadas, se obtuvo el crecimiento de varias colonias sobre el medio de cultivo. Posteriormente se separaron las colonias con características culturales semejantes a los hongos *Trichoderma* y *Fusarium*, así como otras colonias de hongos con mayor crecimiento. Se realizaron preparaciones temporales con cinta pegante de cada una de las colonias y mediante la observación microscópica se identificaron estructuras

típicas de *Trichoderma* y *Fusarium*, asegurando con esto que la colonia correspondiera a los hongos objeto de estudio.



Figura 13. Técnica de aislamiento dilución en serie.

2.5 Cepa pura.

La técnica de cepa pura permite separar cada una de las cepas crecidas en la dilución en serie obteniendo cultivos libres de contaminantes y viables para aplicar las técnicas de identificación y preservación del hongo para futuras referencias (Echandi, 1971; Cuervo *et al.* 2012).

Utilizando esta técnica se re-aislaron las colonias de hongos con mayor representación crecidas en la dilución en serie, así como las colonias con características culturales parecidas a la de los hongos *Trichoderma* y *Fusarium*.

2.6 Cultivo monospórico.

La obtención de cultivos monospóricos permite obtener cepas genéticamente homogéneas (Figura 14). Los cultivos monospóricos permiten asegurar que el aislado está libre de cualquier contaminación (Cañedo y Ames, 2004; Ayala *et al.* 2012).

Se realizaron los cultivos monospóricos para observar la diferencia de crecimiento en cuanto a las características culturales de las cepas a diferencia de los cultivos multiespóricos; así como para generar la cepa monospórica de los hongos para su conservación y anexo al cepario del laboratorio de Fitopatología.

La técnica ocupada para realizar los cultivos monospóricos fue por medio de dilución en serie. La técnica consiste en raspar un cuadro de 0.5x0.5 cm de una placa de agar inoculada con el medio. Posteriormente se colocó el raspado en un tubo de ensaye con agua destilada estéril y se realizó la dilución de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} ; sembrando un mililitro de la última dilución en una placa de medio (PDA) previamente rayado en cuadros de tamaño de 1x1 cm aproximadamente. A las 24 horas de crecimiento se observó al microscopio (4x) hasta localizar una espора que estuviera germinando, y al localizarla, el pedazo es transferido a una nueva caja de Petri con medio de cultivo (PDA) y es incubado para su posterior crecimiento (Ayala *et al.* 2012).

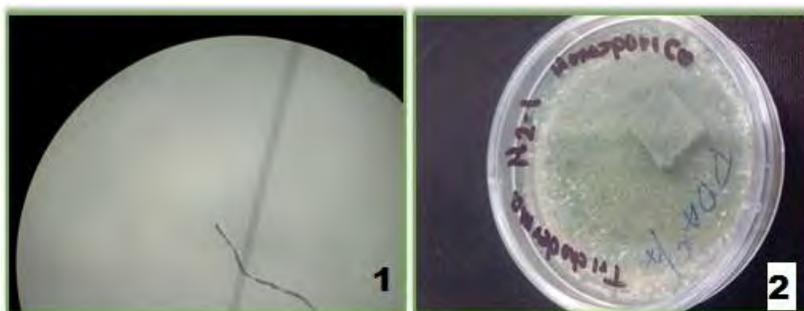


Figura 14. Cultivo monospórico de *Trichoderma*.

1. Germinación de espора en medio PDA a las 24 horas. 2. Cultivo monospórico.

2.7 Conservación de cepas.

2.7.1 Papel filtro estéril.

La técnica de conservación en papel filtro estéril consiste en inocular tiras pequeñas de papel filtro previamente esterilizadas, mediante el crecimiento de la cepa sobre la tira de papel filtro, la cual nos permite poder conservar la cepa en poco espacio de almacenamiento y sin riesgo de contaminantes (Figura 15,2) (Cuervo *et al.*, 2012).

2.7.2 Deseccación en sílica gel.

La conservación de cepas por desecación en perlas de sílica gel, es una técnica utilizada para conservar cepas a largo plazo, se han estudiado casos de conservación hasta por más de diez

años; esta técnica es utilizada para hongos levaduriformes y filamentosos (Figura 15,1) (Berlanga y Hernández, 2003).

Las esporas y las hifas de los hongos tienen la propiedad de sobrevivir a periodos de deshidratación, con lo cual mantienen una mínima actividad metabólica, y cuando estas esporas encuentran sus condiciones de humedad y temperatura óptimas, los hongos restablecen su crecimiento y desarrollo. Esta técnica mantiene la viabilidad y pureza de las cepas, al igual que las características morfológicas, genéticas y de virulencia (Berlanga y Hernández 2003; Montesinos *et al.* 2015).

Básicamente la técnica cumple los criterios anteriores; las perlas de sílice desecan las células de los hongos y estas pueden almacenarse a bajas temperaturas, y al reactivar la cepa en un medio de cultivo y al darle las condiciones de temperatura y humedad adecuadas, esta tiene un desarrollo normal.

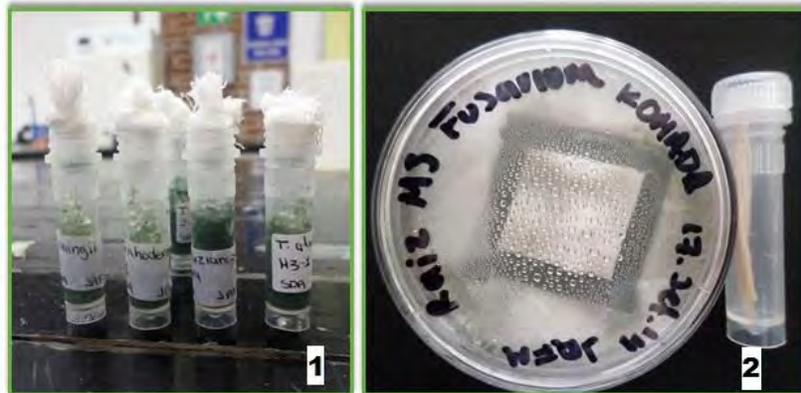


Figura 15. Conservación de cepas.

1. Conservación en sílica gel. 2. Conservación en tiras de papel filtro estéril.

2.8 Identificación.

Para cumplir el segundo postulado de Koch⁹ es necesario realizar la identificación de los patógenos y así conocer el agente causal de la enfermedad. Para realizar la identificación de

⁹ Segundo postulado de Koch: “El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parasito no obligado) o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parasito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca” (Agrios, 2005).

especie de los hongos aislados se realizó la caracterización cultural de crecimiento para conocer las características macroscópicas de los hongos de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*, al igual que microcultivos¹⁰ de 24, 48, 72, 96 y 120 horas (Cuervo *et al.* 2012).

2.8.1 Características macroscópicas.

La caracterización macroscópica se realizó sembrando un trozo de agar con inóculo de cada hongo, cada uno en una caja de Petri estéril de plástico de 9mm con medio de cultivo PDA (Figura 16). Para la caracterización cultural los caracteres cualitativos evaluados fueron: color de la colonia, textura de la colonia, pigmentación del medio, topografía de la colonia y aroma; y cuantitativamente se midió el crecimiento lineal del diámetro de la colonia, cada observación y medición fueron hechas a las 24, 48, 72, 96, 168 y 216 horas posteriores de la siembra (Leslie y Summerell, 2006).

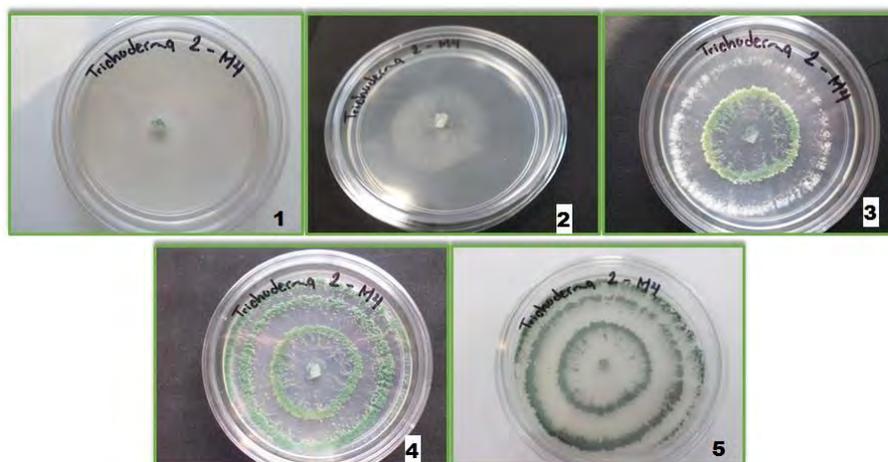


Figura 16. Caracterización macroscópica de *Trichoderma*.
1. 24 horas. 2. 48 horas. 3. 96 horas. 4. 168 horas. 5. 216 horas.

¹⁰ El microcultivo es el procedimiento idóneo para la identificación de estructuras fúngicas, esta técnica permite realizar un seguimiento del ciclo de vida del hongo desde la germinación de la spora, formación de tubo germinativo, micelio, formación de estructuras reproductivas sexuales y asexuales, hasta la esporulación.

2.8.2 Microcultivo.

La técnica de microcultivo permite observar las características microscópicas de los hongos y reconocer sus estructuras (Figura 17), se realizaron las mediciones de sus estructuras de reproducción como son las conidias, fiálides, conidióforos, célula basal del conidióforo, clamidosporas y ancho de micelio para el caso de las cepas del género *Trichoderma*, y macroconidias, microconidias, monofiálides, clamidosporas y ancho de micelio para las cepas del género *Fusarium*; con la ayuda de un microscopio con cámara integrada se fotografiaron las estructuras de reproducción de los hongos a partir de los microcultivos realizados; las fotos se procesaron y se realizó la medición de estructuras utilizando el software LAS EZ (Cuervo *et al.* 2012).

Esta técnica permite obtener preparaciones permanentes en las cuales podemos además de medir las estructuras ya antes mencionadas, observar la forma de desarrollo de las especies para su identificación como el tipo de ramificación del conidióforo y fiálides para el caso de *Trichoderma*, o el tipo de esporulación en cadenas o falsas cabezas para el caso de *Fusarium*.

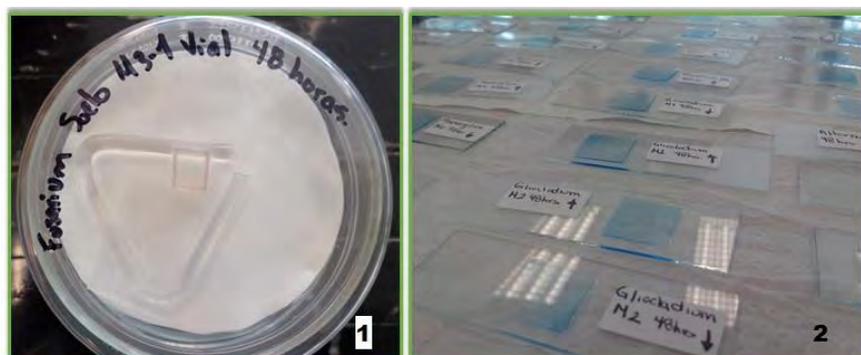


Figura 17. Técnica de microcultivo.

1. Dispositivo para microcultivo. 2. Preparaciones permanentes.

Para la identificación morfológica de los hongos se utilizaron claves dicotómicas; para el caso de las especies del género *Trichoderma* se usaron las claves propuestas por Watannabe (2010) y una más especializada propuesta por Kubicek y Harman (1998), en la cual describen 33 especies de *Trichoderma* divididas en 4 secciones, donde agrupan a especies con características morfológicas específicas que facilitan la identificación del hongo. Al igual

para la identificación de las especies del género *Trichoderma* se utilizó la clave interactiva en línea “*Trichoderma Home*” propuesta por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), disponible en la página de internet:

<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

Nelson *et al.* (1983) crearon una clave para la identificación morfológica de especies de *Fusarium*; en esta clave reúnen principalmente las características macroscópicas culturales de 46 especies de *Fusarium*, dividiéndolas en cinco secciones agrupando las especies con características culturales similares en cada sección, pudiendo así identificar la sección a partir del crecimiento de las colonias en medio de cultivo PDA, tomando en cuenta características de color de las colonias, textura, apariencia del micelio, y posteriormente dentro de cada sección se identifica la especie de *Fusarium* considerando las características microscópicas como la forma de las macroconidias y microconidias, la forma de las monofálides y la manera de esporulación; también para complementar la identificación, se utilizaron las descripciones propuestas por Leslie y Summerell (2006) en su libro *The Fusarium Laboratory Manual*.

2.9 Prueba de patogenicidad.

Agrios (2005) define la patogenicidad como “la alteración que ocasiona un parasito sobre una o varias de las funciones esenciales de la planta, donde con frecuencia el parasitismo tiene una importante (aunque no esencial) función”. Es decir, la patogenicidad es la capacidad que tiene el fitopatógeno en este caso el hongo *Fusarium* en dañar a la planta, colonizando los conductos vasculares, produciendo una pudrición y posterior estrangulamiento del cuello de la planta y causar la marchitez de la misma hasta producirle la muerte.

Una prueba de patogenicidad consiste en inocular varias plantas sanas con los organismos aislados de material enfermo proveniente del campo, con el objeto de ratificarlos o descartarlos como agentes causales de la enfermedad, al igual que permite reconocer el grado de virulencia del fitopatógeno (Ames, 1997) (Apodaca *et al.* 2002).

Para conocer el grado de virulencia de las cuatro especies de *Fusarium* aisladas del suelo se realizó una prueba de patogenicidad y así conocer el grado de daño que provocan a la planta, y poder seleccionar la cepa con mayor agresividad para posteriormente realizar pruebas *in vitro* en confrontación (pruebas duales) con las cepas de *Trichoderma*.

La prueba de patogenicidad consistió en inocular cada una de las cuatro cepas del hongo *Fusarium*; *F. oxysporum*, *F. solani* M3, *F. solani* M3-1 y *F. lateritium* en plantas sanas de tomate cv Rio Grande (Figura 18); dicha variedad es altamente susceptible al ataque de *Fusarium*. Se inocularon un total de 20 plantas por cada cepa y se tuvo un testigo el cual fue tratado solo con agua destilada estéril, obteniendo un total de 100 plantas.

El inóculo fue producido en medio de cultivo V8 Agar con un tiempo de desarrollo de 10 días. La suspensión se realizó haciendo el raspado de las placas de agar inoculadas agregando 3 ml de solución fisiológica (NaCl); posteriormente el raspado se fue agregando a tubos falcón esterilizados aforando con solución fisiológica hasta llegar a 6 ml. Los tubos falcón se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm; con la ayuda de una micropipeta se fue retirando el sobrenadante hasta llegar a la parte donde se encontraba la mayor concentración de esporas y así obtener una solución madre altamente concentrada.

La inoculación de las cepas de *Fusarium* se hizo en plántulas con 30 días de desarrollo, a través de una suspensión de inóculo de cada una de las cepas con una concentración de 5×10^5 conidios/ml; la inoculación fue por el método de inmersión de raíces a las cuales previamente se les hizo heridas cortando algunas raíces secundarias con la ayuda de tijeras esterilizadas. Las plantas se trasplantaron en macetas con una mezcla de sustrato de tierra, agrolita y peat moss a una concentración de 2:1:1 el cual se esterilizó dos veces en autoclave durante 20 minutos a 121°C, y posteriormente las macetas fueron colocadas en un mesón dentro del invernadero 2 de vidrio a una temperatura de 27°C±1 ubicado en el área de Ingeniería Agrícola de la FESC-C4 (Ascencio *et al.* 2008; Castellanos *et al.* 2011).

Al realizar la prueba de patogenicidad se cumple el tercer y cuarto postulado de Koch.¹¹



Figura 18. Prueba de patogenicidad de los fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani* M3, *F. solani* M3-1 y *F. lateritium*.

1. Inóculo de cada una de las cepas de *Fusarium*. 2. Inmersión de plántulas en inóculo. 3. Plántulas inoculadas con las cepas de *Fusarium*.

2.10 Pruebas duales.

Para conocer la capacidad de antagonismo de un hiperparásito, es necesario realizar pruebas duales o también llamadas pruebas de antagonismo, las cuales son pruebas *in vitro* que permiten evaluar la competencia por nutrientes y espacio comparando la velocidad de crecimiento tanto del patógeno como del antagonista mediante el radio de crecimiento antagonista (RCA) y el radio de crecimiento del patógeno (RCP) (Bell *et al.* 1982; Pérez, 2009).

Al comparar los radios de crecimiento se puede apreciar la capacidad de antagonismo que tiene el hiperparásito sobre el patógeno; es decir, el nivel de control que tiene el antagonista para parasitar rápidamente al patógeno y cómo se podría comportar este en un control *in vivo* en campo (Pérez, 2009).

Conjuntamente con lo anterior se debe de medir el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004).

¹¹ Tercer postulado de Koch: “El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas”. Cuarto postulado de Koch: “El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo postulado.” (Agrios, 2005)

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde:

PICR: porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

R1: radio del antagonista testigo.

R2: radio del antagonista en enfrentamiento con el patógeno.

Para realizar las pruebas de antagonismo es necesario sembrar 5 cajas de Petri con un trozo circular de una capa delgada de medio solidificado ya inoculado (*slides*) tanto del antagonista como del patógeno, distribuidos de la siguiente manera (Tabla 9):

Tabla 9. Distribución de unidades para una prueba dual.

Tratamiento	Número de cajas de Petri
Patógeno	1
Antagonista	1
Cultivo dual	3
Total unidades	5

Para realizar las pruebas duales o de antagonismo se colocó en un extremo de una caja de Petri con medio de cultivo PDA, un *slide* de 7 mm de diámetro de agar inoculado con el fitopatógeno *Fusarium* y en el otro extremo otro *slide* de agar inoculado con el antagonista *Trichoderma*; en tres repeticiones; al igual se sembró una caja de Petri con un *slide* inoculado del fitopatógeno *Fusarium* y una caja de Petri inoculada con un *slide* inoculado con el antagonista *Trichoderma*, los cuales son los testigos, para poder medir el PICR (Figura 19). Las cajas se incubaron a 26±1°C, durante 10 días de incubación tomando medidas de crecimiento radial cada 24 horas (Pérez, 2009; Hernández, 2011).

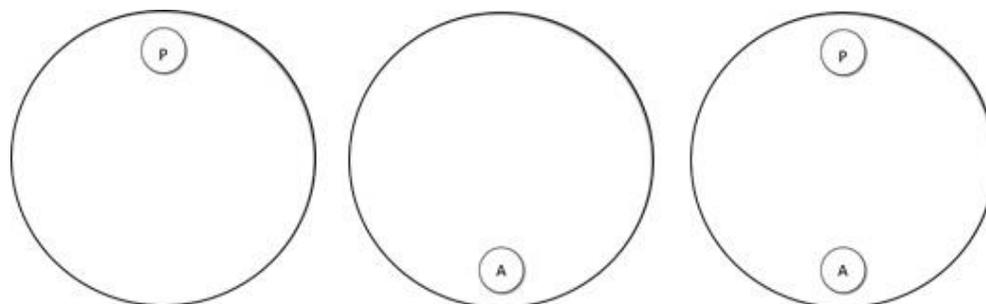


Figura 19. Distribución de unidades para una prueba dual.

A) antagonista *Trichoderma sp.*, P) fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

De la misma manera se evaluó de manera cualitativa, comparando las cajas con base a las clases propuestas por la escala establecida por Bell *et al.* en 1982 (Tabla 10), esta escala se mide con base al grado de crecimiento del hongo antagonista sobre el hongo fitopatógeno.

Tabla 10. Escala de clases Bell *et al.* 1982.

Clase 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Clase 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Con los datos de crecimiento de las cepas en enfrentamiento, se graficó el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* y los datos se analizaron por análisis de regresión, para obtener así la velocidad media y máxima de crecimiento de cada cepa de *Trichoderma*.

2.10.1 Micro prueba dual.

Una micro prueba dual consiste en realizar una prueba dual a nivel de microcultivo, es decir, colocar al antagonista *T. harzianum* y al fitopatógeno *F. oxysporum* en enfrentamiento en un cuadro de 2 cm² de medio de cultivo PDA, colocado en un portaobjetos y posteriormente colocar encima un cubreobjetos; se colocó el portaobjetos en un dispositivo para microcultivo y se incubó a 26±1°C (Figura 20), haciendo observaciones con el microscopio cada 12 horas (Quiroz *et al.* 2008).

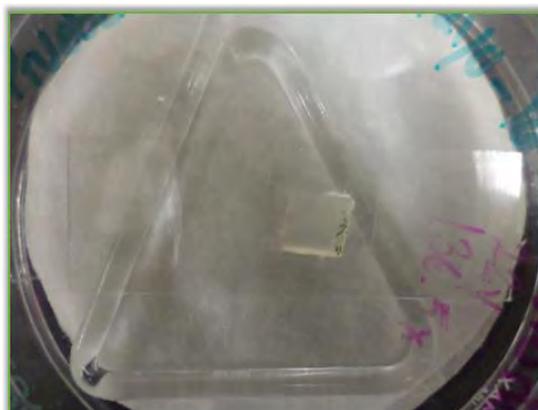


Figura 20. Micro prueba dual (izquierda: inóculo de *F. oxysporum*, derecha: inóculo de *T. harzianum*).

2.11 Producción del prototipo de biofungicida.

El prototipo de biofungicida tendrá una concentración de 2×10^7 conidios viables por gramo, en presentación sólida en polvo humectable, pudiendo aplicarse a través del riego, en sistema de riego por goteo (*in drench*) o por aspersión; dicha concentración y formulado lo ofrece el producto MYCOBAC, de la casa productora de agroinsumos Buckman Laboratories (PLM, 2012).

2.11.1 Aumento de inóculo y preparación de sustrato.

Para realizar el aumento de inóculo, se inocularon 5 cajas de Petri con medio SDA (sabouraud-dextrosa-agar), sembrando en cada caja de Petri un *slide* previamente inoculado con *T. harzianum* sobre la placa de medio (Figura 21). El medio de cultivo SDA permite un mayor crecimiento y esporulación del género *Trichoderma* (Perveen y Bokhari, 2012).

Se han utilizado diferentes sustratos para la producción de inóculo de *Trichoderma* en medio sólido, como son granos de avena, sorgo, trigo centeno, arroz, maíz. (Centro de educación y tecnología, 2004; Sivila y Álvarez, 2013). Para la producción de inóculo se utilizó grano de arroz; para la preparación del sustrato se utilizaron cinco bolsas de polipapel (30x25 cm); se depositaron 400 gramos de arroz por cada bolsa, el arroz se expandió a lo largo y ancho de

la bolsa, posteriormente se agregaron 100 ml de agua procurando que todo el arroz quede humedecido; la bolsa se engrapa para evitar que el arroz se salga. Las bolsas con el sustrato se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

2.11.2 Inoculación del sustrato.

Una vez enfriado el sustrato, se inoculó aplicando una caja de Petri previamente inoculada con 10 días de crecimiento de *T. harzianum* (Figura 21). Para realizar la inoculación se realizó el raspado de la caja de Petri con la ayuda de una asa bacteriológica y adicionando 5 ml de agua destilada estéril. Una vez realizado el raspado se colocó en un matraz y se aforó con agua destilada estéril a 40 ml; ya teniendo los 40 ml se le adicionó tres gotas de *tween* a la suspensión para romper la tensión superficial y lograr que las esporas se distribuyan homogéneamente en todo el volumen de agua.

Se realizó una pequeña abertura en una esquina de la bolsa que contiene al arroz ya esterilizado y con la ayuda de una pipeta se agregan los 40 ml de la suspensión de esporas, tratando de esparcirla homogéneamente sobre todo el sustrato. Una vez inoculadas las bolsas, la abertura realizada para la inoculación se engrapó.

Para conocer la cantidad de esporas que se aplican a una bolsa con sustrato de arroz, se realizó el conteo por área de una caja de Petri inoculada con 10 días de crecimiento de *T. harzianum*. Con la ayuda de la cámara de Neubauer se cuantificó 1 cm² de esporulación; se cortó 1 cm² de medio inoculado y se diluyó en 10 ml de agua destilada, se adicionó una gota de *tween* (20%) para romper la tensión superficial y permitir la separación y dispersión de esporas; a partir del conteo de esporas, se calculó el total de esporas que hay en una caja de Petri (90mm), teniendo una concentración de 2.92x10⁸ conidias por caja de Petri.

2.11.3 Incubación de sustrato inoculado con *Trichoderma harzianum* M4-1.

Las bolsas fueron colocadas en la incubadora durante 10 días a una temperatura de 26°C±1, en condiciones de oscuridad y con 5 horas de luz cada tercer día. A los ocho días de

incubación, una vez que el sustrato tomó una tonalidad uniforme de color verde, la bolsa se abrió cortando la parte superior en forma de “x”, para que el sustrato pueda airearse y secarse y que el grano pase de una consistencia blanda a una dura y se pudieran deshacer los grumos que se formaron. Cuando el sustrato tuvo las características antes mencionadas, se procedió a realizar la molienda del sustrato.

2.11.4 Molienda y tamizado del sustrato.

Una vez seco el arroz inoculado se procedió a molerlo, utilizando un molino manual para maíz, al cual se le acopló un motor para facilitar la molienda y que al igual el molido sea de textura más fina. El arroz ya molido fue pasado por un tamiz de 100 mallas, esto para obtener un polvo muy fino con textura parecida a la harina (Figura 21).

2.11.5 Mezclado del arroz con tierra de diatomeas.

Al obtener el molido con consistencia de harina, se cuantificó con la cámara de Neubauer la cantidad de esporas que hay en 1 gramo, y así proceder a realizar el formulado al mezclarlo con tierra de diatomeas¹², siendo esta el vehículo portador de los conidios (Figura 21) (Centro de educación y tecnología, 2004).

Para preparar el biofungicida en polvo humectable se mezclaron 24 gramos del tamizado de *T. harzianum* con 76 gramos de tierra diatomea, obteniendo una concentración final de 2×10^7 conidias viables por gramo.

¹² Tierra de diatomeas: Las diatomeas son algas microscópicas fosilizadas (compuestas por una pared celular transparente de sílice y una capa interna de pectina); composición unicelular, forma y tamaños variados, provenientes de aguas dulces o marinas y con aproximadamente 5,000 especies conocidas. Cuando las algas mueren, todo el contenido orgánico se destruye, con excepción de su esqueleto de sílice, el cual generalmente van a depositarse al fondo de las aguas, para formar al cabo de los siglos, grandes depósitos de algas fosilizadas conocidos como tierra de diatomeas que es un material inerte no tóxico (Agropuli, 2013).



Figura 21. Preparación del biofungicida.

1. *T. harzianum* M4-1 en medio de cultivo SDA. 2. Preparación de contenedores con sustrato. 3. Inoculación de arroz. 4. Arroz con 10 días de inoculación. 5. Molino. 6. Tamizado del arroz inoculado. 7. Mezcla del sustrato tamizado con tierra diatomea.

2.12 Control de calidad del biofungicida.

2.12.1 Prueba de viabilidad.

Esta prueba de germinación conidial nos permite evaluar si los conidios están vivos o no, esto mediante la observación de germinación de conidios a través del microscopio. Para decir que un biofungicida tiene una buena viabilidad de conidios, deben obtenerse valores de entre el 85% y 100% de viabilidad (Centro de educación y tecnología, 2004).

Para realizar esta prueba se pesó 1 gramo del producto comercial, y se diluyó en 10 ml de agua destilada; posteriormente se tomó 1 ml de la solución y se volvió a diluir en 10 ml de agua destilada, con objeto de disminuir la concentración de conidias y facilitar su cuantificación. Posteriormente, se prepararon los dispositivos para realizar las pruebas de

viabilidad, los cuales constan de una cámara húmeda en una caja de Petri con un dispositivo para realizar microcultivos; al porta objeto se le colocó de cada lado un *slide* de medio de cultivo PDA solidificado; a cada *slide* se le colocó una gota de la segunda dilución. Se agregó agua destilada estéril al papel filtro de la caja de Petri y se incubó por 24 horas; posteriormente a cada *slide* se le agregó una gota de azul de lactofenol, y se le colocó un cubreobjetos, cada *slide* se observó bajo el microscopio para verificar si las esporas que son colocadas son capaces de germinar, y que cantidad son las que germinan. El ocular del microscopio se coloca en un campo de visión donde se puedan apreciar aproximadamente entre 80 y 120 esporas, para así ver la cantidad de esporas que estén germinando correctamente (Centro de educación y tecnología, 2004; Sivila y Álvarez, 2013).

2.12.2 Prueba de pureza.

La prueba de pureza nos permite verificar que el biofungicida no este contaminado con otros microorganismos; es decir, que el producto solo contenga al antagonista. Esta prueba es esencial para mejorar el proceso de producción y formulación del producto en cuestiones de asepsia, ya que al conocer la pureza del producto permite ofrecer un biofungicida de calidad y sin riesgo a ningún contaminante o fitopatógeno (Centro de educación y tecnología, 2004; Sivila y Álvarez, 2013).

Para realizar la prueba de pureza se realizó una dilución en serie con 1 gramo del biofungicida (1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6}) y se inoculó aplicando 1 ml de cada solución en cajas de Petri con medio PDA, y se incubó por 5 días, se verificó cada 24 horas el crecimiento de las diluciones en serie para verificar que no haya crecimiento de algún otro hongo distinto a *Trichoderma* (Centro de educación y tecnología, 2004; Sivila y Álvarez, 2013).

2.13 Prueba *in vivo* en plántulas de tomate.

Para conocer la efectividad del biofungicida en campo, se realizó un experimento con un diseño completamente al azar bajo invernadero en semilleros de tomate (Tabla 11), donde se

inocularon almácigos del cultivar “Rio Grande” con la cepa de *F. oxysporum*, siendo esta la más virulenta según la prueba de patogenicidad realizada anteriormente, y al igual se aplicó el biofungicida a base de *T. harzianum*, para evaluar la efectividad que tiene para controlar la enfermedad de damping-off causada por *F. oxysporum*.

Tabla 11. Distribución de los tratamientos del diseño experimental.

Numero de tratamiento	Tratamiento	Número de repeticiones
Tratamiento 1	Testigo (agua destilada estéril)	10
Tratamiento 2	* <i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	10
Tratamiento 3	* <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	10
Total		30

*Primero se inoculó *T. harzianum* y *F. oxysporum* para el primer y segundo tratamiento respectivamente en el momento de la siembra, y a los 21 días se inoculó *F. oxysporum* en el tratamiento 1 y *T. harzianum* en el tratamiento 2.

Las variables a evaluar del experimento son:

- Longitud de raíz
- Longitud de planta
- Longitud de follaje
- Peso seco

Cada unidad experimental de cada tratamiento consiste en una charola germinadora de unicel con 10 cavidades, a las cuales se les colocó una mezcla de sustrato de tierra, agrolita y peat moss (2:1:1) previamente esterilizado tres veces en autoclave a 121°C durante 20 minutos; las charolas se regaron con el propósito de humedecer el sustrato, posteriormente se colocó una semilla de tomate en cada cavidad y se procedió a inocular cada tratamiento.

Para la inoculación se utilizó un aspersor (Figura 22), aplicando un total de 3.5 ml de la solución del biofungicida por cada unidad experimental; en el caso del tratamiento testigo solo se aplicó agua destilada estéril, para el caso de los tratamientos dos y tres se aplicó *F. oxysporum* a una concentración de 1×10^6 conidias/ml; (el inóculo se obtuvo de la misma manera que ya se explicó anteriormente en la prueba de patogenicidad) y el biofungicida a

base *T. harzianum* con una concentración de 2×10^7 conidias/gramo se aplicó en una dosis de 1.2 gr/litro, recomendación de dosis de aplicación del producto MYCOBAC. (PLM, 2012)

El experimento se realizó en el mismo invernadero y bajo las mismas condiciones de temperatura que las pruebas de patogenicidad.



Figura 22. Preparación e inoculación de semilleros.

Las evaluaciones de los datos fueron obtenidas 43 días posteriores a la siembra, cuando se observó que la plántula ya estaba lista para el trasplante. Las plántulas fueron lavadas para quitar el sustrato de la raíz, una vez retirado el sustrato se midió la longitud de planta, raíz, y follaje de cada una de las plantas de cada unidad experimental; posteriormente el total de plantas de cada unidad experimental se pesó en báscula analítica, para conocer el peso fresco de la plántula; una vez pesados todos los tratamientos, se colocaron en una estufa a 70°C , durante 15 horas para deshidratarlas y obtener el peso seco de los tratamientos.

Una vez obtenidos todos los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de medias para los tratamientos utilizando el programa Infostat versión 2016I (Di Rienzo *et al.* 2016).

Capítulo 3. Resultados y Discusión.

3.1 Aislamientos.

Por cada muestra de suelo se aislaron diferentes microorganismos, se pudo determinar el género de los aislamientos que tuvieron un mayor crecimiento significativo en las placas de medio de cultivo (PDA) por cada muestra estudiada (Tabla 12). La identificación de género de cada uno de los hongos obtenidos, se realizó con base a la clave sinóptica de Barnett y Hunter (1987).

Tabla 12. Aislamientos obtenidos de tres comunidades en el municipio de Coatepec Harinas.

Aislamientos de las muestras de suelo colectadas		
Numero de Muestra	Comunidad	Hongo
Muestra 1	Ixtlahuaca de Villada	<i>Trichoderma</i> <i>Penicillium</i> <i>Gliocladium</i> <i>Chaetomium</i> <i>Mucor</i>
Muestra 2	Chiltepec	<i>Trichoderma</i> <i>Fusarium</i> <i>Mucor</i> <i>Cladosporium</i> <i>Gliocladium</i> <i>Aspergillus</i>
Muestra 3	Chiltepec	<i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Aspergillus</i>
Muestra 4	Acuitlapilco	<i>Trichoderma</i> <i>Fusarium</i> <i>Gliocladium</i> <i>Chaetomium</i> <i>Cladosporium</i>

De las muestras se obtuvieron siete diferentes cepas del hongo antagonista *Trichoderma* y cuatro cepas diferentes del hongo fitopatógeno *Fusarium*.

De la muestra uno de suelo de la comunidad Ixtlahuaca de Villada se obtuvo solo una cepa de *Trichoderma*, en la muestra dos que corresponde a la comunidad de Chiltepec se aislaron dos cepas de *Trichoderma* y una de *Fusarium*, en la muestra tres de la comunidad de

Chiltepec se aislaron dos cepas de *Fusarium* y dos cepas de *Trichoderma*, en la muestra de suelo cuatro de la comunidad de Acuitlapilco se aislaron dos cepas de *Trichoderma* y una cepa del fitopatógeno *Fusarium*.

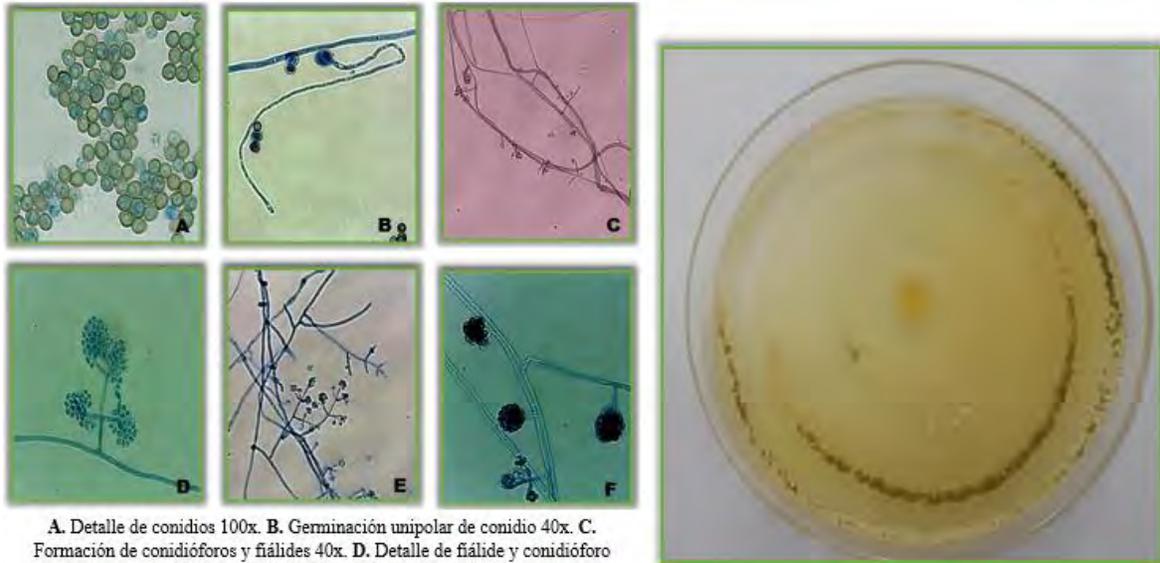
Es importante recalcar que todos los suelos de donde fueron colectadas las muestras fueron de invernaderos con producción de tomate y donde se podía apreciar plantas con síntomas de marchitamientos. Siendo el invernadero de donde se obtuvo la muestra dos de suelo ubicado en la comunidad de Chiltepec, donde se pudo apreciar mayor número de plantas con síntomas de marchitamiento y con daños más severos de enfermedad (Anexo 2).

3.2 Identificación morfológica de especies de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*.

3.2.1 Identificación morfológica de especies del género *Trichoderma*.

De cada cepa aislada e identificada se realizó una ficha; que incluye la taxonomía, datos de colecta, técnica de aislamiento, medio de cultivo utilizado para su identificación, técnica de identificación, características macroscópicas y microscópicas, las claves utilizadas para su identificación, así como la descripción de género y especie. Esta información es indispensable para llevar un control del cepario del laboratorio de Fitopatología de Ingeniería Agrícola de la FESC-C4; también estos documentos sirven como consulta de información para futuras investigaciones. Dado a lo extenso de las fichas, solo se presentan dos en este trabajo; las demás pueden ser consultadas en el laboratorio antes mencionado. (Anexo 8)

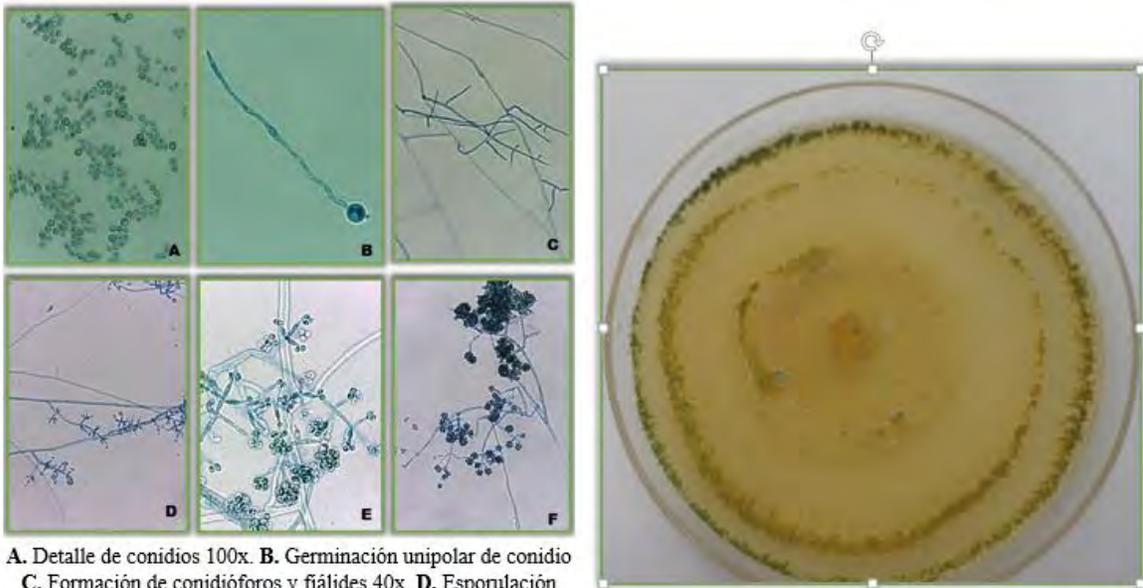
- Muestra 1.
Tichoderma sp.



A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidio 40x. C. Formación de conidióforos y fiálides 40x. D. Detalle de fiálide y conidióforo 100x. E. Esporulación 100x. F. Esporulación 100x.

Colonia de rápido crecimiento, formando anillos de esporulación concéntricos a partir de pústulas rugosas de tonalidades amarillas a verde opaco, escaso micelio aéreo, reverso de la colonia de tonalidad beige a amarillo. Conidios ovoides ($2.98-3.65 \times 2.79-3.35 \mu$), fiálides langeniformes ($5.72-7.84 \times 1.68-2.49 \mu$), fiálide terminal ($6.73-7.75 \times 1.90-2.20 \mu$), Clamidospora ausente.

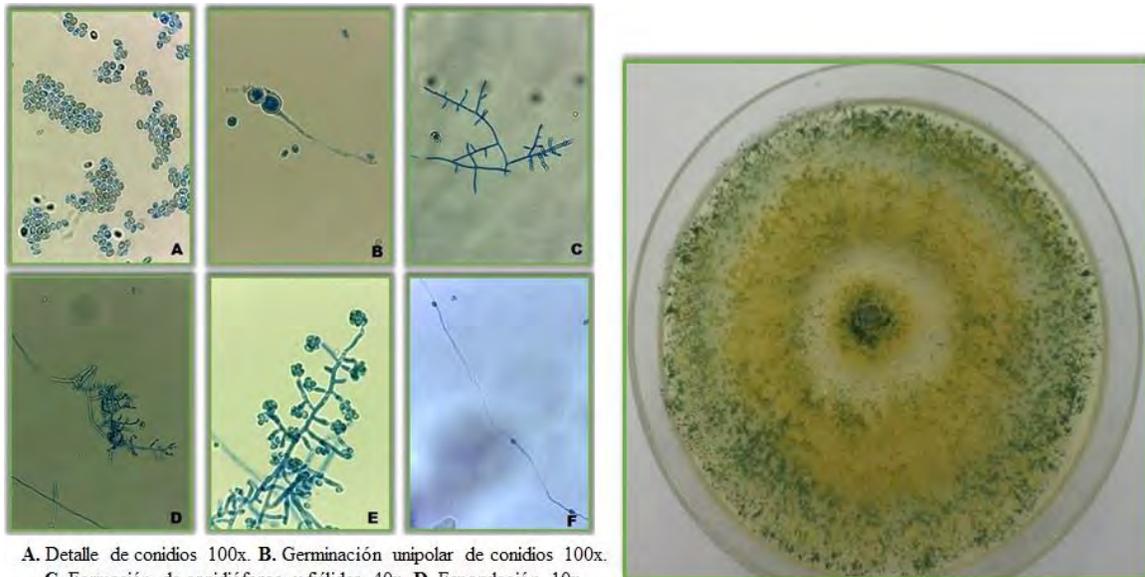
- Muestra 2.
Trichoderma sp.



A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidio
C. Formación de conidióforos y fiálides 40x. D. Esporulación
40x. E. Detalle de fiálides 100x. F. Esporulación 40x.

Colonia de crecimiento rápido, formación de pústulas de conidiación de color verde amarillento formando anillos concéntricos bien definidos, escaso crecimiento de micelio semi-elevado de color blanco, creciendo mayormente pegado al medio, colonia con el reverso de tonalidad amarilla. Conidios ovoides ($3.11-3.54 \times 2.35-2.93 \mu$), fiálides langeniformes ($5.77-8.50 \times 1.94-2.66 \mu$), fiálides terminales más largas que las laterales ($6.25-11.50 \times 1.75-2.20 \mu$), clamidospora ausente.

- Muestra 2-1.
Trichoderma koningii.

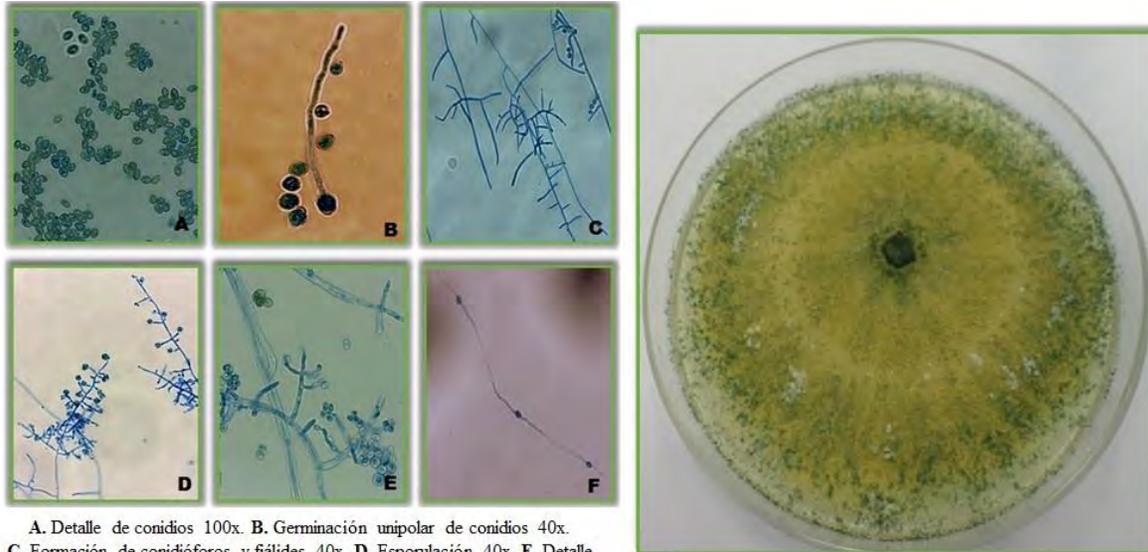


A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidios 100x.
C. Formación de conidióforos y fiálides 40x. D. Esporulación 10x.
E. Detalle de fiálide y conidióforo 100x. F. Clamidospora 40x

Colonia de rápido crecimiento; conidiación efusa formando pequeña pústulas compactas de esporulación de color amarillo-verdoso, con presencia de micelio aéreo.

Trichoderma koningii tiene conidióforos poco ramificados, principalmente ramificaciones secundarias emparejadas; eje principal del conidióforo más largo que las ramificaciones secundarias. Fiálide langeniforme (7.33-10.00x1.45-2.10 μ) mayormente verticilada y en ocasiones de 3-4 verticilos; fiálides terminales más alargadas (8.80-11.87x1.57-2.16 μ). Esporulación acropleurógena. Conidios subcilíndricos de color verde pálido (3.15-4.00x2.08-2.67 μ), pared conidial lisa. Clamidosporas presentes (4.38-5.42x5.60-6.10 μ), de forma globosa, creciendo intercaladamente entre el micelio (Gams y Bissett, 1998; Watanabe, 2010).

- Muestra 3.
Trichoderma koningii.

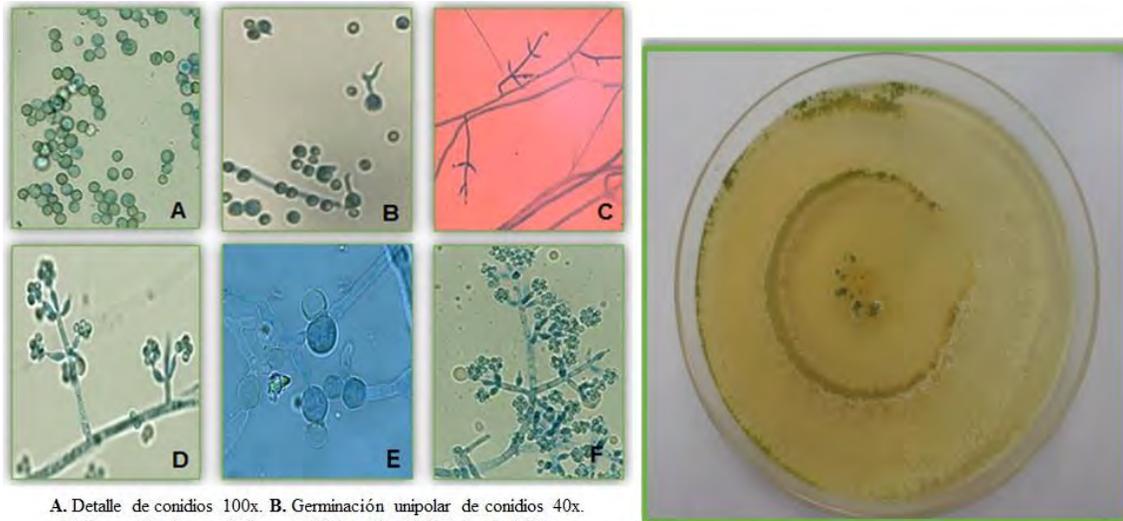


A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidios 40x.
C. Formación de conidióforos y fiálides 40x. D. Esporulación 40x. E. Detalle de fiálide y conidióforo 100x. F. Clamidospora 40x

Colonia de crecimiento rápido, conidiación efusa de color amarillo-verdoso, de color verde mayormente en la periferia de la colonia, escaso micelio aéreo, presentándose en pequeños manchones alrededor de las pústulas de esporulación.

Trichoderma koningii tiene conidióforos poco ramificados, ramas secundarias emparejadas; eje principal del conidióforo más largo. Fiálide langeniforme verticilada ($7.19-9.47 \times 1.57-2.08 \mu$); fiálides terminales más largas que las fiálides laterales ($9.15-12.73 \times 1.51-2.02 \mu$). Esporulación acropleurógena. Conidios mayormente subcilíndricos y en ocasiones con la base truncada ($3.36-4.01 \times 2.37-2.73 \mu$), de color verde pálido, pared conidial lisa. Clamidosporas globosas creciendo intercaladamente entre las hifas ($4.43-5.60 \times 6.00-7.20 \mu$) (Gams y Bissett, 1998; Watanabe, 2010).

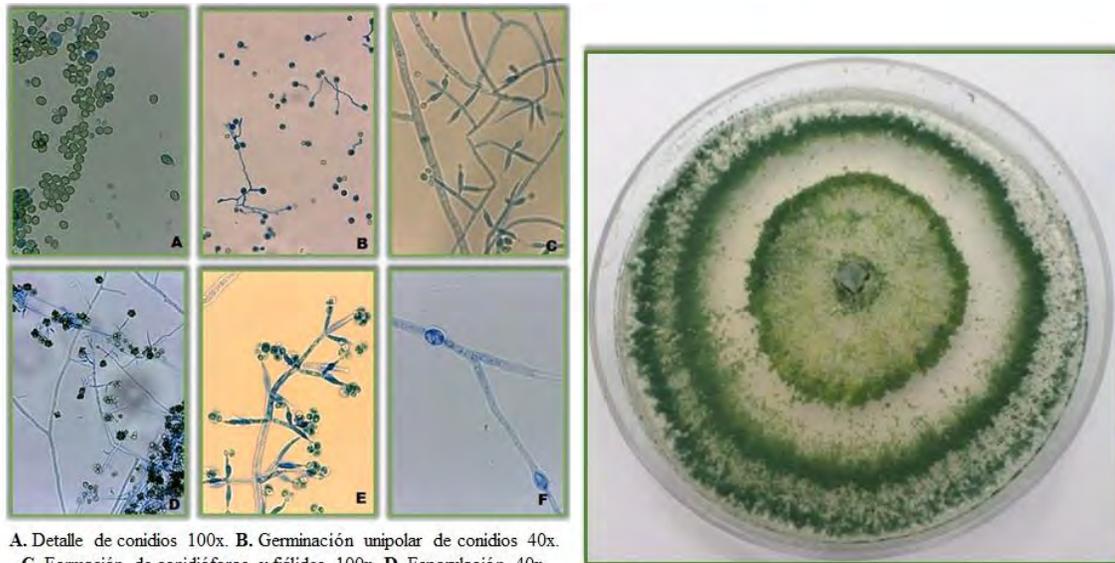
- Muestra 3-1.
Trichoderma atroviride.



A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidios 40x.
C. Formación de conidióforos y fiálides 40x. D. Detalle de fiálide y conidióforo 100x. E. Clamidosporas 100x. F. Esporulación 100x.

Colonia de rápido crecimiento, conidiación en anillos concéntricos de color amarillo-grisáceo, micelio aéreo de color blanco de apariencia algodonosa, pigmentación del medio con tonalidad amarilla. *T. atroviride* tiene conidióforos ramificados, estrechos y flexuosos, con ramificaciones secundarias emparejadas, eje principal del conidióforo más largo que las ramificaciones secundarias. Fiálides lageniformes a menudo curvadas, 2-4 verticiladas (6.19-7.88x1.80-2.41 μ), fiálides terminales mayormente en verticilos de 3 (8.47-11.49x1.59-2.17 μ). Esporulación acropleurógena (3-6 conidios), conidios subglobosos con pared conidial lisa, conidio de color verde (3.05-3.68x3.05-3.55 μ). Clamidospora solitaria de forma globosa y en ocasiones en masas multicelulares (6.40-6.52x7.32-7.43 μ) (Gams y Bissett, 1998; Watanabe, 2010).

- Muestra 4.
Trichoderma harzianum.

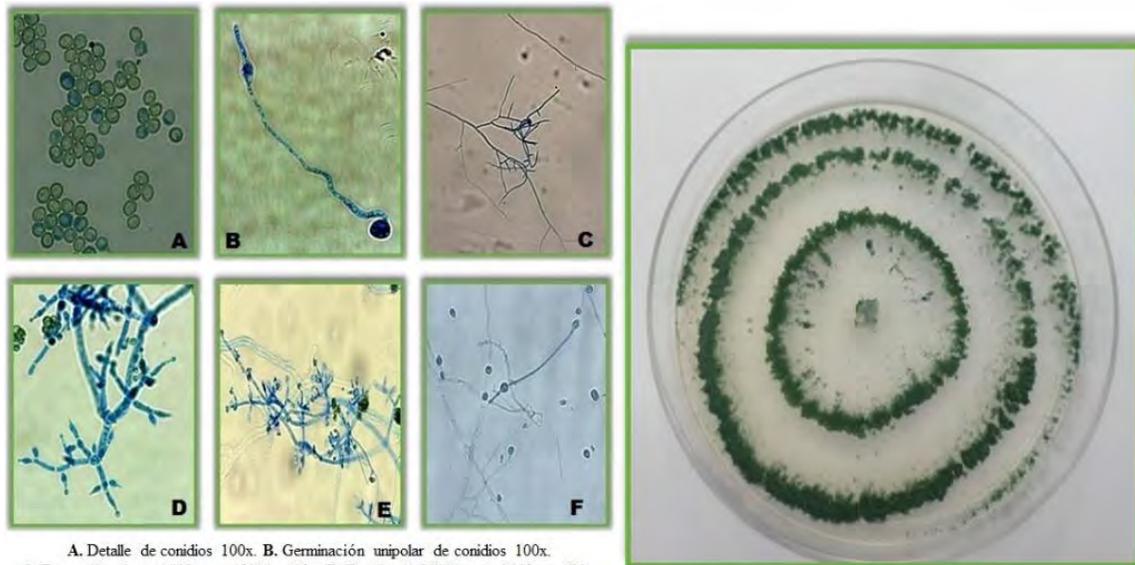


A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidios 40x.
C. Formación de conidióforos y fiálides 100x. D. Esporulación 40x.
E. Detalle de fiálides 100x. F. Clamidosporas 100x.

Colonia de crecimiento rápido, conidiación en forma de anillos concéntricos de esporulación de color verde, centro de la colonia de color amarillo-verdoso; fase somática creciendo entre cada anillo de esporulación con micelio hialino creciendo pegado al medio. *T. harzianum* tiene conidióforos estrechos y flexuosos, con ramificaciones verticiladas, formando una estructura piramidal, eje principal del conidióforo más largo. Fiálides laterales ampuliformes y fiálides terminales en su mayoría langeniformes (9.47-11.48x1.94-2.67 μ); 3-4 verticiladas, fiálides terminales mayormente pareadas (9.83-12.50x1.98-2.16 μ). Esporulación acropleurógena, conidios dispuestos en racimos terminales (3-6 conidios), conidio subgloboso a ovoide, con pared conidial lisa, conidio de color verde pálido (3.99-4.70x2.89-3.53 μ). Clamidospora solitaria de forma globosa, dispuesta de manera intercalar en las hifas (8.15-10.20x9.30-10.50 μ) (Gams y Bissett, 1998; Watanabe, 2010).

- Muestra 4-1.

***Trichoderma harzianum*.**



A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidios 100x.
 C. Formación de conidióforos y fiálides 10x. D. Detalle de fiálide y conidióforo 100x.
 E. Esporulación 40x. F. Clamidosporas 40x.

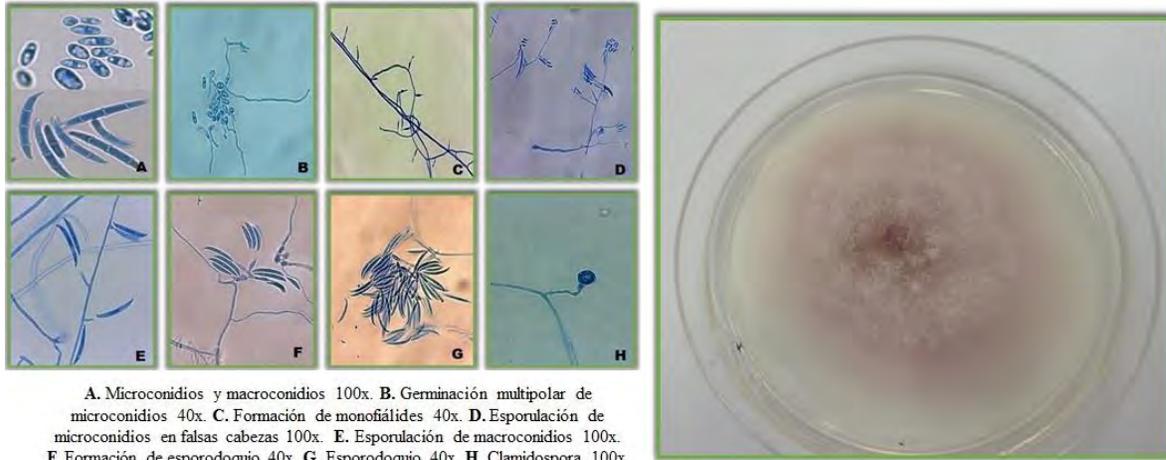
Colonia de crecimiento rápido, conidiación en anillos concéntricos de esporulación de color blanco al inicio, tornándose de color verde en colonias maduras, crecimiento de fase somática entre cada anillo de esporulación con micelio hialino creciendo pegado al medio y escasamente semi-elevado.

Trichoderma harzianum tiene conidióforos estrechos y flexuosos, con ramificaciones verticiladas, formando una estructura piramidal, eje principal del conidióforo más largo. Fiálides laterales ampuliformes y fiálides terminales en su mayoría langeniformes ($7.32-8.49 \times 1.83-2.50 \mu$); 3-4 verticilidas, fiálides terminales mayormente pareadas ($9.75-11.63 \times 1.59-2.32 \mu$). Esporulación acropleurógena, conidios dispuestos en racimos terminales (3-6 conidios), conidio subgloboso a ovoide, con pared conidial lisa, conidio de color verde pálido ($3.59-4.01 \times 2.96-3.29 \mu$). Clamidospora solitaria de forma globosa, dispuesta de manera intercalar en las hifas ($8.18-10.08 \times 9.52-11.10 \mu$) (Gams y Bissett, 1998; Watanabe, 2010).

3.2.2 Identificación morfológica de especies del género *Fusarium*.

- Muestra 2.

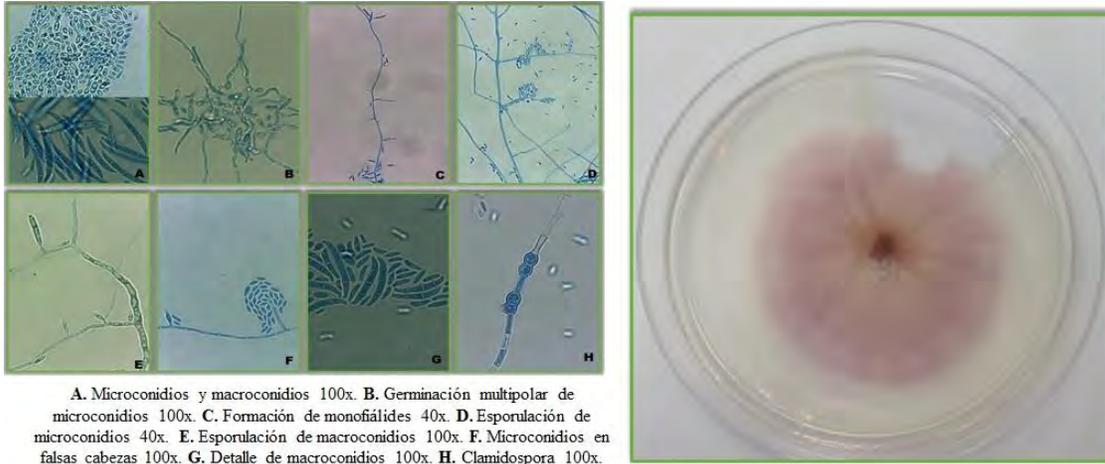
Fusarium oxysporum.



La especie *Fusarium oxysporum* crece como una colonia de rápido crecimiento, con micelio aéreo abundante de color blanco a crema, reverso de la colonia con tonalidad rojo pálido.

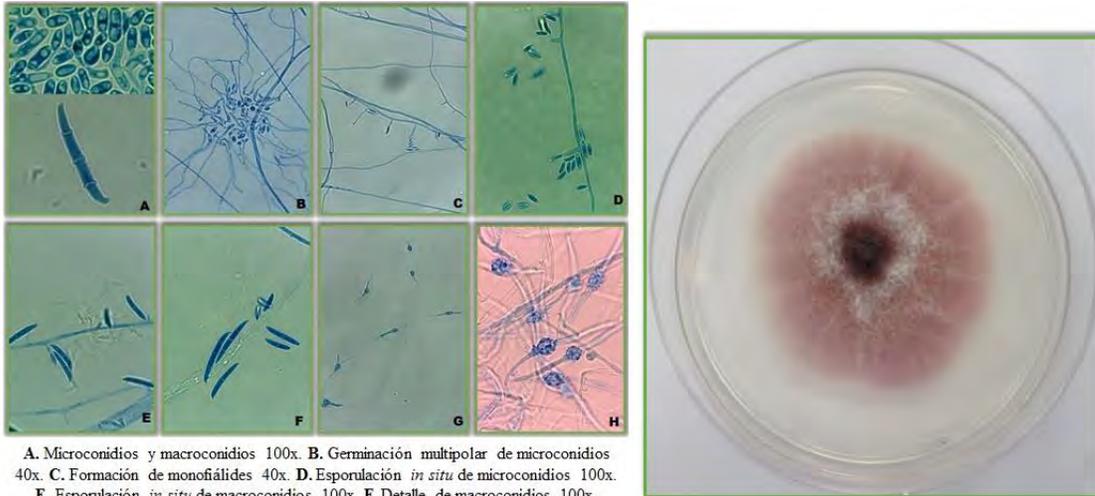
Especie con abundante producción de microconidios y macroconidios. Microconidio de forma ovalada unicelular y en ocasiones de dos células ($2.21-3.12 \times 6.31-8.98 \mu$), conidiación a partir de monofálides cortas con esporulación en forma de falsas cabezas. Macroconidio creciendo a partir del esporodoquio o a partir de la hifa ($26.14-32.41 \times 2.94-3.70 \mu$); macroconidio en forma de hoz, corto usualmente 3-septada, de paredes delgadas con el lado dorsal más curvo que el lado ventral; célula apical cónica o curvada, célula basal en forma de pie. Clamidosporas abundantes, de rápida formación de paredes lisas, presentándose solas mayormente o en parejas en menor proporción, desarrollándose principalmente en las hifas de manera terminal aunque también se desarrollan intercaladamente entre las hifas ($6.67-10.16 \times 7.12-10.94 \mu$) (Nelson *et al.* 1983; Leslie y Summerell, 2006; The University of Adelaide, 2016).

- Muestra 3.
Fusarium solani.



La especie *Fusarium solani* crece como una colonia de crecimiento relativamente rápido, con micelio aéreo en el centro de la colonia, creciendo mayormente en el centro de la colonia. Especie con monofiálides largas produciendo microconidios en falsas cabezas. Microconidios en su mayoría de forma arriñoda y en ocasiones ovalada, 0-1 septo ($2.40-3.00 \times 6.20-7.50 \mu$). Macroconidio mayormente de 3 septos ($21.80-31.60 \times 2.70-3.10 \mu$), produciéndose a partir de monofiálides cortos y a partir del micelio; macroconidio delgado con escasa curvatura dorsiventral, con las paredes celulares paralelas a lo largo de la macroconidia, célula basal protuberada y con la célula apical entallada, encorvada hacia la punta. Abundante formación de clamidosporas globosas a ovals creciendo mayormente solitarias intercaladamente entre las hifas, en ocasiones en pares ($6.50-7.60 \times 6.30-7.50 \mu$) (Nelson *et al.* 1983; Leslie y Summerell, 2006; The University of Adelaide, 2016).

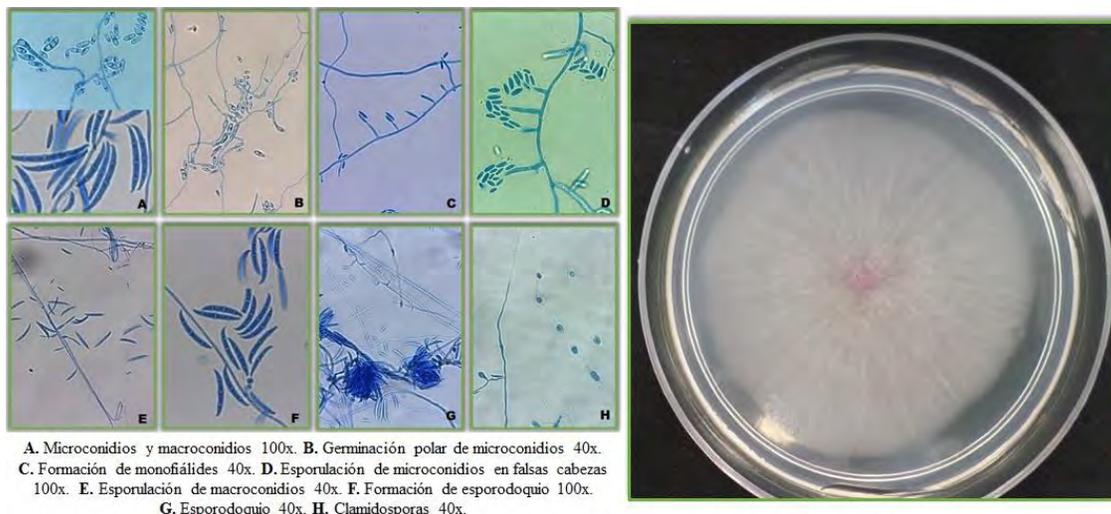
- Muestra 3-1.
Fusarium solani.



A. Microconidios y macroconidios 100x. B. Germinación multipolar de microconidios 40x. C. Formación de monofiálides 40x. D. Esporulación *in situ* de microconidios 100x. E. Esporulación *in situ* de macroconidios 100x. F. Detalle de macroconidios 100x. G. Clamidosporas creciendo intercaladamente entre las hifas 40x. H. Clamidospora 100x.

La especie *Fusarium solani* crece como una colonia de rápido crecimiento, con micelio aéreo en el centro de la colonia, y micelio sumergido en el medio en la periferia de la colonia. Especie con monofiálides largas produciendo microconidios en falsas cabezas. Microconidios de forma arriñonada, ovalada a reniforme 0-1 septo ($2.71-3.29 \times 6.54 \times 8.29 \mu$). Macroconidio 3-5 septos ($24.79-32.06 \times 2.83-3.19 \mu$), produciéndose a partir de monofiálides cortos y a partir del micelio; macroconidio delgado con escasa curvatura dorsiventral, con las paredes celulares paralelas a lo largo de la macroconidia, célula basal protuberada y con la célula apical entallada, encorvada hacia la punta. Abundante formación de clamidosporas globosas a ovals creciendo mayormente intercaladamente entre las hifas, solitarias o en pares, y en ocasiones clamidosporas terminales solitarias; clamidosporas con pared celular rugosa ($7.28-9.75 \times 5.78-7.14 \mu$) (Nelson *et al.* 1983; Leslie y Summerell, 2006; The University of Adelaide, 2016).

- Muestra 4.
***Fusarium lateritium*.**



La especie *Fusarium lateritium* tiene un crecimiento relativamente lento, con muy escaso crecimiento de micelio aéreo, reverso de la colonia con tonalidad rosa pálido. Especie con crecimiento pionotal; colonia creciendo pegada al medio. Especie con abundante producción de macroconidios y microconidios en menor proporción. Microconidio de forma elipsoidal, arriñonada a fusiforme, 0-1 septado (2.42-3.07x5.80-8.80 μ). Conidiación a partir de monofiálides medio largas con esporulación en falsas cabezas. Macroconidio abundante creciendo a partir de esporodocios (22.35-35.04x2.48-2.95 μ), medio largo 3-septado, de paredes gruesas con las paredes paralelas a lo largo de la espora; célula apical encorvada y célula basal escasamente entallada, curveada. Clamidospora de rápido crecimiento, creciendo en su mayoría sumergidas intercaladamente entre las hifas de forma solitaria o en parejas (7.20-8.72x7.57-9.07 μ) (Nelson *et al.* 1983; Leslie y Summerell, 2006).

3.3 Prueba de patogenicidad.

Al realizar la prueba de patogenicidad, se pudo determinar el grado de virulencia de las cuatro distintas cepas aisladas del género *Fusarium*. Las raíces de las plantas se lavaron 25 días después de la inoculación, esto para verificar si existía algún síntoma de necrosis ocasionada

por el fitopatógeno *Fusarium*, ya que durante el transcurso de los 25 días, no se observaron síntomas muy marcados de marchitamientos en ninguno de los tratamientos.

Las raíces se observaron al microscopio estereoscópico luego de ser lavadas para detectar aquellas con síntomas de necrosis, y posteriormente se colocaron en dispositivos de cámara húmeda durante cinco días; para inducir la esporulación del hongo causante de las necrosis.

El tratamiento inoculado con *Fusarium oxysporum* resultó el tratamiento patogénico y con mayor virulencia, ya que fue la única cepa que causó daño considerable a la raíz; la raíz se observó con diversos síntomas de plesionecrosis y necrosis a lo largo de la raíz principal, así como raíces secundarias totalmente necrosadas. La raíz de la planta inoculada con *F. oxysporum*, se observaba con menor turgencia y menor tamaño a diferencia de la raíz de la planta testigo. Posterior a los cinco días en cámara húmeda se apreció un desarrollo micelial aéreo blanquecino de apariencia algodonosa, surgiendo a partir de las zonas de necrosis, y colonizando así la raíz. Se realizó una preparación temporal con cinta pegante a partir del micelio creciendo en la raíz, y al observarlo al microscopio óptico, se observaron macroconidias en forma de hoz, estructuras características de *Fusarium oxysporum*; con lo cual se concluye que los síntomas de necrosis son causados por el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Figura 23). Se realizó un aislamiento en una caja de Petri con medio de cultivo PDA del micelio creciendo en la raíz, para así cumplir con el cuarto postulado de Koch; las características de la colonia aislada correspondían a las características de la colonia de la cepa inoculada, así como las características morfológicas microscópicas de identificación.

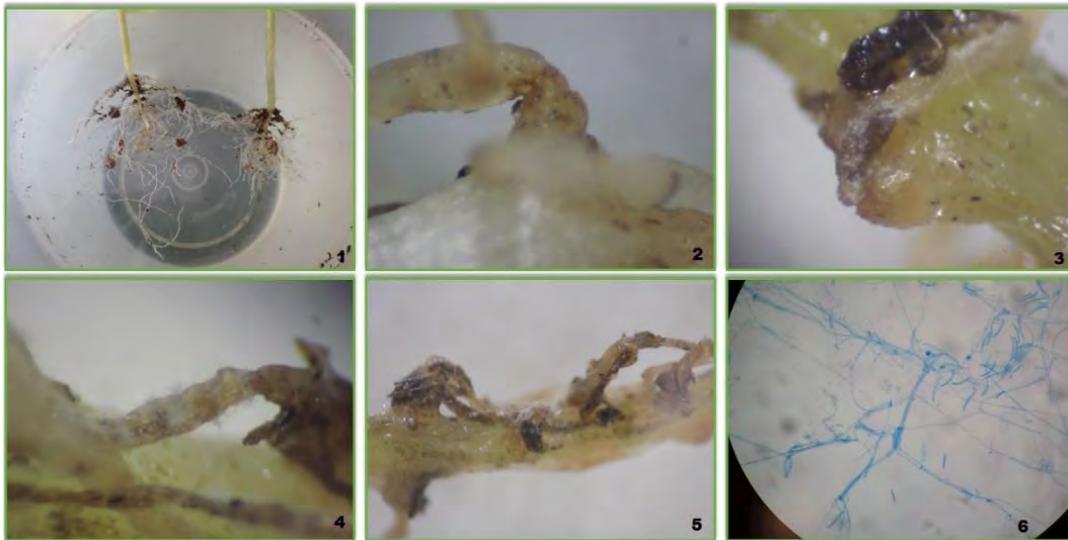


Figura 23. Síntomas de daño de *Fusarium oxysporum* en raíz de plántula de tomate.

1. Raíz testigo (derecha), raíz inoculada con *F. oxysporum* (izquierda). 2. Síntoma de plesioneclerosis. 3-5. Síntoma de necrosis con micelio colonizando la raíz. 6. Micrografía de *F. oxysporum*, causante de las necrosis.

En el testigo, se observó una planta con raíz de buen tamaño y desarrollo, con buena turgencia, al observarla al microscopio no se observó ningún síntoma de necrosis, o algún daño de la raíz; no se observó ningún crecimiento de micelio posterior a los cinco días en cámara húmeda.

En el tratamiento inoculado con *Fusarium lateritium*, no se observó daño por necrosis al observarla al microscopio, antes y después de colocarla en cámara húmeda. Se observó una raíz de buen tamaño sin gran diferencia entre la raíz testigo (Figura 24).

En el tratamiento inoculado con *Fusarium solani* M3, se observó una raíz más pequeña y poco turgente a diferencia del tratamiento testigo; se observaron pequeños síntomas de plesioneclerosis antes de colocarla en la cámara húmeda, pero al observarla posterior a los cinco días en cámara húmeda no se observó crecimiento de micelio.

Por último, en el tratamiento inoculado con *Fusarium solani* M3-1, se observó una raíz con tamaño similar a la raíz testigo, con buena turgencia; con pequeños síntomas de plesioneclerosis. Posteriormente en la cámara húmeda no se observó presencia de crecimiento de micelio.



Figura 24. Comparación de raíces inoculadas en contra del testigo.

1. *Fusarium lateritium* (izquierda), testigo (derecha). 2. Testigo (izquierda), *Fusarium solani* M3 (derecha). 3. *Fusarium solani* M3-1 (izquierda), testigo (derecha).

3.4 Pruebas de antagonismo en cultivo dual.

Las pruebas de antagonismo de cultivo dual, permitieron determinar la cepa de *Trichoderma* con mayor potencial de controlador biológico, con base a los resultados cualitativos obtenidos, se elaboró la siguiente tabla, para demostrar el potencial de control según la escala propuesta por de Bell *et al.* 1982.

Tabla 13. Evaluación del grado de antagonismo en cultivo dual a los 10 días.

Antagonista	Fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> Valor de la escala de Bell <i>et al.</i> 1982
<i>Trichoderma sp.</i> M1	Clase 3
<i>Trichoderma sp.</i> M2	Clase 3
<i>Trichoderma koningii</i> M2-1	Clase 3
<i>Trichoderma koningii</i> M3	Clase 2
<i>Trichoderma atroviride</i> M3-1	Clase 2
<i>Trichoderma harzianum</i> M4	Clase 2
<i>Trichoderma harzianum</i> M4-1	Clase 2

En la tabla 13 podemos observar que las siete diferentes cepas de *Trichoderma* tienen un alto potencial de controlador biológico al evaluarlas cualitativamente, destacando las cepas *T. koningii* M3, *T. atroviride* M3-1, *T. harzianum* M4 y *T. harzianum* M4-1 a comparación de las cepas *Trichoderma sp.* M1, *Trichoderma sp.* M2, y *T. koningii* M2-1 (Figura 25) donde se notó una disminución de crecimiento sobre el patógeno a comparación de las demás cepas.

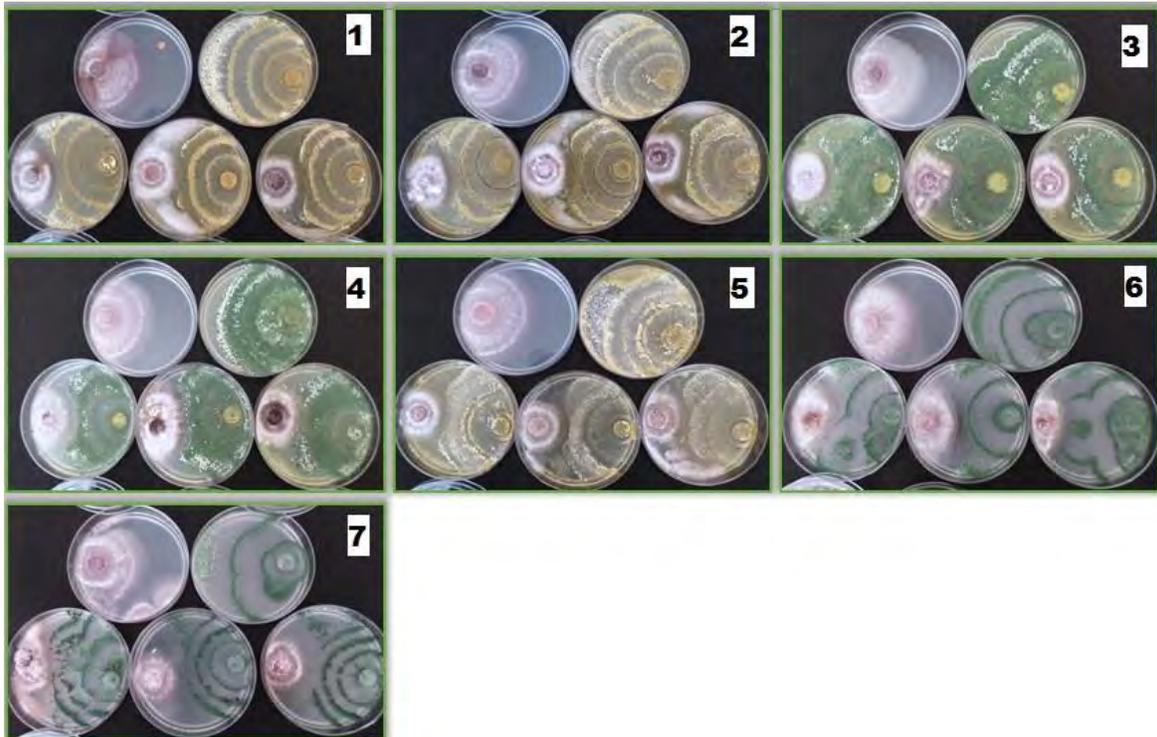
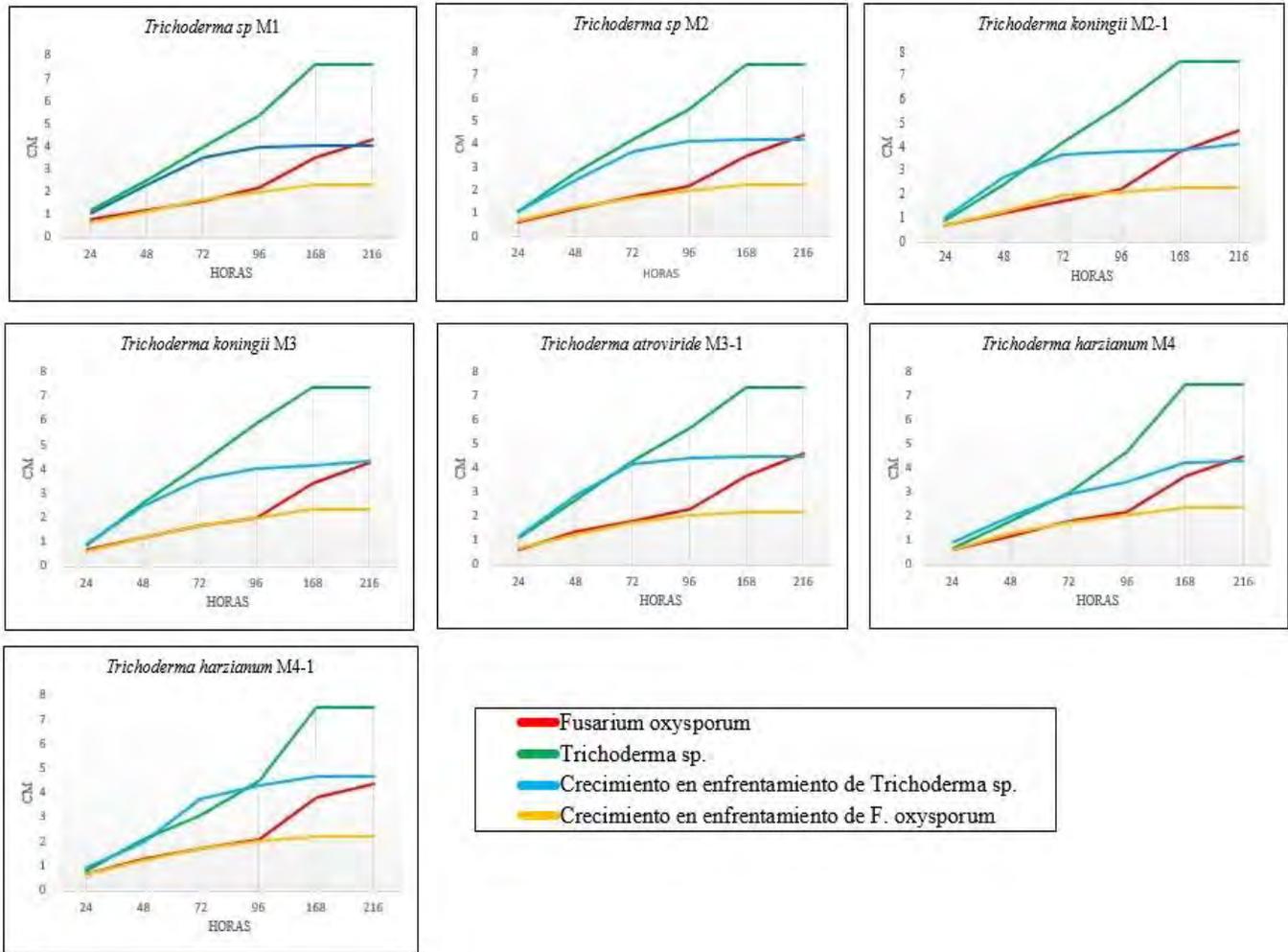


Figura 25. Pruebas de cultivos duales (216 horas).

1. *Trichoderma* sp. M1. 2. *Trichoderma* sp. M2. 3. *T. koningii* M2-1. 4. *T. koningii* M3. 5. *T. atroviride* M3-1. 6. *T. harzianum* M4. 7. *T. harzianum* M4-1.

Para conocer el potencial de controlador biológico de las cepas de *Trichoderma* de una manera cuantitativa se evaluó el comportamiento de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* creciendo solas (testigo) y en enfrentamiento con *F. oxysporum*, así como el crecimiento de esta última cepa creciendo sola; comparando los radios de crecimiento del antagonista (RCA) y el radio de crecimiento del patógeno (RCP), para así poder calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento radial. En la figura 27 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en enfrentamiento y creciendo solas, así como del hongo fitopatógico *F. oxysporum*. Los datos de crecimiento radial de cada 24 horas de los diferentes tratamientos de cultivo dual de las diferentes cepas se pueden ver en el Anexo 4.



CM= Centímetros

Figura 26. Cinética de crecimiento de cepas de *Trichoderma*.

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) se calculó con base al antagonista, es decir, que cepa de *Trichoderma* tiene un mayor crecimiento al estar en enfrentamiento con el fitopatógeno *F. oxysporum*, siendo la cepa con el menor PICR la que mayor crecimiento tiene, porque su crecimiento no se vio tan inhibido en relación al testigo al estar en enfrentamiento.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).

Antagonista	(PICR)
<i>Trichoderma sp.</i> M1	46.57%
<i>Trichoderma sp.</i> M2	43.6%
<i>Trichoderma koningii</i> M2-1	46.05%
<i>Trichoderma koningii</i> M3	41.08%
<i>Trichoderma atroviride</i> M3-1	39.18%
<i>Trichoderma harzianum</i> M4	42.66%
<i>Trichoderma harzianum</i> M4-1	37.33%

Los resultados de actividad antagónica por parte de las cepas de *Trichoderma* fueron buenos, ninguna de las cepas de *Trichoderma* tuvo una inhibición en su crecimiento mayor del 50% (Tabla 14), comparado con el crecimiento del testigo, dato que concuerda con los valores establecidos cualitativamente según la escala de Bell, ya que ninguna escala fue mayor de 3, donde el patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de *Trichoderma* (Clase 4); y por lo cual se vería afectado su PICR, obteniendo valores mayores al 50% de inhibición.

La cepa *Trichoderma sp.* M1, fue la cepa con mayor inhibición de crecimiento por parte del patógeno con 46.57% de inhibición en comparación al testigo, contrario a la cepa *T. harzianum* M4-1, la cual tuvo un porcentaje de inhibición del 37.33% en comparación con el testigo, siendo esta cepa la que de manera *in vitro* demuestra un mayor potencial de actividad antagónica y parasítica ante el fitopatógeno *F. oxysporum*.

Con base a los datos tomados a partir del crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en enfrentamiento *in vitro* contra *F. oxysporum*, se buscó el mejor ajuste al modelo matemático por medio de regresiones polinómicas, y se graficó dicha ecuación para conocer el comportamiento de crecimiento de cada una de las cepas antagonistas de *Trichoderma* (Figura 28) utilizando el programa matemático Maple 18.

Después de obtener las ecuaciones se sustituyeron los valores de cada 12 horas para conocer el comportamiento de crecimiento de las cepas en dichos tiempos (Anexo 5), los valores obtenidos se graficaron (Figura 29), demostrando que la cepa *T. harzianum* M4-1 tiene un crecimiento menor que las demás cepas durante las primeras 60 horas, pero al transcurrir el

tiempo, posterior a las 120 horas, esta cepa tiene un crecimiento mayor a todas las demás; cualidad que la convierte en la cepa con mayor potencial de controlador biológico, colonizando con un mayor crecimiento el sustrato, estos resultados nos dan idea del comportamiento que podría tener la cepa en el suelo al estar en competencia con los fitopatógenos, lo cual, gracias a su mayor crecimiento nos indica que por su mecanismo de acción de competencia por sustrato y nutrientes sea mejor que las demás cepas, convirtiéndola en una cepa con gran potencial de control.

La velocidad de crecimiento de las cepas en un punto en el tiempo se obtuvo a partir de la segunda derivada y sustituyendo los valores de cada 12 horas (Anexo 6), a partir de los datos se realizó la gráfica (Figura 30), en la que se observa que la cepa *T. harzianum* M4-1 tiene una velocidad de crecimiento en las primeras 12 horas menor que las demás cepas, pero a partir de las 60 horas, la velocidad de crecimiento de la cepa aumenta por encima de todas las demás cepas, esto se debe, a que la cepa de *T. harzianum* M4-1 al estar cerca del fitopatógeno *F. oxysporum*, lo cual ocurre a partir de las 48 horas de crecimiento, la cepa antagonista tiene un estímulo de crecimiento quimiotrópico hacia el fitopatógeno, mientras que las demás cepas tienden a disminuir su crecimiento, característica por la que la cepa *T. harzianum* M4-1 tiene mayor potencial de controlador biológico. Al igual, con los datos de velocidad obtenidos a partir de la primera derivada, se calculó la velocidad media de crecimiento de cada una de las cepas en el lapso de tiempo de las 0 a las 216 horas:

$$V_{med} = \frac{f(x_f) - f(x_i)}{x_f - x_i}$$

Donde:

V_{med} = velocidad media

x_i = punto inicial

x_f = punto final

Con base a los resultados de velocidad media la cepa *T. harzianum* M4-1 tiene una $V_{med}=0.2174$ mm/hora, siendo esta cepa la que tiene una mayor velocidad en un lapso de 10 días (Tabla 15).

Tabla 15. Velocidad media de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en 10 días.

Cepa de <i>Trichoderma</i>	V_{med}
<i>Trichoderma</i> sp. M1	0.1889644424
<i>Trichoderma</i> sp. M2	0.1973563076
<i>Trichoderma koningii</i> M2-1	0.1945356036
<i>Trichoderma koningii</i> M3	0.2047126563
<i>Trichoderma atroviride</i> M3-1	0.2117448954
<i>Trichoderma harzianum</i> M4	0.2003280915
<i>Trichoderma harzianum</i> M4-1	0.2174985287

En resumen, al analizar los datos anteriores podemos determinar que la cepa *T. harzianum* M4-1 es la que tiene un mayor potencial de controlador biológico con base a las pruebas realizadas *in vitro*, ya que en las diferentes pruebas mencionadas anteriormente realizadas para determinar la cepas con mayor potencial de control en pruebas *in vitro*, esta cepa está por encima de las demás en los resultados. Otra opción que se consideró para determinar que esta cepa es la que tiene el mayor potencial para realizar un control biológico de enfermedades es su crecimiento biológico intercalándose crecimientos de anillos de esporulación y crecimiento somático, crecimiento de vital importancia, ya que las hifas son las encargadas de micoparasitar al fitopatógeno enemigo.

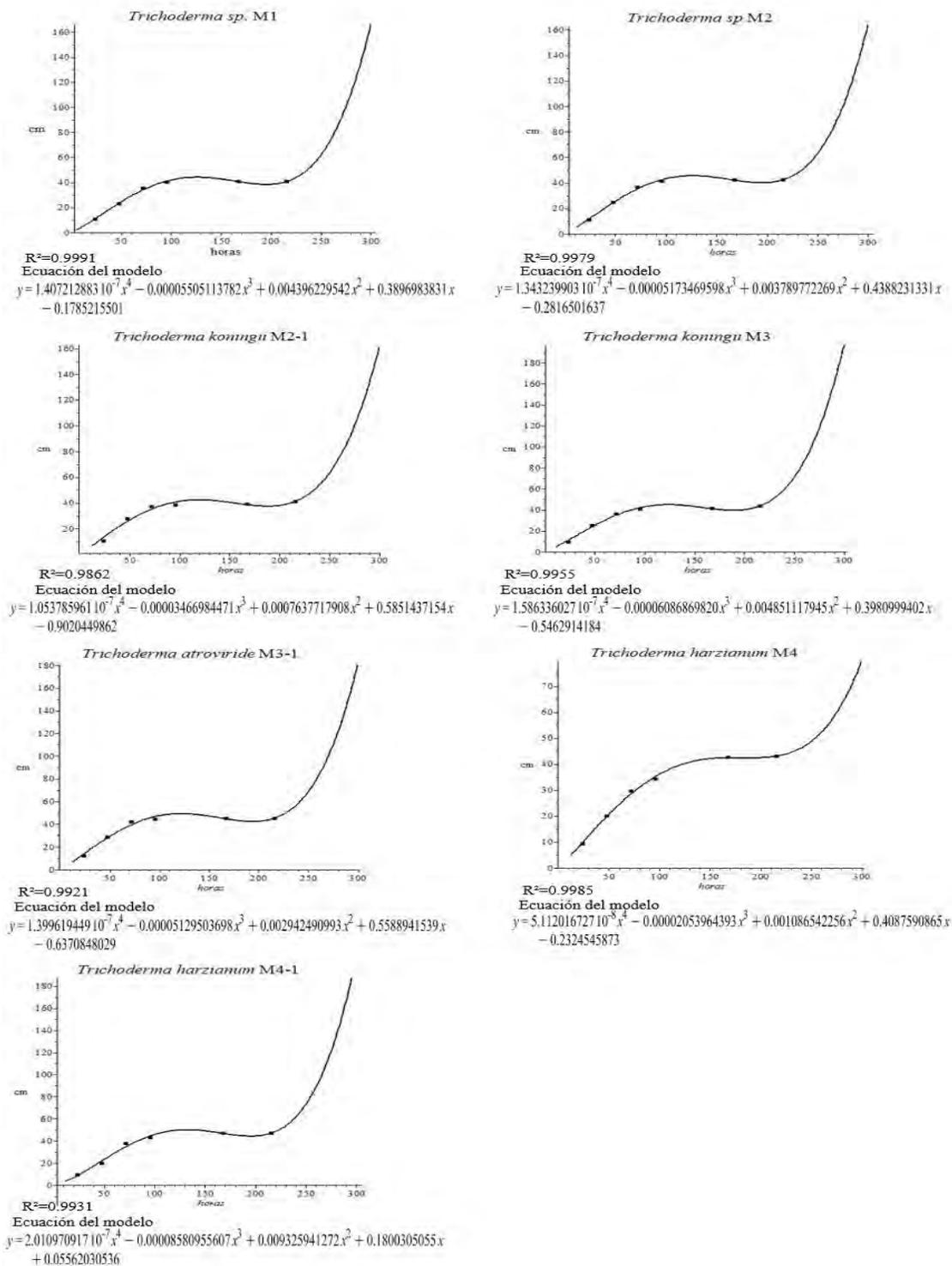
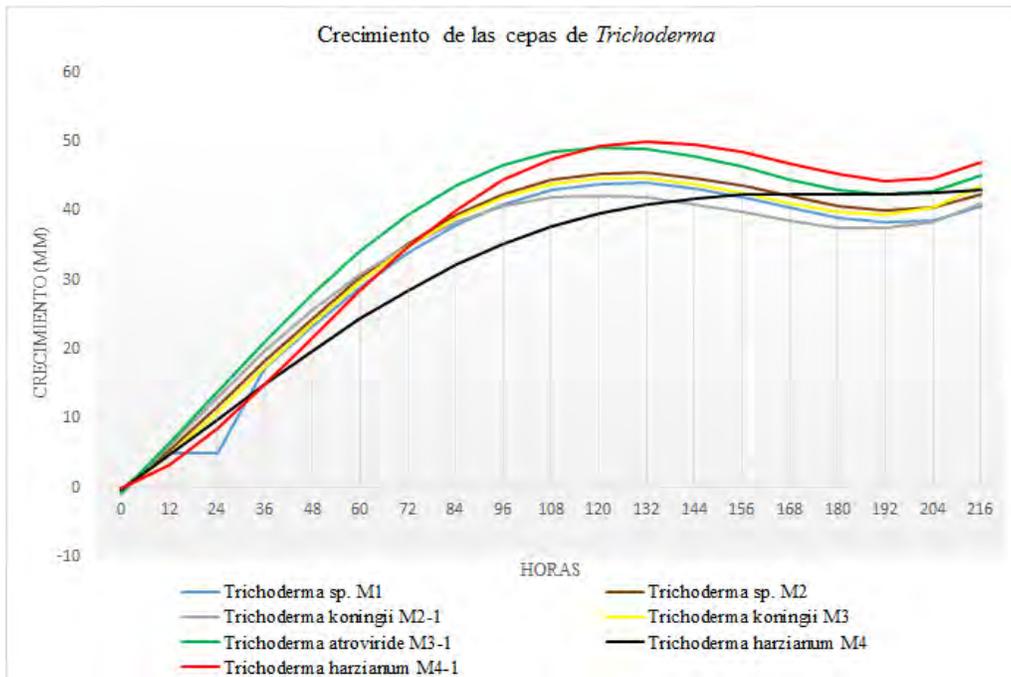
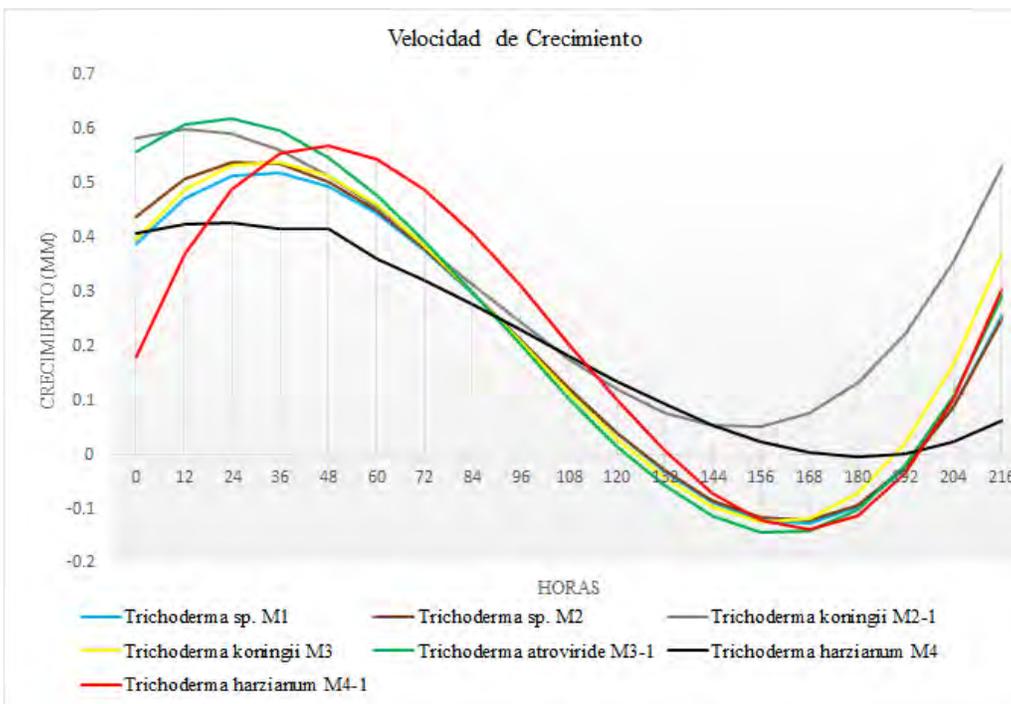


Figura 27. Gráficas de regresión polinómica de las cepas de *Trichoderma*.



MM= milímetros
Figura 28. Gráfica de comportamiento del crecimiento de las cepas de *Trichoderma*.



MM=milímetros
Figura 29. Gráfica de velocidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma*.

3.5 Micro prueba dual.

Al realizar un enfrentamiento en micro prueba dual entre el antagonista *T. harzianum* M4-1 y el fitopatógeno *F. oxysporum*, se encontraron resultados acerca del micoparasitismo que realiza el antagonista en contra del patógeno; se observó a las 48 horas de incubación como el antagonista penetra sus haustorios en las hifas del fitopatógeno, estructuras por donde el antagonista absorbe el contenido del citoplasma, provocando la vacuolización y muerte del hospedero (figura 31), así como el enrollamiento de las hifas de antagonista sobre *F. oxysporum* (figura 32), realizando un estrangulamiento lo cual causa una degradación paulatina de la pared celular a través de los haustorios o apresorios del antagonista. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por González *et al.* 2004, Martínez *et al.* 2008, Suárez *et al.* 2008, Infante *et al.* 2009, Hoyos *et al.* 2012, Castro *et al.* 2015, en diferentes especies de *Trichoderma*.

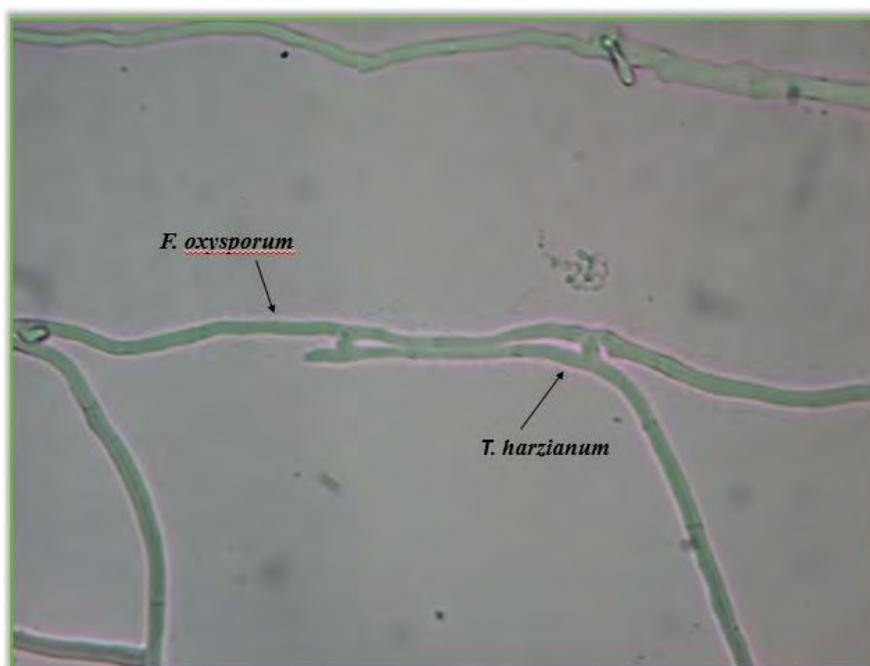


Figura 30. Micoparasitismo de *T. harzianum* M4-1 ante *F. oxysporum*.
Visto en microscopio compuesto Leica ICC50 HD. Graduación (40x)

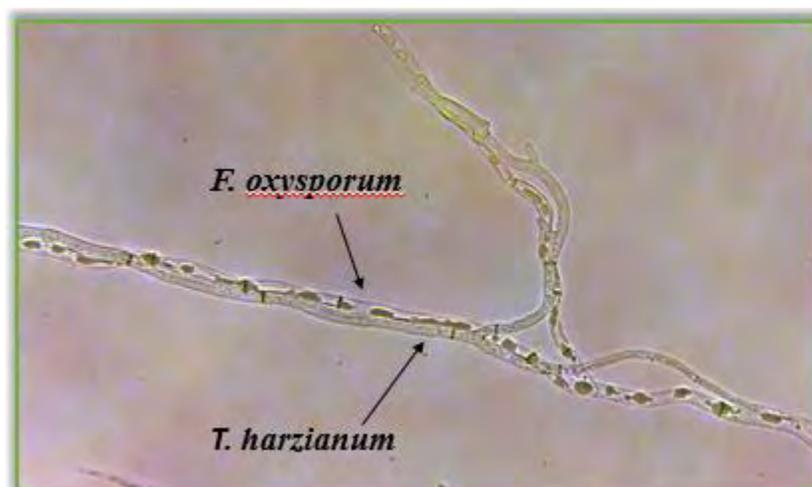


Figura 31. Enrollamiento de las hifa de *T. harzianum* M4-1 sobre *F. oxysporum*.

Visto en microscopio compuesto Leica ICC50 HD. Graduación (40x)

Con base a estos resultados, la cepa *T. harzianum* M4-1 tiene un gran potencial como controlador biológico ante el fitopatógeno *F. oxysporum*, gracias a su mecanismo de acción como micoparásito, además de su velocidad de crecimiento y sus características biológicas. Se necesita más investigación acerca del antagonista para definir si tiene más mecanismos de acción como la antibiosis y cuáles son las sustancias antibióticas que genera, así como definir que enzimas son las encargadas de degradar la pared celular mediante el micoparasitismo.

3.6 Pruebas de control de calidad del biofungicida.

3.6.1 Prueba de viabilidad.

Al realizar la prueba de viabilidad del biofungicida, se realizó un conteo de 98 esporas germinadas por cada cien; es decir, el 98% de viabilidad (Figura 33). Para obtener una viabilidad del cien por ciento, se aumentó la concentración del ingrediente activo de *T. harzianum* M4-1 en razón de la cantidad del vehículo, para obtener así un producto biofungicida con una concentración de 2×10^7 conidias viables/gramo.

3.6.2 Prueba de pureza.

En cuanto a la prueba de pureza, se obtuvo que el biofungicida tiene un 100% de pureza, ya que en las diluciones realizadas, no se presentó ningún crecimiento de algún hongo o bacteria sobre las placas de agar.



Figura 32. Pruebas de calidad del biofungicida.

1. Prueba de viabilidad (Germinación de esporas). 2. Prueba de pureza.

3.7 Prueba *in vivo* con plántulas de tomate.

Para el análisis de las variables longitud de raíz, longitud de follaje y peso seco se utilizaron valores relativos respecto a la longitud de la plántula para las primeras dos, y respecto al peso fresco para la tercera, esto con el fin de controlar las diferencias de magnitud en las distintas observaciones que no necesariamente son atribuibles al tratamiento (Anexo 6).

Es decir, las tres variables analizadas son:

$$\text{Longitud de raíz} = \frac{\text{Longitud de raíz (cm)}}{\text{Longitud de planta (cm)}}$$

$$\text{Longitud de follaje} = \frac{\text{Longitud de follaje (cm)}}{\text{Longitud de planta (cm)}}$$

$$\text{Peso seco} = \frac{\text{Peso seco (g)}}{\text{Peso fresco (g)}}$$

Se inocularon solo diez plántulas de tomate con el fitopatógeno *F. oxysporum*, esto para corroborar que el fitopatógeno causara en las raíces síntomas de enfermedad vistos en la prueba de patogenicidad (Figura 34), los cuales se comprobaron al observar los daños de necrosis causados en las raíces de las plántulas al ser observadas bajo el microscopio.



Figura 33. Síntomas de necrosis en raíz causadas por *F. oxysporum*.

En solo una unidad experimental se observó una muerte por damping-off de una plántula siendo del tratamiento 3 (*F.o+T.h*); al igual se observaron daños en los cuellos de las raíces de algunas plántulas de este mismo tratamiento (Figura 35), debiéndose a que al inocular primero al fitopatógeno este logró causar daño a la raíz, mientras que al inocularlo posterior al antagonista (tratamiento 2) el hongo antagonista no permitió que el patógeno cause daño alguno significativo a la raíz.



Figura 34. Daño en plántulas de tomate del tratamiento 3 (*F.o+T.h*).

3.7.1 Longitud de raíz.

Tabla 16. ANOVA de la longitud de raíz en plántulas de tomate.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Long raíz	30	0.28	0.23	11.02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.03	2	0.01	5.36	0.0110
Tratamiento	0.03	2	0.01	5.36	0.0110
Error	0.07	27	2.4E-03		
Total	0.09	29			

Valor de $p < 0.05$ hay diferencia significativa.

En la tabla 16 se observa que hubo una diferencia significativa entre las longitudes de raíz de los tratamientos, para lo cual se realizó la prueba de separación de media (DMS) con un 95% de probabilidad. (Tabla 17)

Tabla 17. DMS de la longitud de raíz en plántulas de tomate.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.05460

Error: 0.0024 gl: 27

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
F. oxysporum+T. harzianum ..	0.47	10	0.02	A
T. harzianum M4-1+F.oxyspo..	0.46	10	0.02	A B
Testigo	0.41	10	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

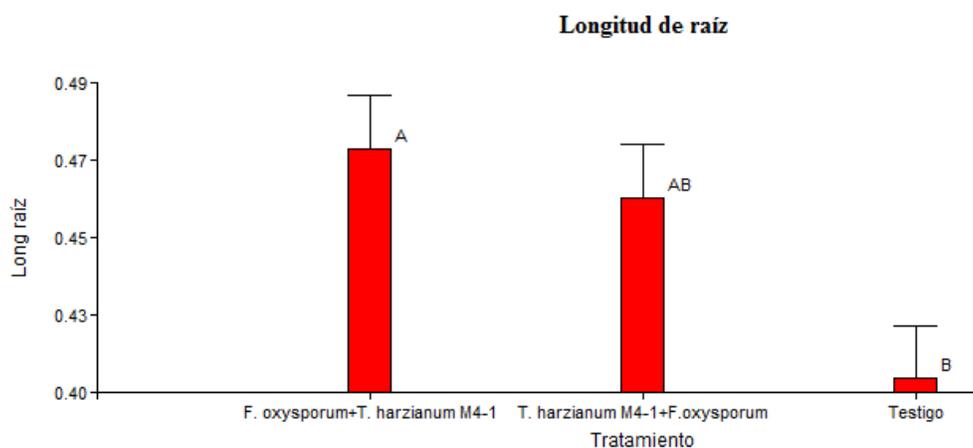


Figura 35. Gráfica de DMS de la longitud de raíz en plántulas de tomate.

En la tabla 17, se observa que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos, separándose en dos grupos (Figura 36), siendo el tratamiento 3

(*F.o+T.h*) y 2 (*T.h + F.o*) donde se tiene el mayor porcentaje de crecimiento de la raíz en función del tamaño de planta con el 47% y 46% respectivamente; sin embargo, en el tratamiento 3 se obtuvo el mayor crecimiento radicular, siendo su contraparte el tratamiento 1 (testigo) en donde se obtuvo el menor tamaño de raíz de plántula. Esto indica que las plántulas al ser tratadas con el biofungicida a base de *T. harzianum* M4-1; además, de controlar el daño de la enfermedad, el antagonista provoca un incremento de crecimiento sobre los tejidos radiculares de la plántula; Jiménez *et al.* 2011 reporta un mayor crecimiento de plantas de tomate al inocular *Trichoderma harzianum*.

3.7.2 Longitud de follaje.

Tabla 18. ANOVA de la longitud de follaje en plántulas de tomate.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Long area verde	30	0.28	0.23	8.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.03	2	0.01	5.36	0.0110
Tratamiento	0.03	2	0.01	5.36	0.0110
Error	0.07	27	2.4E-03		
Total	0.09	29			

Valor de $p < 0.05$ hay diferencia significativa.

En cuanto a la longitud de follaje (tabla 18), se observa que hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, por lo cual se realizó la prueba de separación de media (DMS) con un 95% de probabilidad. (Tabla 19)

Tabla 19. DMS de la longitud de follaje en plántulas de tomate.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.05450

Error: 0.0024 gl: 27

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Testigo	0.59	10	0.02	A
<i>T. harzianum</i> M4-1+F.oxyspo..	0.54	10	0.02	A B
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> ..	0.53	10	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

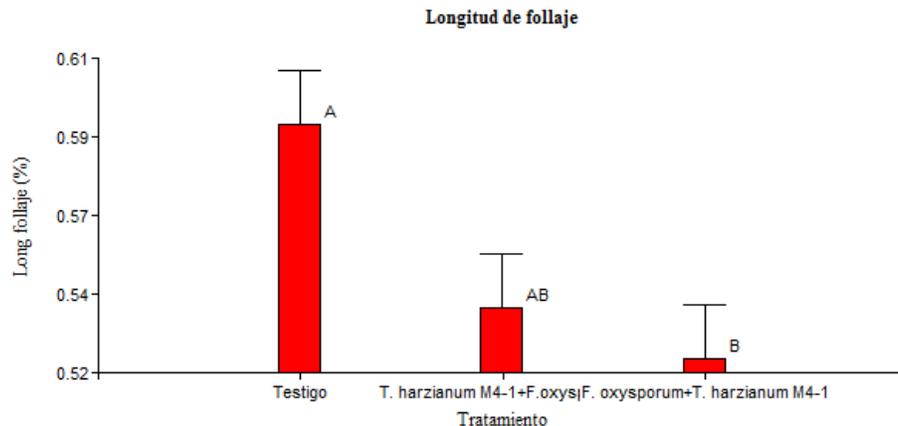


Figura 36. Gráfica de DMS de la longitud de follaje en plántulas de tomate.

En la tabla 19 se observa que hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos al evaluar la longitud de follaje, separándose la medias en dos grupos (Figura 37), siendo el grupo A con el tratamiento testigo, seguido del tratamiento *T.h+F.o* los que obtuvieron el mayor porcentaje de crecimiento de longitud de follaje en función de la longitud de plántula con el 0.59% y 0.54%; sin embargo, el tratamiento testigo fue el que obtuvo el mayor crecimiento de follaje, esto se debe a que en el tratamiento 2 y 3, como la plántula fue inoculada con el fitopatógeno *F. oxysporum* las plántulas se vieron afectadas por el fitopatógeno limitando su crecimiento, a pesar de haber aplicado el biofungicida a base de *T. harzianum* M4-1.

3.7.3 Longitud de plántula.

Con base a la longitud de la plántula, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (Tabla 20). La media más alta en la longitud de plántula fue para el tratamiento *T.h+F.o* con 14.41 cm, seguido del tratamiento *F.o+T.h* con una media de 13.91 cm, y por último el tratamiento testigo con una media de longitud de plántula de 12.80 (Tabla 21). A pesar de no existir diferencia significativa entre los tratamientos, se observa que los tratamientos *T.h+F.o* y *F.o+T.h* tienen una mayor media, por lo cual el crecimiento en estos dos tratamientos es mayor al tratamiento testigo, lo cual nos indica que la aplicación del biofungicida a base de *T. harzianum* M4-1 beneficia en la longitud de plántula.

Tabla 20. ANOVA de longitud de plántulas de tomate.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Long planta	30	0.10	0.03	15.55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.56	2	6.78	1.49	0.2425
Tratamiento	13.56	2	6.78	1.49	0.2425
Error	122.58	27	4.54		
Total	136.15	29			

Valor de $p < 0.05$ hay diferencia significativa.

Tabla 21. Resumen de medias de longitud de plántulas de tomate.

Tratamiento	Variable	n	Media
F. oxysporum+T. harzianum ..	Long planta	10	13.91
T. harzianum M4-1+F.oxyspo..	Long planta	10	14.41
Testigo	Long planta	10	12.80

3.7.4 Peso seco de plántulas.

Tabla 22. ANOVA del peso seco de plántulas de tomate.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso seco	30	0.07	3.7E-05	11.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.9E-04	2	9.4E-05	1.00	0.3809
Tratamiento	1.9E-04	2	9.4E-05	1.00	0.3809
Error	2.5E-03	27	9.4E-05		
Total	2.7E-03	29			

Valor de $p < 0.05$ hay diferencia significativa.

En la tabla 22 del ANOVA de peso seco de plántulas de tomate se observa que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos. No obstante, el tratamiento con mayor porcentaje de biomasa en peso seco en función del peso fresco es el tratamiento 3 y el tratamiento 2 con el 8%, mientras que el tratamiento testigo tiene un porcentaje de peso del 9% en función del peso fresco del tratamiento testigo (Tabla 23). Estos resultados indican que las plántulas inoculadas tanto del fitopatógeno como del antagonista tuvieron un mayor desarrollo de biomasa y por lo tanto un mayor crecimiento y desarrollo de plántula, aunque no fue el crecimiento tan marcado para ser estadísticamente significativo.

Se necesita más tiempo e información para conocer si el biofungicida permite un desarrollo y crecimiento de planta mayor cuando la planta se encuentre en una etapa fenológica más avanzada, o si por su parte el fitopatógeno *F. oxysporum* causa un daño mayor en la plántula y se viera reflejado en la biomasa al evaluar el peso seco.

Tabla 23. Resumen de medias de peso seco de plántulas de tomate.

Tratamiento	Variable	n	Media
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> ..	Peso seco	10	0.08
<i>T. harzianum</i> M4-1+ <i>F.oxyspo</i> ..	Peso seco	10	0.08
Testigo	Peso seco	10	0.09



Figura 37. Plántulas de los tres diferentes tratamientos (de izquierda a derecha tratamiento 1, 2 y 3 respectivamente).

En resumen el biofungicida hecho a base de la cepa *T. harzianum* M4-1, contrarresta la enfermedad del damping-off al aplicarlo como un preventivo, y no como un control correctivo de enfermedad al tener ya las plantas enfermas. Lo anterior se observó al no encontrar ningún síntoma o signo de la enfermedad significativo en el tratamiento 2, donde primero se aplicó el biofungicida y posteriormente a los 20 días se inoculó el fitopatógeno *F. oxysporum*; mientras que en el tratamiento 3, se observó una muerte de plántula con síntomas de estrangulamiento y pudrición del tallo, así como síntomas de necrosis en el cuello del tallo causados por el fitopatógeno *F. oxysporum*.

Por otra parte, la aplicación del biofungicida sobre las plántulas de tomate demostró que se induce un crecimiento radicular, ya que en el tratamiento dos y tres, donde se aplicó el biofungicida a base de *T. harzianum* M4-1 se notó un incremento de longitud en la parte

radical, así como en la longitud de follaje de la plántula a pesar de no haberse encontrado diferencia estadística significativa al evaluar esta variable, pero en los tratamientos donde hubo aplicación de este biofungicida se obtuvieron las mayores medias de longitud de follaje. Esta investigación concuerda con las desarrolladas por González *et al.* 2004 donde reporta un crecimiento radicular y mayor desarrollo de biomasa en plántulas de tomate al ser inoculadas con el hongo *Trichoderma harzianum*; Cubillos *et al.* 2009, encontró resultados similares al realizar inoculaciones del hongo antagonista *T. harzianum* en plántulas de maracuyá.

Con lo anterior se demuestra que el biofungicida a base de *Trichoderma harzianum* M4-1 induce un mayor crecimiento y desarrollo en plántulas de tomate al ser inoculado, así como un control al fitopatógeno del suelo *F. oxysporum* siendo aplicado como un preventivo de enfermedades, gracias al mecanismo de acción de micoparasitismo demostrado en las micro pruebas duales hacia el fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Es importante realizar más investigación a nivel *in vitro* en laboratorio sobre este antagonista para conocer la capacidad de controlador biológico hacia otras especies de fitopatógenos del suelo, y probar su eficacia en pruebas *in vivo* con estas otras especies de fitopatógenos, así mismo conocer acerca del comportamiento de la planta en etapas fenológicas más avanzadas y con mayor número de aplicaciones del biofungicida, y su eficacia en otros cultivos; puntos importantes que sientan las bases para etapas más avanzadas de esta investigación y así poder llevar el prototipo a una etapa de comercialización.

Conclusiones.

- En la colecta de suelo realizada en tres diferentes comunidades del municipio Coatepec Harinas se aislaron e identificaron siete cepas del antagonista *Trichoderma* y cuatro cepas del fitopatógeno *Fusarium*.
- La cepa patogénica y con mayor virulencia en plántulas de tomate fue la de *Fusarium oxysporum*.
- El hongo fitopatógeno *F. oxysporum* está asociado a la “marchitez de planta” en las localidades estudiadas del municipio Coatepec Harinas, Estado de México.
- Las cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de las localidades estudiadas del municipio Coatepec Harinas, ofrecen clase 2 y 3 de control en pruebas *in vitro* según la escala de Bell *et al.* (1982) a los 10 días de evaluación.
- La cepa de *Trichoderma* con mayor potencial de controlador biológico con base a las pruebas *in vitro* fue la de *Trichoderma harzianum* M4-1.
- Se acepta que la cepa *T. harzianum* M4-1, con la cual se formuló el prototipo de biofungicida controla la enfermedad de damping off causada por el fitopatógeno *F. oxysporum* en plántulas de tomate, además de promover el crecimiento radicular y vegetativo en plántulas de tomate.
- El prototipo de biofungicida a base de la cepa *T. harzianum* M4-1 ofrece una concentración de 2×10^7 conidias viables/gr, con una pureza del 100%.

Literatura citada.

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5a ed. Academic Press, Inc. California, USA. 882 p.
- AGROPULI. 2013. Tierra Diatomeas. Obtenido de ficha técnica. en: <http://www.agropuli.com.co/fichatecniproducto.pdf>. Consultado el 18 de Marzo del 2016.
- Alomar, O. y Albajes, R. 2005. Control biológico de plagas: biodiversidad funcional y gestión del agroecosistema. *Biojournal*. 1:1-10.
- Álvarez, Z. R. y Delgadillo, S. F. 2004. Enfermedades del tomate y chile. Memorias del IV simposio nacional de horticultura. Invernaderos: diseño, manejo y producción. Coahuila, México. pp. 70-84.
- Ames, de I, T. 1997. Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú. pp. 9-10.
- Apodaca, S, M.A., Zavaleta, M, E., García, E, R., Osada, K, S. y Valenzuela, U, J.G. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1):1-7.
- Arbeláez, T. G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*. 17:11-22.
- Ascencio, A, A., López, B, A., Borrego, E, F., Rodríguez, H, S.A., Flores, O, A., Jiménez, D, F. y Gámez, V, A.J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26(2):114-120.
- Atanasova, L., Druzhiniana, I. S. y Jaklitsch, W, M. 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular Phylogeny. en: Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M. y Schmoll, M. *Trichoderma*. Biology and Applications. Boston, USA. CAB International. pp. 10-43.
- Ayala, Z. M.A., Montesinos, R. M. y Berlanga P. A. 2012. Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-27. pp. 1-4.
- Barnett, H.L. and Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. MACMILLAN PUBLISHING COMPANY. New York, USA. pp. 7-39.
- Bautista, C.J., Espinosa, G.R., Moreno, J.P., Mejía, E.Z., Belmont, M.R. y Cerrato, F.R. 2008. Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *Interciencia* 33(2):96-102.

- Bell, D. K., Wells, H. and Markham, C. 1982. *In vitro* Antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72(4):379-382.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, C. A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
- Berlanga, P., A., y Hernández, V., V. 2003. Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha técnica CB-23. 4 p.
- Bettiol, W., Rivera, C. M., Mondino, P., Montealegre, A. J, y Colmenárez, Y. C. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. en: http://ugi.espe.edu.ec/ugi/wp-content/uploads/2014/05/Control_biologico_de_enfermedades_de plantas_en_America_Latina_y_el_Caribe_2014.pdf. pp. 5-6.
- Biofabrica. 2012. Más del 20% de agroquímicos prohibidos en México se utilizan en el campo. en: <http://www.biofabrica.com.mx/blog/?p=977>. Consultado el 15 de Mayo del 2016.
- Cahuache, C. E. 2001. Los pueblos indígenas, actores insustituibles. en. Nivia, E. y Gomero, L. 2001. Cultivos ilícitos y guerra biológica. Lima, Perú. Editorial gráfica STEFANY. pp. 25-32.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. pp. 29-32.
- Casado, G. C., Torrico, C. G. y Medina, A. M. 2012. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. en: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>. Consultado 20 de Febrero del 2016.
- Castellanos, G., Jara, C., y Mosquera, G. 2011. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Guía práctica 4 *Fusarium oxysporum*. Centro Internacional de Agricultura Trópica (CIAT). Cali, Colombia. pp. 2-31.
- Castro, R., Pesántez, M., Flores, V., Díaz, C., Castrol, L. y Alvarado, Y. 2015. Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa cultivo. *Protección Vegetal*. 30(2):133-138.
- Centro de educación y tecnología. 2004. Manual. Producción y utilización de *Trichoderma*. Fundación para la innovación agraria. Santiago de Chile, Chile. 26 p.
- CONEVAL (Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social). 2010. Medición de la Pobreza. Coatepec Harinas, México. en: <http://www.coneval.gob.mx/Medicion/Paginas/Medici%C3%B3n/Informacion-por-Municipio.aspx>. Consultado el 30 de Septiembre del 2015. Consultado el 10 de Enero del 2016.

- Cubillos, H. J., Valero, N. y Mejía, L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*. 27(1): 81-86.
- Cuervo, U. Y., Espadas, R. M. y Zita, P. G. 2012. Manual de Laboratorio de Fitopatología. Universidad Nacional Autónoma de México. 46 p.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, G. A. and Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*. 47:55-64.
- Echandi, E. 1971. Manual de laboratorio para fitopatología general. Herrero Hermanos, sucesores S.A. México, D.F. pp. 13-31.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma spp.* on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Scanning Electron Microscopy and Fluorescence Microscopy*. *Phytopathology*. 73(1):85-88.
- EOL (Encyclopedia of Life). 2014. *Fusarium oxysporum*. en: http://www.eol.org/data_objects/31749302. Consultado el 18 de Mayo del 2016.
- Erwin D.C. y Ribeiro O.K., 1996. *Phytophthora*. Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. pp. 145
- Estrada, P. J. 2012. Guía para la construcción de invernaderos o fitotoldos. FAO. Bolivia. pp. 9-15.
- Ezziyyani, M., Pérez S. C., Sid. A. A., Requena M.E. y Candela, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. pp. 35-45
- FAO. 2003. Manejo Integrado de Enfermedades. FAO. Chile. pp. 52-53.
- FAO. 2013. Los biopreparados para la producción de hortalizas en la agricultura urbana y periurbana. FAO. pp. 23-30.
- FAO. 2015. Producción mundial de tomate para el año 2013. en: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Consultado el 14 de Enero del 2016.
- FAO. 2016. FAOSTAT. en: <http://faostat3.fao.org/download/R/RP/E>. Consultado el: 9 de Julio del 2016.
- Fernández, M. E., Jaimes, M. P., Sánchez, G. D., Chora, P. G. y Hernández, H. V. 2015. Diversidad de *Fusarium* en la raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Micología*. 42:33-43.

- Fernández, O. y Vega, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 62:96-100.
- Ferrera, C. R. y Alarcón, A. 2010. Microbiología Agrícola. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México. 566 p.
- Figuroa, R. M. G., Guerrero, A. B. Z., González, M. M., Pons, H. J. L., Jiménez, B. J. F., Ramírez, P. J. G., Andrio, E. E. y Mendoza, E. M. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de Maíz en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 28(2):124-134.
- Fox, R. T. V. 1993. Principles of diagnostic techniques in plant pathology. CAB International. UK at the University Press, Cambridge. pp. 37-52.
- Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. en: Kubicek, C. P. y Harman, G. E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Londres, Inglaterra. Taylor and Francis. pp. 8-14.
- Garcés, G. E., Orozco, A. M., Bautista, R. G. y Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana. 6(1):7-25.
- Gómez, J. R., Hernández, F. L., Cossio, V. L., López, A. G. y Sánchez, L. R. 2011. Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. Folleto técnico número 19. Inifap, Centro de investigación Regional del Pacifico Centro. Nayarit, México. 78 p.
- González, A. A., Mateos, R. A., López, M. M., Hernández, S. M. y González, C. A. 2013. Alternativas para el manejo de Damping off en plántulas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (L,1753) (Solanales: *Solanaceae*). Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan. 1(1): 1-10.
- González, R., Montealegre, J. y Herrar, R. 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma spp.* Ciencia e Investigación Agraria. 31:21-28.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales L. y Olivar, R. 2008. Control Biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Academia 7(13):50-74.
- Hernández, F. N. 2011. Prospección de cepas nativas con potencial de control biológico aisladas de suelos infestados con “secadera” del chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Ingeniería Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, México. pp. 59-87.
- Hernández, M. R., López, B. A., Borrego, E. F., Espinoza, V. J., Sánchez, A. D., Maldonado, M. E. y López, O. A. 2014. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 5(7):1169-1178.

- Hernández, O. D., Rodríguez, M.G., Peteira, B., Miranda, I., Arias, Y. y Martínez, B. 2015. Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Protección Vegetal*. 30(2):139-147.
- Holliday, P. 1980. *Fungus diseases of tropical crops*. General Publishing Company. Toronto, Canada. pp. 163-196.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1):4-10.
- Hoyos, C. L. y Bissett, J. 2012. *Trichoderma*: especialidad variabilidad y usos. en Hoyos, L.M. 2012. *Enfermedades de plantas: control biológico*. Bogotá. Ecoe Ediciones: Universidad Nacional de Colombia. pp. 11-29.
- Hoyos, H. H., Rueda, E. A. y Gilchrist, R. E. 2012. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. *Actual Biol*. 34(96):103-112.
- Hoyos, L.M. 2012. Conceptos generales en manejo biológico de fitopatógenos. en Hoyos, L.M. 2012. *Enfermedades de plantas: control biológico*. Bogotá. Ecoe Ediciones: Universidad Nacional de Colombia. pp. 1-10.
- IGCEM (Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México). 2013. Estadística básica municipal. Coatepec Harinas, México. en: <http://iiiigecem.edomex.gob.mx/recursos/Estadistica/PRODUCTOS/AGENDAESTADISTICA/CABASICAMUNICIPAL/ARCHIVOS/Coatepec%20Harinas.pdf>. Consultado el 28 de Septiembre del 2015.
- INAFED.2010, Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Estado de México: Coatepec Harinas. en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/index.html>. Consultado el 20 de Septiembre del 2015.
- INEGI. 2009, Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Coatepec Harinas, México. en: <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/compendio.aspx>. Consultado el 21 de Septiembre del 2015.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*. 24(1):14-21.
- Jiménez, C., Sanabria de Albarracín, N., Altuna, G. y Alcano, M. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia*. 28:1-10.
- Juárez, L. P. Bugarín, M. R., Castro, B. R., Sánchez, M. L., Cruz, C. E., Alejo, S. G. y Balois, M. R. 2011. Estructuras utilizadas en la agricultura protegida. *Revista Fuente*. 3(8):21-27.

- Kubicek, P. C. and Harman, E. G. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis. USA. pp. 1-133.
- Lardizabal, R. 2007. Manual de producción. Producción de plántulas en bandejas. EDA (Entrenamiento y desarrollo de agricultores). Honduras. 20 p.
- Leslie, F. J. y Summerell, A. B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Professional. Iowa, U.S.A. 278 p.
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. y Cruz. A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia sp.* en arroz. *Protección Vegetal*. 23(2): 118-125.
- Mondragón, S., L. 2007. Producción de tomate en invernadero. Gobierno del Estado de México, ICAMEX, SAGARPA. Metepec, Estado de México. 50 p.
- Montesinos, M., R., Ayala, Z., M. y Berlanga, P., A. 2015. Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. pp. 41-48.
- Morales, M. A. y Payán, O. S. 2010. Agricultura protegida. Mallas plásticas. inifap. Fundación Produce Baja California. Desplegable para productores núm. 21.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Consultado el 26 de Febrero del 2016.
- Nelson, E. P., Toussoun, A. T., and Marasas, O. F. 1983. *Fusarium species: an Illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press. pp. 193.
- Nuño, M. R. 2007. Manual de producción de tomate bajo condiciones de invernadero para el valle de Mexicali, Baja California. Fundación produce. Gobierno del estado de Baja California. 26 p.
- Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable (OIEDRUS). 2011. Inventario Nacional de Agricultura protegida. en: www.oeidrus-bc.gob.mx/...bca/.../AGRICULTURA%20PROTEGIDA.xls... Consultado el 10 de Enero del 2016.
- Pal, K.K. and McSpadden, G. B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. 10:1-25.
- Paredes, D., Campos, M. y Cayuela, L. 2013. El control biológico de plagas de artrópodos por conservación: técnicas y estado del arte. *Ecosistemas*. 22(1):56-61.
- Pérez, M. I. 2009. Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma spp.* nativos del norte de Tamaulipas. Tesis de ciencias en biotecnología genómica. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, Tamaulipas. pp. 37-39.

- Perveen, K. and Bokhari, N. A. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. African Journal of Microbiology Research. 6(13) pp. 3348-3353.
- PLM. 2012. Diccionario de especialidades agroquímicas. PLM México S.A. de C.V. México. D.F. pp. 675.
- Productores de hortalizas. 2006. Plagas y enfermedades del tomate. Guía de identificación y manejo. Meister Media. León Guanajuato, México. 23p
- Quiroz, S, V., Ferrera, C. R., Alarcón, A. y Lara, H. M. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo de ajo. Revista Mexicana de Micología. 26:27-34.
- Ramírez, V, J. y Saíenz, R. R. 2010. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 2a ed. Once Ríos Editores. Sinaloa, México. 391 p.
- Reveles, H. M., Huchín, A. S., Velásquez, V. R., Trejo, C. R. y Ruíz, T. J. 2010. Producción de plántula de chile en invernadero. INIFAP. Campo experimental valle de Guadiana, Durango. México. 38 p.
- Romero, A. 31 de Enero del 2013. La inocuidad, el reto. El Economista. Agroiinteligente. pp. 11.
- SAGARPA. 2012. Agricultura protegida. en: <http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura-Prottegida2012.aspx>. Consultado el 10 de Enero del 2016.
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research. 100(8):923-935.
- SEDESOL (Secretaria de Desarrollo Social). 2013, Unidad de Microrregiones. Cédulas de Información Municipal. Coatepec Harinas, México. en: <http://www.microrregiones.gob.mx/zap/datGenerales.aspx?entra=nacion&ent=15&mun=021>. Consultado el 28 de Septiembre del 2015.
- SFA (Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios). 2010. Monografía de cultivos. Tomate. SAGARPA. en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/pablo/documentos/monografias/tomate.pdf>. Consultado el 10 de Abril del 2016.
- SIAP. 2016. Cierre de la producción agrícola por estado. en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. Consultado el 10 de Abril del 2016.
- Silva, V. M. 2011. Hongos asociados a *Thypha domingensis* Pers. Tule en canales de riego de tres regiones de México. Tesis de Ingeniería Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, México. pp. 7-9.

Sivila, N. y Álvarez, S. 2013. Producción artesanal de *Trichoderma*. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar. Universidad Nacional de Jujuy. San Salvador de Jujuy, Argentina. 44 p.

SMN. 2010, Servicio Meteorológico Nacional. Normales Climatológicas, Estado de México, Coatepec Harinas. en: http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75. Consultado el 21 de Septiembre del 2015.

SNIM (Sistema Nacional de Información Municipal). 2010. Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal. Coatepec Harinas, México. en: <http://www.snim.rami.gob.mx/>. Consultado el 30 de Septiembre del 2015.

Suárez, M. C., Fernández, B. R., Valero, N. O., Gámez, C. R., y Páez, R. A. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología. 10(2): 35-43.

The University of Adelaide. 2016. Mycology online. *Fusarium* sp. en: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/) Consultado el 19 de Marzo del 2016.

Ulloa, M. y Hanlin, R. T. 2006. Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 672 p.

Universidad de Almería. (Sin año). Myco-UAL. Filo Ascomycota. Área de Botánica. en: <http://www.ual.es/GruposInv/myco-ual/ascos.htm>. Consultado el 16 de Mayo del 2016.

Van, D. R. G., Hoddle, M. S., Center, T. D. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. U.S. Department of Agriculture (USDA). Washington, D. C. pp. 467-514.

Velasco, H. E., Nieto, A. R., y Navarro, L. E. 2011. Cultivo del tomate en hidroponía e invernadero. UACH, Mundi-Prensa. México. 125 p.

Villacide, J. y Corley, J. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. Serie técnica: Manejo integrado de plagas forestales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. pp. 1-7.

Watanabe, T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC PRESS. Washington, U.S.A. pp. 218-219.

Zavaleta, M. E., Braco, L. L. y Guigón, L. C. 2015. Fitopatógenos con origen en el suelo. en Arredondo, B. H. C. y Rodríguez, B. L. A. 2015 Casos de control biológico en México. Printing arts México. Guadalajara, México. pp. 65-93.

Anexos.

Anexo 1. Normales Climatológicas de la estación Coatepec Harinas.

Servicio Meteorológico Nacional													
Normales climatológicas													
Estado de: México				Periodo: 1981-2010									
Estación: 00015016 Coatepec Harinas													
Latitud: 18°55'23" N				Longitud: 099°45'58" W				Altura: 2,270.0 msnm.					
Elementos	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Anual
Temperatura Máxima													
Normal	21.7	22.9	24.9	26.1	25.7	23.4	22.3	22.3	22.5	23.1	23.0	22.2	23.3
Máxima mensual	24.7	26.4	28	27.8	27.7	27.3	25	27.0	26.8	28.9	27.5	26.9	
Año de máxima	2004	2005	2006	1998	2010	1999	2003	2009	2008	2010	2007	2006	
Máxima diaria	29	29.5	29.5	29.5	31	30	28.5	28.5	28.5	31.0	35.0	29.0	
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Temperatura media													
Normal	13.0	14.0	15.8	17.5	17.8	17.1	16.4	16.7	16.7	16.1	14.8	13.7	15.8
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Temperatura mínima													
Normal	4.3	5.2	6.8	8.9	10.0	10.8	10.5	11.1	10.8	9.1	6.7	5.3	8.3
Mínima mensual	2.3	1.7	3.1	6.4	7.0	6.4	5.2	9.4	8.2	6.3	4.4	3.3	
Año de mínima	2005	1998	1986	1987	2005	1987	1987	1986	1987	1987	2007	2004	
Mínima diaria	-5.0	-2.0	-3.5	3.0	5.0	4.0	4.0	5.5	5.0	0.0	-0.3	0.0	
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Precipitación													
Normal	13.2	12.7	12.2	30.7	99.9	215.8	217.2	208.0	222.7	98.2	19.4	12.0	1,162.0
Máxima mensual	117.5	61.0	70.0	143.5	229.0	389.1	489.4	356.5	732.5	223	61.5	57.5	
Año de máxima	1992	1992	2001	2001	2006	1981	2010	1988	2008	2008	2006	2009	
Máxima diaria	43.0	30.0	47.0	73.0	67.5	60.5	88.0	68.0	71.5	59.5	24.0	29.0	
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Evaporación total													
Normal	104.0	117.4	154.7	162.6	145.0	98.1	108.8	97.1	81.1	96.0	92.8	88.1	1,345.7
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Número de días con lluvia													
Lluvia	1.7	2.0	2.1	4.2	11.5	18.8	19.8	21.4	20.0	11.0	3.4	1.7	117.6
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Niebla	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.6
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Granizo	0.0	0.0	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	1.3
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	
Tormenta eléctrica	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	0.7	0.2	0.3	0.6	0.0	0.0	0.0	2.3
Años con datos	26	26	26	24	24	25	25	24	25	24	23	24	

Fuente: SMN, 2010.

Anexo 2. Datos de toma de muestras.

Toma de muestras del suelo					
+Datos generales					
Numero de muestra	M1				
Estado	Edo. México	Municipio	Coatepec Harinas	Comunidad	Ixtlahuca de Villada
Fecha	02 de Septiembre del 2014				
Coordenadas geográficas	N18°55.403' WO 99°48.501'				
Altitud	2191 msnm				
+Características de la muestra					
Suelo genérico (uso actual del suelo)	Suelo Agrícola				
Profundidad	10 -15 cm				
Vegetación asociada	-----				
+Para suelos de uso agrícola					
Especie cultivada	Jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)				
Tiempo por el que se ha cultivado dicha especie	-----				
Rendimiento	130 cajas /Ha al corte				
Presencia de enfermedades(nombre y periodo en el que se presenta)	Botrytis (Presentándose en épocas de lluvia, donde predomina alta humedad y hay días nublados). Marchitamientos (Por fusariosis). Amarillamiento de hojas.				
Historial de plaguicidas	Promyl, Ridomil, Cercobin, Busan 30.				
Manejo general del suelo	Esterilización del suelo con productos químicos al preparar el terreno para establecer una nueva plantación.				
Notas	La plantación es a partir de trasplante, se manda a producir la plántula.				

Toma de muestras del suelo					
+Datos generales					
Numero de muestra	M2				
Estado	Edo. México	Municipio	Coatepec Harinas	Comunidad	Chiltepec
Fecha	02 de Septiembre del 2014				
Coordenadas geográficas	N18°55.070' WO99°48.890'				
Altitud	2347 msnm				
+Características de la muestra					
Suelo genérico (uso actual del suelo)	Suelo Agrícola				
Profundidad	10-15 cm				
Vegetación asociada	-----				
+Para suelos de uso agrícola					
Especie cultivada	Jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)				
Tiempo por el que se ha cultivado dicha especie	-----				
Rendimiento	130 cajas/Ha al corte				
Presencia de enfermedades(nombre y periodo en el que se presenta)	Amarillamiento de hojas. Botrytis (Presentándose en época de lluvias con días nublados). Marchitamientos.				
Historial de plaguicidas	Cupravit (Aplicado a dosis recomendada por el producto químico para combatir Botrytis, se realiza aplicación foliar en el signo de la enfermedad). Promyl (Aplicado al suelo)				
Manejo general del suelo	Esterilización del suelo con productos químicos. Aplicación de cal en zonas donde se localizan marchitamientos.				
Notas	Riego por goteo, dos veces por semana. La polinización la realizan a través de aire con aspiradoras de mano, esto puede ocasionar que se diseminen o dispersen a demás plantas esporas de Botrytis.				

Toma de muestras del suelo					
+Datos generales					
Numero de muestra	M3				
Estado	Edo. México	Municipio	Coatepec Harinas	Comunidad	Chiltepec
Fecha	02 de Septiembre del 2014				
Coordenadas geográficas	N18°54.911' WO99°49.983'				
Altitud	2372 msnm				
+Características de la muestra					
Suelo genérico (uso actual del suelo)	Suelo Agrícola				
Profundidad	10-15 cm				
Vegetación asociada	-----				
+Para suelos de uso agrícola					
Especie cultivada	Jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)				
Tiempo por el que se ha cultivado dicha especie	-----				
Rendimiento	130 cajas/Ha al corte				
Presencia de enfermedades(nombre y periodo en el que se presenta)	Botrytis(En épocas de lluvia y con días nublados). Marchitamientos.				
Historial de plaguicidas	Cupravit (Aplicado a dosis recomendada por la etiqueta del producto para el control de Botrytis). Promyl (Aplicado al suelo).				
Manejo general del suelo	Esterilización del suelo con productos químicos. Aplicación de cal en zonas donde se localizan marchitamientos.				
Notas	Riego por goteo. Polinización por viento a través de aspiradoras.				

Toma de muestras del suelo					
+Datos generales					
Numero de muestra	M4				
Estado	Edo. México	Municipio	Coatepec Harinas	Comunidad	Acuitlapilco
Fecha	02 de Septiembre del 2014				
Coordenadas geográficas	N18°54.930' WO99°46.982'				
Altitud	2226 msnm				
+Características de la muestra					
Suelo genérico (uso actual del suelo)	Suelo Agrícola				
Profundidad	10-15 cm				
Vegetación asociada	-----				
+Para suelos de uso agrícola					
Especie cultivada	Jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)				
Tiempo por el que se ha cultivado dicha especie	-----				
Rendimiento	130 cajas/Ha al corte				
Presencia de enfermedades(nombre y periodo en el que se presenta)	Botrytis, marchitamientos, amarillamiento de hojas, virus manchado del tomate.				
Historial de plaguicidas	Talonil, Cupravit, Ridomil, Promyl.				
Manejo general del suelo	Esterilización del suelo con productos químicos al establecer una nueva plantación. Riego por goteo.				
Notas	Invernaderos pegados a la zona boscosa, rodeados de árboles y plantas silvestres, las cuales pueden ser hospederos de diversas enfermedades y así infectar a las plantas cultivadas.				

Anexo 3. Medios de cultivo.

- **PDA (papa-dextrosa-agar).**

-PDA (formulado comercial) 39 gr/litro.

-Agua destilada 1000 ml.

-Antibiótico cloranfenicol 200 µg/ml.

Adicionar el polvo PDA al agua destilada y agitar hasta disolver el medio, agregar el antibiótico y posteriormente esterilizar durante 20 minutos en autoclave a 121°C.

- **V8 agar (jugo de ocho verduras-agar).**

-300 ml de jugo V8 (marca HERDEZ).

-700 ml de agua destilada.

-Agar bacteriológico 15 gr/litro.

-Antibiótico cloranfenicol 200 µg/ml.

Mezclar el jugo V8 con el agua destilada; ajustar el ph en un rango de 5.5-6.5, usando 1M NaOH. Una vez ajustado el ph adicionar el agar bacteriológico y el antibiótico. Esterilizar durante 20 minutos en autoclave a 121°C. (Cuervo *et al.* 2012)

- **Medio Komada's.**

-D-Galactose 20 gr.

-L-Asparagine 2 gr.

-KH₂PO₄ 1 gr.

-KCL 0.5gr.

-MgSO₄·7H₂O 0.5 gr.

-PCNB (Pentachloronitrobenzene) 750 mg.

-Fe₃Na EDTA 10 mg.

-Agua destilada 1000 ml.

-Agar bacteriológico 15 gr/litro.

-Antibiótico cloranfenicol 200 µg/ml.

Adicionar uno a uno los reactivos y agitar hasta disolver; antes de adicionar el agar bacteriológico ajustar el ph a 3.8±0.2, una vez ajustado el ph adicionar el agar bacteriológico y el antibiótico. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121°C. (Leslie y Summerell, 2006)

- **Medio CLA (clavel-leaf-agar)**

- Agar 15 gr/litro.
- Agua destilada 1000 ml.
- Hoja de clavel.
- Antibiótico cloranfenicol 200 µg/ml.

Cortar las hojas de clave de 5 a 8 mm² y posteriormente desinfectarlas con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, posteriormente lavar con agua destilada estéril, repitiendo el lavado con hipoclorito y con agua destilada dos veces. Una vez lavados los trozos de hoja de clavel se dejan secar sobre papel filtro estéril sobre la campana de flujo laminar o en algún lugar aséptico. Las hojas se deben de deshidratar en estufa a 70°C durante 3 horas. Mezclar el agar con el agua destilada y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Ya esterilizado el agar y cuando este tibio vaciar el medio en las caja de Petri y colocar de 5 a 10 cuadritos de hoja de clavel por placa de 90 mm de diámetro separados uno de otros; dejar enfriar el medio y mantener a temperatura ambiente durante 3 a 4 días para verificar que no haya desarrollo de hongos sobre las hojas de clavel.

Las hojas de clavel deben de ser cosechadas de plantas jóvenes en crecimiento y que no hayan sido tratadas con aplicaciones de plaguicidas. (Leslie y Summerell, 2006)

- **Medio SDA (sabouraud-dextrosa-agar)**

- PDA (formulado comercial) 65 gr/litro.
- Agua destilada 1000 ml.
- Antibiótico cloranfenicol 200 µg/ml.

Adicionar el polvo SDA al agua destilada y agitar hasta disolver el medio, agregar el antibiótico y posteriormente esterilizar durante 20 minutos en autoclave a 121°C.

Anexo 4. Crecimiento radial de los tratamientos en pruebas duales.

Horas de crecimiento	Pruebas duales											
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		168 horas		216 horas	
	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma	Fusarium
Tratamientos												
Tratamiento 1	<i>F. oxysporum</i>	0.8	1.2	1.6	2.2	3.5	4.1	4.3	3.5	4.3	4.3	4.3
	<i>Trichoderma sp. M1</i>	1.2	2.5	4	5.4	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
	T.M1 vs F.1 R1	1.1	2.4	3.5	4	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
	T.M1 vs F.1 R2	1	2	3.4	3.9	4	4	4	4	4	4	4
	T.M1 vs F.1 R3	1.1	2.5	3.7	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Tratamiento 2	<i>F. oxysporum</i>	0.6	1.2	1.7	2.2	3.5	4.1	4.4	3.5	4.4	4.4	4.4
	<i>Trichoderma sp. M2</i>	1.1	2.8	4.2	5.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	T.M2 vs F.2 R1	1	2.4	3.7	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
	T.M2 vs F.2 R2	1.1	2.5	3.6	4	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
	T.M2 vs F.2 R3	1.2	2.5	3.7	4.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Tratamiento 3	<i>F. oxysporum</i>	0.7	1.2	1.7	2.2	3.8	4.2	4.7	3.8	4.7	4.7	4.7
	<i>T. koningii M2-1</i>	0.9	2.4	4.2	5.8	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
	T.k M2-1 vs F.o 3 R1	1	3.1	4.1	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
	T.k M2-1 vs F.o 3 R2	1.1	2.7	3.3	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
	T.k M2-1 vs F.o 3 R3	1	2.5	3.7	3.8	4	4	4	4	4	4	4
Tratamiento 4	<i>F. oxysporum</i>	0.7	1.2	1.7	2	3.4	4.2	4.3	3.4	4.3	4.3	4.3
	<i>T. koningii M3</i>	0.9	2.6	4.2	5.9	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	T.k M3 vs F. o 4 R1	0.9	2.5	3.7	4.1	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3
	T.k M3 vs F. o 4 R2	0.9	2.6	3.4	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
	T.k M3 vs F. o 4 R3	1	2.4	3.7	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
Tratamiento 5	<i>F. oxysporum</i>	0.6	1.4	1.8	2.3	3.7	4.2	4.6	3.7	4.6	4.6	4.6
	<i>T. atroviride MB-1</i>	1.1	2.7	4.3	5.7	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	T.a MB-1 vs F. o 5 R1	1.2	2.9	4.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	T.a MB-1 vs F. o 5 R2	1.2	2.9	4.2	4.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	T.a MB-1 vs F. o 5 R3	1.2	2.8	4.2	4.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Tratamiento 6	<i>F. oxysporum</i>	0.7	1.3	1.7	2.1	3.8	4.2	4.4	3.8	4.4	4.4	4.4
	<i>T. harzianum M4-1</i>	0.8	2.1	3.1	4.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	T.h M4-1 vs F. o 6 R1	1.2	1.9	4.7	5	5	5	5	5	5	5	5
	T.h M4-1 vs F. o 6 R2	0.8	2	3.3	4.1	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
	T.h M4-1 vs F. o 6 R3	0.8	2	3.3	3.9	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Tratamiento 7	<i>F. oxysporum</i>	0.6	1.2	1.8	2.2	3.7	4.2	4.5	3.7	4.5	4.5	4.5
	<i>T. harzianum M4</i>	0.7	1.8	3	4.7	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	T.h M4 vs F. o 7 R1	0.9	2.1	3.1	3.8	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3
	T.h M4 vs F. o 7 R2	1	1.7	3	3.4	4	4	4	4	4	4	4
	T.h M4 vs F. o 7 R3	0.9	2.2	2.8	3.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

Anexo 5. Datos del crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en cultivos duales.

Horas	<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i> M1	<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i> M2	<i>Trichoderma</i> <i>koningii</i> M2-1	<i>Trichoderma</i> <i>koningii</i> M3	<i>Trichoderma</i> <i>atroviride</i> M3-1	<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> M4	<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> M4-1
0	-0.1785	-0.2817	-0.9020	-0.5463	-0.6371	-0.2325	0.0556
12	5.0387	5.4433	6.1719	4.8276	6.4076	4.7947	3.4148
24	5.0387	11.7624	13.1370	11.0135	13.8086	9.9366	8.6286
36	17.2160	18.2394	19.7124	17.4989	21.1384	15.0186	14.9574
48	23.3147	24.5051	25.6698	23.8500	28.0395	19.8912	21.7617
60	28.9625	30.2571	30.8332	29.7120	34.2237	24.4306	28.5022
72	33.9038	35.2597	35.0792	34.8091	39.4727	28.5382	34.7395
84	37.9530	39.3444	38.3367	38.9444	43.6378	32.1411	40.1344
96	40.9946	42.4091	40.5873	42.0000	46.6398	35.1917	44.4477
108	42.9829	44.4190	41.8647	43.9368	48.4694	37.6678	47.5404
120	43.9426	45.4057	42.2553	44.7950	49.1868	39.5726	49.3734
132	43.9681	45.4680	41.8978	44.6932	48.9218	40.9350	50.0078
144	43.2240	44.7715	40.9835	43.8295	47.8741	41.8091	49.6048
156	41.9449	43.5484	39.7559	42.4805	46.3128	42.2745	48.4256
168	40.4355	42.0980	38.5111	41.0021	44.5767	42.4362	46.8315
180	39.0704	40.7863	37.5977	39.8289	43.0744	42.4249	45.2840
192	38.2942	40.0464	37.4167	39.4745	42.2840	42.3963	44.3443
204	38.6218	40.3778	38.4214	40.5316	42.7533	42.5318	44.6743
216	40.6378	42.3473	41.1176	43.6716	45.0998	43.0384	47.0353

Anexo 6. Velocidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en cultivos duales.

Horas	<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i> M1	<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i> M2	<i>Trichoderma</i> <i>koningii</i> M2-1	<i>Trichoderma</i> <i>koningii</i> M3	<i>Trichoderma</i> <i>atroviride</i> M3-1	<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> M4	<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> M4-1
0	0.3897	0.4388	0.5851	0.3981	0.5589	0.4088	0.1800
12	0.4724	0.5084	0.6014	0.4893	0.6083	0.4263	0.3682
24	0.5134	0.5388	0.5921	0.5345	0.6192	0.4282	0.4905
36	0.5185	0.5356	0.5616	0.5403	0.5974	0.4167	0.5554
48	0.4935	0.5045	0.5142	0.5133	0.5487	0.4167	0.5712
60	0.4443	0.4509	0.4544	0.4599	0.4789	0.3615	0.5461
72	0.3767	0.3805	0.3864	0.3869	0.3938	0.3221	0.4887
84	0.2966	0.2988	0.3147	0.3007	0.2992	0.2777	0.4071
96	0.2097	0.2115	0.2437	0.2080	0.2010	0.2304	0.3098
108	0.1220	0.1240	0.1777	0.1154	0.1048	0.1823	0.2051
120	0.0392	0.0419	0.1210	0.0293	0.0166	0.1356	0.1013
132	-0.0327	-0.0292	0.0781	-0.0435	-0.0580	0.0923	0.0067
144	-0.0880	-0.0837	0.0533	-0.0966	-0.1129	0.0545	-0.0702
156	-0.1209	-0.1160	0.0510	-0.1233	-0.1426	0.0245	-0.1213
168	-0.1255	-0.1206	0.0756	-0.1171	-0.1411	0.0043	-0.1380
180	-0.0959	-0.0920	0.1313	-0.0713	-0.1027	-0.0040	-0.1121
192	-0.0263	-0.0244	0.2227	0.0205	-0.0215	0.0018	-0.0353
204	0.0890	0.0875	0.3541	0.1650	0.1083	0.0237	0.1009
216	0.2561	0.2495	0.5298	0.3688	0.2924	0.0639	0.3046

Anexo 7. Datos de las variables de las pruebas *in vivo* en plántulas de tomate.

Tratamiento	Long. raíz *	Long. follaje *	Long. planta (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco **
Testigo	0.4541	0.5459	15.24	5.39	0.1078
Testigo	0.3980	0.6020	14.17	4.63	0.1003
Testigo	0.3443	0.6549	12.72	3.2	0.0860
Testigo	0.3138	0.6850	8	1.57	0.0896
Testigo	0.4440	0.5552	12.5	4.08	0.0822
Testigo	0.3724	0.6276	12.38	3.52	0.0699
Testigo	0.3679	0.6321	11.77	3.82	0.0827
Testigo	0.4363	0.5630	15.31	4	0.0824
Testigo	0.4845	0.5155	14.55	4.5	0.0968
Testigo	0.4449	0.5551	11.35	3.1	0.0805
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4315	0.5685	14.97	5.24	0.0779
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.5191	0.4809	16.22	5.16	0.0908
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4683	0.5317	12.6	4.39	0.0708
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.5168	0.4826	16.93	5.72	0.0900
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4426	0.5574	15.25	3.7	0.0880
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4126	0.5874	9.33	1.62	0.0758
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4428	0.5572	13.98	5.09	0.0930
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.5007	0.4993	14.28	3.56	0.0786
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4330	0.5670	17.83	3.58	0.0724
<i>T. harzianum</i> M4-1 + <i>F. oxysporum</i>	0.4315	0.5685	12.7	3.15	0.0804
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4895	0.5105	14.3	1.962	0.0796
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.5649	0.4351	15.42	2.44	0.0724
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4419	0.5571	10.5	1.4	0.0997
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4628	0.5372	13.29	3.73	0.0704
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.3862	0.6138	13.88	3.87	0.0856
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.5410	0.4590	15.25	3.33	0.0949
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4938	0.5055	14.5	3.2	0.0913
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4806	0.5188	15.94	3.41	0.0880
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4331	0.5669	13.97	3.12	0.0804
<i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> M4-1	0.4508	0.5483	12	1.62	0.0763

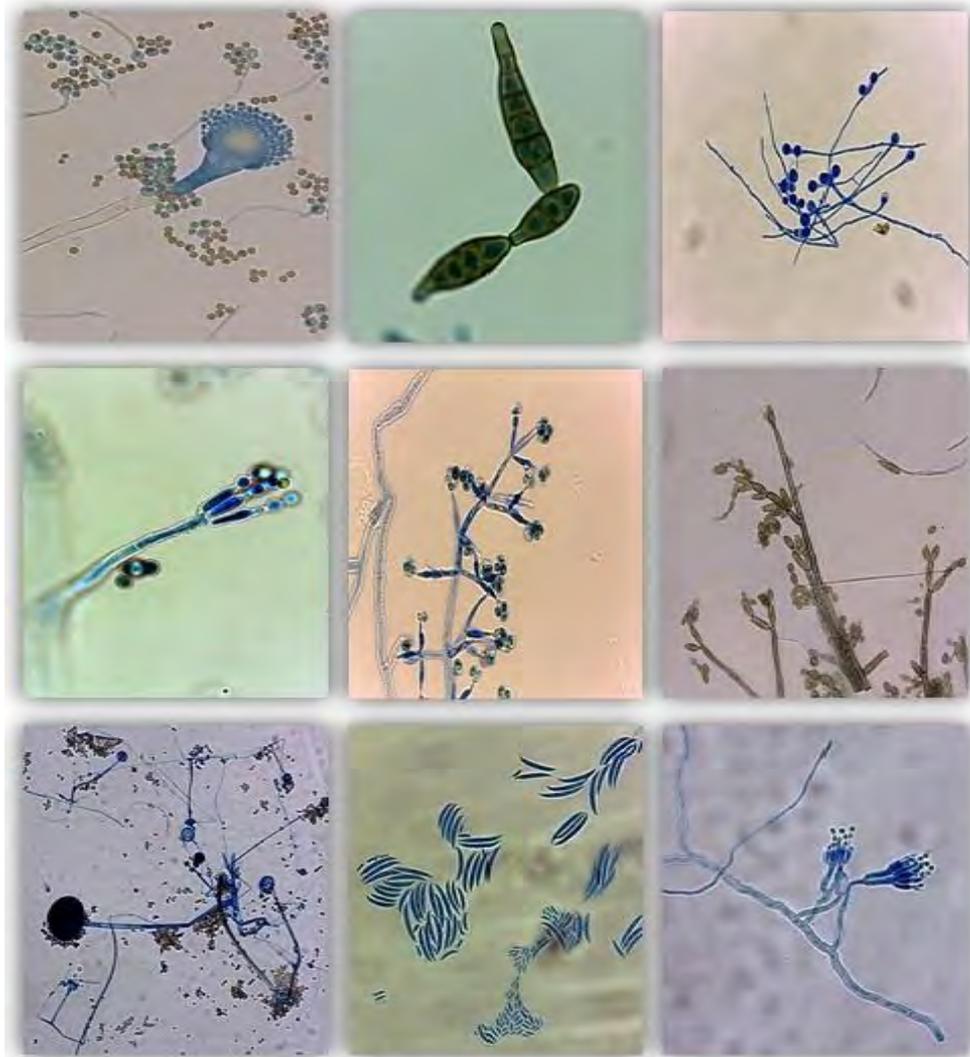
*Valores relativos respecto a la longitud de planta.

**Valores relativos respecto al peso fresco.

Anexo 8. Fichas de identificación.

<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Trichoderma atroviride</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Trichoderma harzianum</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Trichoderma koningii</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Trichoderma sp.</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>
<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Fusarium solani</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Fusarium oxysporum</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN INGENIERÍA AGRÍCOLA</p> <p>Fusarium lateritium</p>  <p>AUTOR: JONATHAN ALFREDO PERNÁNDEZ MENDOZA ASISTENTE DOC. MARCO ESPINOSA ESPINOZA COADJUTOR DR.A. GLORIA DE LOS ANGELES ZETA PARELLA</p> <p>2018</p>	

Trichoderma harzianum



AUTOR JONATHAN ALFREDO FERNÁNDEZ MENDIOLA

**ASESOR BIOL. MARCOS ESPADAS RESÉNDIZ
COASESOR DRA. GLORIA DE LOS ÁNGELES ZITA PADILLA**

2016

ÍNDICE

1. Nombre Científico	1
1.1 Taxonomía	1
1.2 Micrografías	1
2. Colecta	2
2.1 Fecha	2
2.2 Hospedante	2
2.3 Ubicación	2
2.3.1 Georreferencia	2
3. Técnica de aislamiento	3
4. Medio de cultivo	3
5. Técnica de identificación	3
6. Características macroscópicas	3
6.1 Características culturales de la colonia	3
7. Clave morfológica de género	3
7.1 Descripción de género	4
8. Clave morfológica de sección	4
8.1 Clave morfológica para especies de la sección <i>Trichoderma</i>	4
8.2 Descripción de la especie	5
9. Glosario	5
10. Referencias	6

1. Nombre científico.

Anamorfo: *Trichoderma harzianum*

Teleomorfo: *Hypocrea lixii*

1. 1 Taxonomía (NCBI, 2015).

Súper Reino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Subreino: *Dikarya*

División: *Ascomycota*

Subdivisión: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

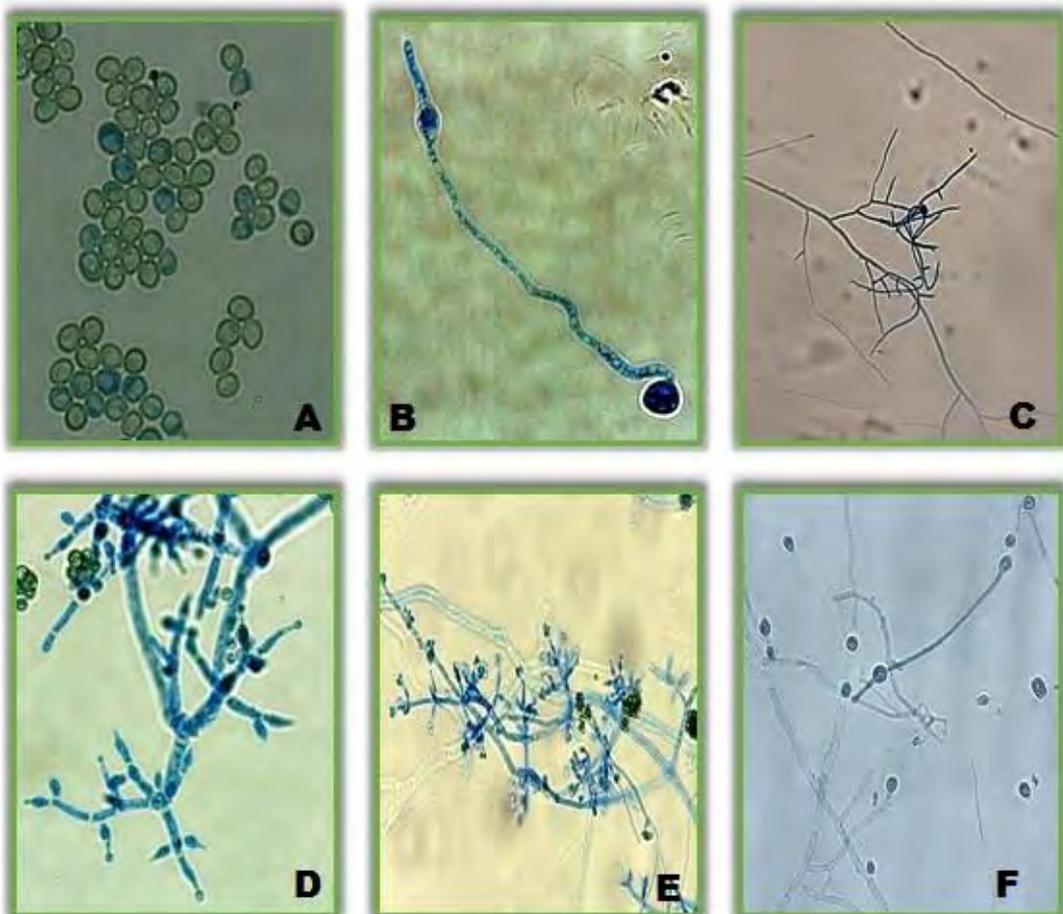
Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocreaceae*

Género: *Trichoderma*

Especie: *harzianum*

1.2 Micrografías.



¹³A. Detalle de conidios 100x. B. Germinación unipolar de conidios (24 horas) 100x. C. Formación de conidióforos y fiálides (24 horas) 10x. D. Detalle de fiálide y conidióforo (96 horas) 100x. E. Esporulación (120 horas) 40x. F. Clamidosporas (96 horas) 40x.

¹³ Micrografías a partir de preparaciones permanentes. El número de horas de las micrografías no indican el tiempo del ciclo de desarrollo del hongo, sino el tiempo asignado a la preparación permanente.

2. Colecta.

2.1 Fecha.

02 de Septiembre del 2014

2.2 Hospedante.

Suelo cultivado con tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Fotografía 1.

Cultivo de tomate bajo invernadero.



2.3 Ubicación.

Estado: Estado de México, Toluca

Municipio: Coatepec Harinas

Comunidad: Acuitlapilco

2.3.1 Georreferenciación.

N18°54'55.422'', W99°46'59.5308''

Imagen 1.

Ubicación satelital de colecta (Invernadero)



Fuente: Google Earth, 2015.

3. Técnica de aislamiento.

Dilución en serie

4. Medio de Cultivo.

PDA (papa-dextrosa-agar) con antibiótico cloranfenicol (200 µg/ml).

5. Técnica de identificación.

Microcultivo

6. Características macroscópicas.

6.1 Características culturales de la colonia.

Colonia incubada a 26°C ±1.

Colonia de crecimiento rápido alcanzando 90 mm de diámetro en 4 días. Colonia con conidiación en forma de anillos de esporulación de color blanco al inicio, tornándose a color verde en colonias ya maduras, anillos formados por pústulas compactas de apariencia rugosa; crecimiento de fase somática entre cada anillo de esporulación con micelio hialino creciendo en su mayoría pegado al medio y escasamente semi-elevado. Colonia con ligero olor parecido a coco. Reverso de la colonia incoloro.

Fotografía 2.

Trichoderma harzianum



7. Clave Morfológica de Género. (Barnett y Hunter, 1987)

MONILIALES

1b Conidios no enroscados.....10

NO HELICOSPORAS

10a Tanto conidio y conidióforo (si está presente) hialino o de otros colores o de colores brillantes; conidióforos individuales o en racimos libres.....*Moniliaceae*

MONILIACEAE

11a Conidio típicamente de 1 célula, globosa, o la mayoría de las veces más larga que ancha.....12

12b Conidióforos diferentes, aunque algunas veces cortos.....19

19c Sin estado conidial de mildiu polvoso.....20

20a Conidios de distintas formas, que nacen de las células apicales del conidióforo.....	21
21b Conidióforos en su mayoría ramificados, fiálides si están presentes, en grupos o en cabezas.....	38
38b Conidios no dispuestos en cabezas compactas, conidióforos simples o ramificados cerca del ápice.....	41
41c Conidios no catenulados.....	45
45b Aleuriospora de pared celular gruesa ausentes.....	48
48a Conidios producidos hacia o cerca del ápice ya sea en fiálides o ramificaciones del conidióforo.....	49
49b Ramificación del conidióforo irregular, no verticilado.....	51
51b Conidios dispuestos en cabezas.....	54
54b Conidióforos con ramificación difusa no en forma de cepillo o brocha.....	<i>Trichoderma</i>

7.1 Descripción de Género.

El hongo *Trichoderma* es abundante en la naturaleza; este género se encuentra principalmente en material en descomposición que se encuentra en el suelo, también se ha encontrado en restos de madera en descomposición. Este género cuenta con más de 200 especies ampliamente distribuidas en un amplio rango de regiones geográficas en la mayoría de las zonas climáticas. (Druzhinina *et al.* 2006; Hoyos y Bisset, 2012; Atanasova *et al.* 2013; Bisset *et al.* 2015)

El género *Trichoderma* tiene micelio septado con conidióforos hialinos re-ramificados, normalmente con el eje principal más largo que las ramificaciones; con fiálides solas o en grupos de forma lageniforme, ampuliforme o subulada; conidiación acropleurogena naciendo a partir de las fiálides. Conidios (fialosporas) hialinos a verdes, verde-grisáceo o verde-amarillento en masas, unicelulares, de forma ovoide, subglobosos, elipsoidales a oblongo o clavado, de pared conidial lisa o verrugosa. Clamidosporas pueden estar presentes o ausentes, de pared lisa y gruesa, de forma globosa a elipsoidal, solitarias terminales o dispuestas de manera intercalar en las hifas, algunas veces en cadenas o en masas multicelulares. Olor característico de algunas especies a coco o alcanfor. (Gams y Bisset, 1998; Atanasova *et al.* 2013; The University of Adelaide, 2016)

El género *Trichoderma* produce enzimas como celulasas, glucanasas, pectinasas y quitinasas y antibióticos como 6-pentil-alfa-pirona, glitoxina, atroviridinas y peptaiboles. (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Infante *et al.* 2009; Zeilinger y Schuhmacher, 2013)

8. Clave morfológica de Sección. (Gams y Bissett, 1998)

1(b) Conidiación efusa o fasciculada a pustulada, conidios a menudo verdes; conidióforos frecuentemente con ramas laterales; en su mayoría fiálides lageniformes a ampuliformes.....	2
2(b) Conidióforos re-ramificados repetidamente; ramas y fiálides pareadas o verticiladas, también aquellos en la posición terminal, conidios de paredes lisas a verrugosas.....	3
3(b) Conidióforos y ramas estrechas y flexuosas (eje principal 6 μm ancho); fiálides en verticilos de 2 o 3 (-5), lageniformes o subuladas; conidios siempre verdes.....	sección <i>Trichoderma</i>

8.1 Clave morfológica para especies de la Sección *Trichoderma*.

1(b) Colonias de crecimiento más rápido.....	3
3(b) Conidios subglobosos a elipsoidales cortos u ovados.....	4
4(b) Conidios subglobosos a elipsoidales cortos.....	5
5(a) Conidios totalmente maduros de color verde pálido: 2.5-3.5x2.1-3.0 μm	3. <i>T. harzianum</i>

8.2 Descripción de la Especie.

Hongo saprofito, comúnmente encontrado y aislado de suelos en climas tropicales y templados. Especie reconocida por su gran capacidad de biocontrol de patógenos de suelo, especie utilizada para realizar control biológico de diversos hongos fitopatógenos asociados a enfermedades en gran diversidad de cultivos. Esta especie además de reducir la incidencia de enfermedades, permite un incremento significativo en la biomasa así como en la zona radicular de las plantas. (Donoso *et al.* 2008; Hernández *et al.* 2011)

Trichoderma harzianum tiene conidióforos estrechos y flexuosos, con ramificaciones verticiladas, formando una estructura piramidal, eje principal del conidióforo más largo. Fiálides laterales ampuliformes y fiálides terminales en su mayoría langeniformes; 3-4 verticiladas, fiálides terminales mayormente pareadas. Esporulación acropleurogena, conidios dispuestos en racimos terminales (3-6 conidios), conidio subgloboso a ovoide, con pared conidial lisa, conidio de color verde pálido. Clamidospora solitaria de forma globosa, dispuesta de manera intercalar en las hifas. (Gams y Bissett, 1998; Watanabe, 2002; Samuels, sin fecha)

Tabla 1.
Tamaño de estructuras de *Trichoderma harzianum* (μ)

Conidio	Fiálide	Fiálide terminal	Ancho micelio	Clamidospora
3.59-4.01 x 2.96-3.29	7.32-8.49 x 1.83-2.50	9.75-11.63 x 1.59-2.32	4.56-5.0	8.18-10.08 x 9.52-11.10

9. Glosario (Ulloa y Hanlin, 2006).

Acropleurogena: que se origina en el ápice y después se vuelve hacia un costado debido al crecimiento indeterminado del ápice.

Ampuliforme: de forma de botella, hinchada, particularmente en la parte basal. Se aplica especialmente a la célula conidiógena que se hincha para formar un área fértil, sobre la que se producen muchos conidios simultáneamente, de manera que cubren toda la superficie.

Anamorfo: estado asexual, conidial o imperfecto de un hongo, que produce sus esporas por mitosis.

Clamidospora: espora de origen asexual, recubierta por una pared celular recia y de tipo perdurante, que funciona como espora de resistencia o latencia.

Conidio: también se le llama conidiospora; es una espora asexual, no móvil formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios son las esporas asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes.

Conidióforo: hifa, simple o ramificada, que se diferencia morfológica y fisiológicamente de una somática por producir y sustentar conidios, estos son generados en células especializadas denominadas conidiógenas.

Fiálide: tipo de célula conidiógena, en forma de botella, que produce conidios blásticos (fialoconidios o fialosporas) en sucesión basípeta; la fiálie es una de las células conidiógenas más comunes entre los hongos imperfectos.

Fialospora: espora de reproducción asexual, formada por abstricción en el ápice de una fiálide; termino relacionado con la ontogenia conidial, que se aplica principalmente tratándose de hongos imperfectos.

Hialino: transparente e incoloro, como si fuera de cristal, o por lo menos diáfano.

Lageniforme: se aplica al órgano u estructura ventruda en la base con la parte superior más angosta.

Micoparásito: hongo parásito de otro hongo.

Subulado: estrechado hacia el ápice hasta rematar en una punta no muy fina; no tan puntiagudo como acicular

Teleomorfo: estado sexual o perfecto de un hongo, cuyas esporas se producen por meiosis.

Verrugoso: con prominencias a modo de verrugas en la superficie.

Verticilado: tipo de ramificación en el que las ramas nacen a un mismo nivel de la hifa o sustentáculo y crecen oblicuamente hacia arriba con respecto al eje central.

10. Referencias.

Atanasova, L., Druzhiniana, I. S., and Jaklitsch, W. M. 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular Phylogeny. en: Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., Schmoll, M. *Trichoderma*. Biology and Applications. Boston, USA. CAB International. pp. 10-43.

Barnett, H.L., and Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. MACMILLAN PUBLISHING COMPANY. New York, USA. pp. 7-39.

Bisset, J., Gams, W., Jaklitsch, W., and Samuel, G. J. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. IMA FUNGUS. 6(2):263-295.

Donoso, E., Lobos, G. A., y Rojas, N. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y composta sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. Bosque. 29(1):52-57.

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, G. A., and Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience. 47:55-64.

Gams, W., and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. en: Kubicek, C. P., and Harman, G. E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Londres, Inglaterra. Taylor and Francis. pp. 8-14.

Hernández, M. J. L., Sánchez, P. M. I., García, O. J. G., Mayek, P. N., González, P. J. M., y Quiroz, V. J. C. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma spp* nativos del noreste de México. Revista Colombiana de Biotecnología. 8(2):176-185.

Hoyos, L.M., y Bissett, J. 2012. *Trichoderma*: especialidad, variabilidad y usos. en Hoyos, C. L. M. Enfermedades de plantas: control biológico Bogotá. Ecoe Ediciones: Universidad Nacional de Colombia. pp. 11-18.

Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección vegetal. 24(1):14-21.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Consultado el 26 de Febrero del 2016.

Samuels, G. J., Chaverri, P. F., and McCray, E. B. (Sin fecha). *Trichoderma* online, Systematic mycology and microbiology laboratory. ARS, USDA. en: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Consultado el 8 de Enero del 2016.

Sivasithamparam, K., and Ghisalberti, E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. en: : Kubicek, C. P., Harman, G. E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Londres, Inglaterra. Taylor and Francis. pp. 8-14.

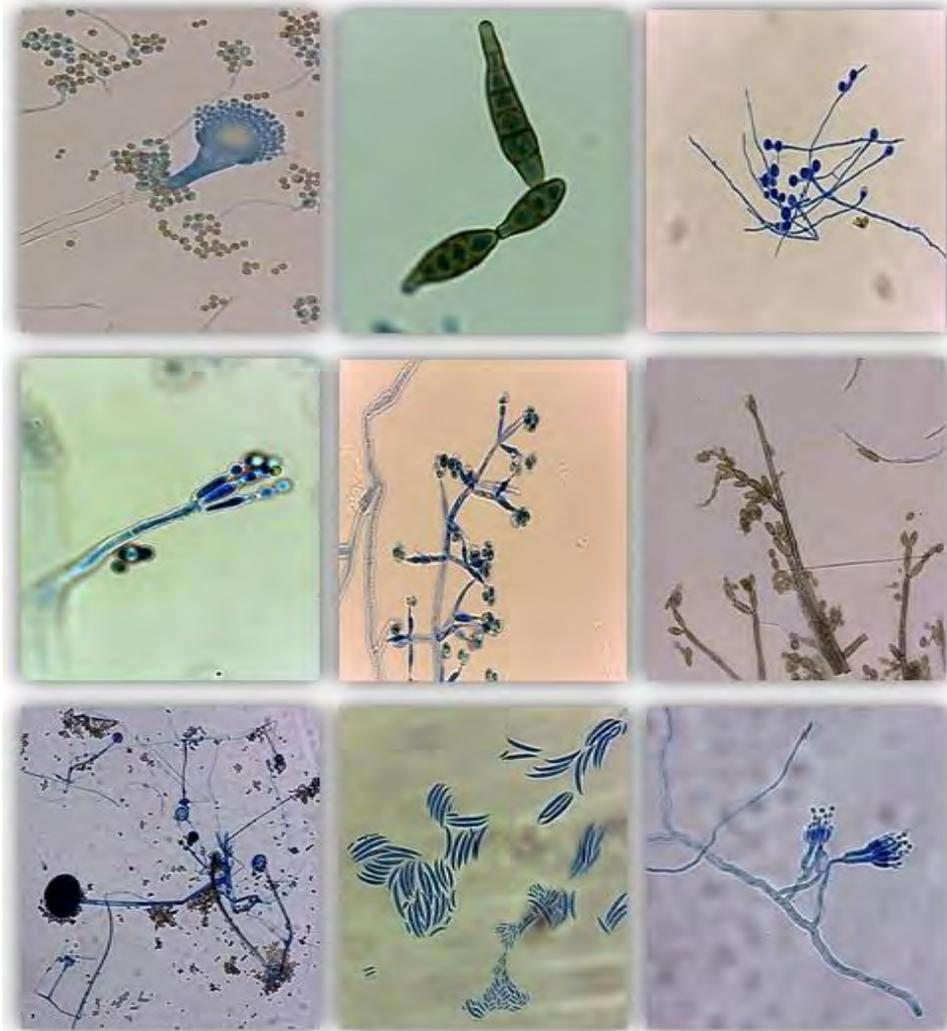
The University of Adelaide. 2016. Mycology online. *Trichoderma* sp. en: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Trichoderma/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Trichoderma/). Consultado el 17 de Marzo del 2016.

Ulloa, M. y Hanlin, R. T. 2006. Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 672 p.

Watanabe, T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC PRESS. Washington, U.S.A. pp. 218-219.

Zeilinger, S., and Schuhmacher, R., 2013. Volatile organic metabolites of *Trichoderma* spp.: biosynthesis, biology and analytics. en: Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., Schmoll, M. *Trichoderma*. Biology and Applications. Boston, USA. CAB International. pp. 110-123.

Fusarium oxysporum



AUTOR JONATHAN ALFREDO FERNÁNDEZ MENDIOLA

**ASESOR BIOL. MARCOS ESPADAS RESÉNDIZ
COASESOR DRA. GLORIA DE LOS ÁNGELES ZITA PADILLA**

2016

ÍNDICE

1. Nombre Científico	1
1.1 Taxonomía	1
1.2 Micrografías	1
2. Colecta	2
2.1 Fecha	2
2.2 Hospedante	2
2.3 Ubicación	2
2.3.1 Georreferencia	2
3. Técnica de aislamiento	2
4. Medio de cultivo	2
5. Técnica de identificación	3
6. Características macroscópicas	3
6.1 Características culturales de la colonia	3
7. Clave morfológica de género	3
7.1 Descripción de género	3
8. Clave morfológica de sección	4
8.1 Clave morfológica para especies de las secciones <i>Latetitium</i>, <i>Liseola</i>, <i>Elegans</i>, <i>Martiella</i> y <i>Ventricosum</i>.	5
8.2 Descripción de la especie	5
9. Glosario	6
10. Referencias	6

1. Nombre científico.

Anamorfo: *Fusarium*

1. 1 Taxonomía (NCBI, 2015).

Súper Reino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Subreino: *Dikarya*

División: *Ascomycota*

Subdivisión: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

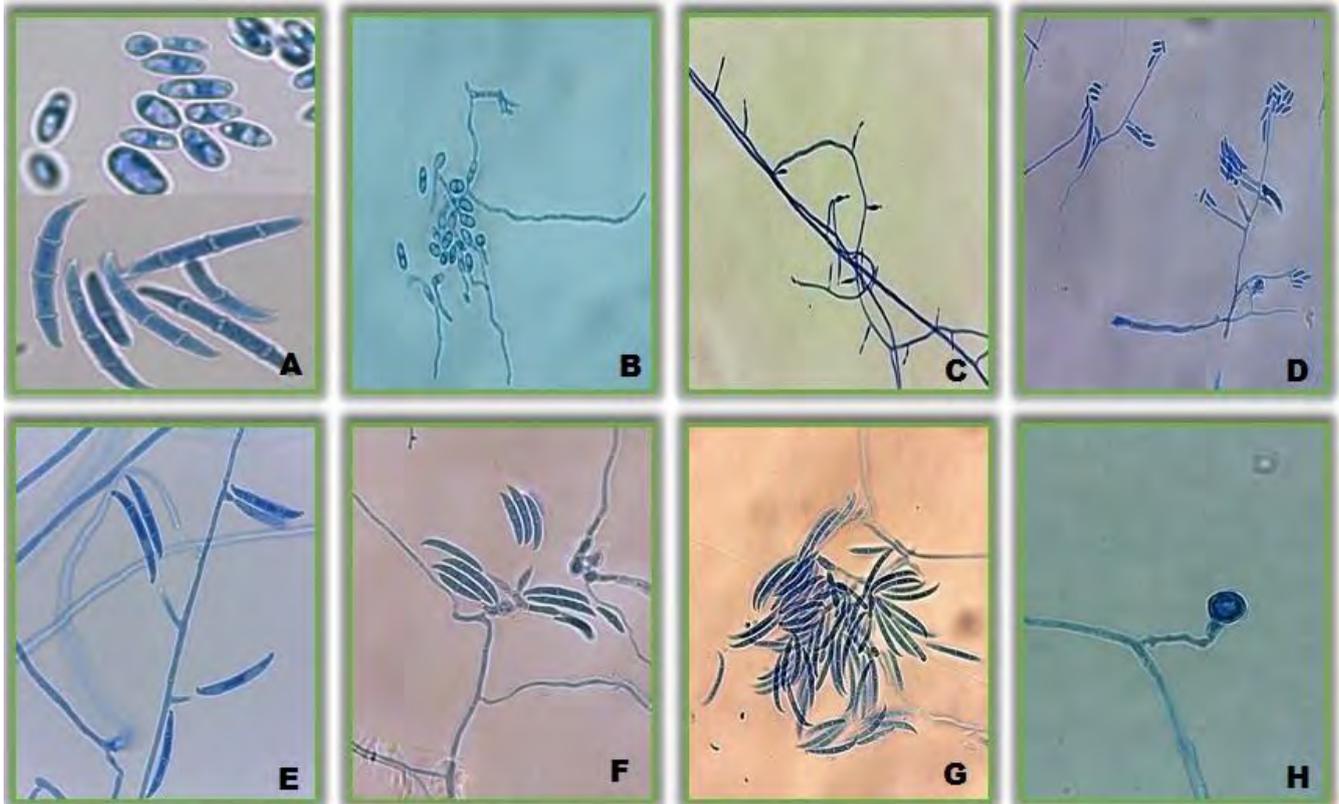
Orden: *Hypocreales*

Familia: *Nectriaceae*

Género: *Fusarium*

Especie: *oxysporum*

1.2 Micrografías.



¹⁴**A.** Microconidios y macroconidios 100x. **B.** Germinación multipolar de microconidios (24 horas) 40x. **C.** Formación de monofiálides (24 horas) 40x. **D.** Esporulación de microconidios en falsas cabezas (48 horas) 100x. **E.** Esporulación de macroconidios (72 horas) 100x. **F.** Formación de esporodoquio (48 horas) 40x. **G.** Esporodoquio (72 horas) 40x. **H.** Clamidospora (120 horas) 100x.

¹⁴ Micrografías a partir de preparaciones permanentes. El número de horas de las micrografías no indican el tiempo del ciclo de desarrollo del hongo, sino el tiempo asignado a la preparación permanente.

2. Colecta.

2.1 Fecha.

02 de Septiembre del 2014

2.2 Hospedante.

Suelo cultivado con tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Fotografía 1.

Cultivo de tomate bajo invernadero.



2.3 Ubicación.

Estado: Estado de México, Toluca

Municipio: Coatepec Harinas

Comunidad: Chiltepec

2.3.1 Georreferenciación.

N18°55'2.571", W99°49'56.355"

Imagen 1.

Ubicación satelital de colecta (Invernadero)



Fuente: Google Earth, 2015.

3. Técnica de aislamiento.

Dilución en serie

4. Medio de Cultivo.

- Características macroscópicas.

PDA (papa-dextrosa-agar) con antibiótico cloranfenicol (200 µg/ml).

- Características microscópicas.
CLA (clavel-leaf-agar) con antibiótico cloranfenicol (200 µg/ml).

5. Técnica de identificación.

Microcultivo

6. Características macroscópicas.

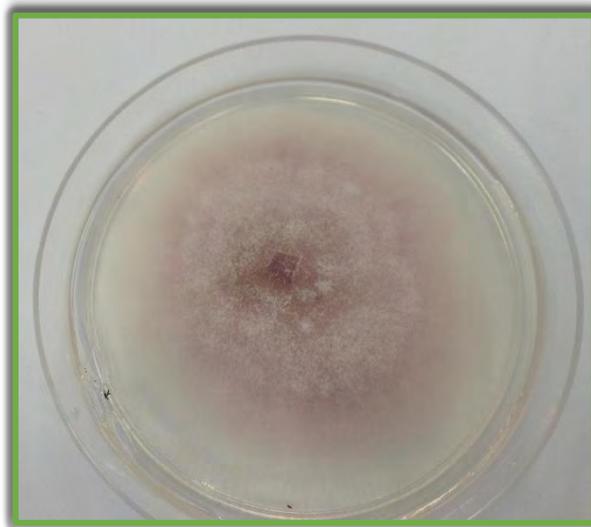
6.1 Características culturales de la colonia.

Colonia incubada a 26°C ±1.

Colonia de rápido crecimiento alcanzando 72 mm de diámetro en diez días. Colonia de apariencia flocosa con abundante micelio aéreo de textura algodonosa de color blanco, fondo de la colonia de tonalidad rojo pálido. Reverso de la colonia de color rojo pálido con estrías longitudinales de color rojo carmín. Colonia sin pigmentación en el medio.

Fotografía 2.

Fusarium oxysporum



7. Clave Morfológica de Género. (Barnett y Hunter, 1987)

- 1b Tiene micelio septado y otras características de los hongos imperfectos.....3
- 3b Conidióforo distinto o reducido a la clavija, predominando típicamente conidios con dos o más células.....35
- 35b Conidio típicamente con más de 3 células a veces variable.....43
- 43b Conidio fragmospora, con paredes transversales pero no oblicuas.....44
- 44b Conidios sin apéndices.....45
- 51c Conidióforos cortos, simples o ramificados, hialino, conidio típicamente largo en forma de canoa, usualmente se presenta un conidio unicelular.....**Fusarium**

7.1 Descripción de Género

El género *Fusarium* es un hongo cosmopolita, ampliamente distribuido en diversas regiones y climas, colonizando diferentes plantas o viviendo como saprobio en el suelo. Se han descrito 70 especies de este género. Parasito de las plantas vasculares, género asociado a diversas enfermedades de importancia económica como marchitez vascular y necrosis en tallos y raíces en gran cantidad de cultivos agrícolas. Al menos 80% de las plantas cultivadas tienen una

enfermedad causada por especies del género *Fusarium*. (Leslie *et al.* 2006; Figueroa *et al.* 2010; Fernández *et al.* 2015)

Las especies del género *Fusarium* tienen conidióforos simples, delgados raramente ramificados, en general producen dos tipos de conidio que se forman a partir de una célula conidiógena llamada monofiálide, o algunas especies pueden producir polifiálides. Los microconidios son unicelulares, pueden tener uno o dos septos, son de forma ovoide, globosa, piriforme o napiforme; nacidos en falsas cabezas o en cadenas a partir de una célula conidiógena. El macroconidio es típico del género, en algunos casos la morfología del macroconidio es suficiente para la identificación de algunos géneros. El macroconidio tiene una forma de canoa, con una curvatura ventral bien marcada, espora septada con célula apical y célula basal que pueden estar en forma puntiaguda a encorvada, en forma de pie. La mayoría de las especies del género *Fusarium* producen una estructura de resistencia llamada Clamidospora, la cual puede permanecer en latencia en el suelo hasta por más de 40 años. Las clamidosporas se caracterizan por tener una pared conidial gruesa; pueden estar solitarias, en pares, agrupadas o en cadenas. (Holliday, 1980; The University of Adelaide, 2016)

8. Clave morfológica de sección. (Nelson *et al.* 1983)

A. Características culturales

1. Tasa de Crecimiento.

c. Crecimiento rápido, cubriendo todo (8.5 cm) sesgo de longitud en 10 días.....11

2. Presencia o ausencia de micelio de aéreo.

a. Micelio aéreo presente, escaso o abundante, similar al fieltro, masas de esporas (esporodoquios) presentes o ausentes.....11

3. Color de micelio aéreo.

a. Blanco.....11

4. Color de la colonia desde abajo. Color que se puede difundir en el agar.

a. Color ausente o si está presente solo en tonos muy pálidos de naranja, bronceado (canela), café o purpura.....11

5. Color de masas de esporas (esporodoquios)

a. Crema.....11

B. Macroconidio de esporodoquio.

1. Tamaño.

a. Medio largo, generalmente 3-7 septada.....11

2. Forma.

a. Macroconidio con marcada curvatura dorsiventral. Los lados del macroconidio son a menudo de curvas desiguales.....11

3. Forma de las células basales.

b. Células basales se distinguen en forma de pie o muesca.....11

C. Microconidio a partir de micelio aéreo.

1. Presente o ausente.

a. Presente y abundante (*F. bactridioides*).....11

2. En cadenas o falsas cabezas.

b. Únicamente en falsas cabezas.....11

3. Forma.

a. Ovalada en forma de huevo (ovoide) en forma arriñonada (reniforme) a fusiforme.....11

D. Conidióforos.

1. Tipo.

Únicamente monofiálides (puede producir ya sea macroconidios o microconidios).....11

E. Clamidosporas.	
1. Presentes o ausentes.	
a. Presentes.....	11
2. Disposición.	
a. Solas o en pares.....	11
11.....	Sección <i>elegans</i>

8.1 Clave morfológica para las especies de las secciones *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella* y *Ventricosum*. (Nelson et al. 1983)

A. Características culturales.	
1. Tasa de crecimiento.	
b. Crecimiento rápido, mayor que 7 cm de diámetro después de 10 a 14 días.....	29
2. Color de micelio aéreo.	
a. Blanco.....	29
3. Color de la colonia desde abajo. Color que se puede difundir en el agar.	
b. Bronceado (canela) a rojo carmín.....	29
4. Color de masas de esporas (esporodoquio).	
b. Crema.....	29
B. Macroconidio a partir del esporodoquio.	
1. Tamaño.	
b. Corta.....	29
2. Forma.	
b. Relativamente delgada con las paredes delgadas.....	29
C. Microconidio a partir del micelio aéreo.	
1. Presente o ausente.	
b. Abundante.....	29
2. En cadenas o falsas cabezas.	
b. Solamente en falsas cabezas.....	29
3. Forma.	
a. Oval a arriñonada (reniforme) y clavada.....	29
D. Conidióforos.	
1. Tipo.	
b. Monofiálides cortos produciendo microconidios.....	29
E. Clamidosporas.	
c. Abundante.....	29
29.....	<i>Fusarium oxysporum</i>

8.2 Descripción de la especie.

La especie *Fusarium oxysporum* crece como una colonia de rápido crecimiento, con micelio aéreo abundante de color blanco a crema, reverso de la colonia con tonalidad rojo pálido.

Especie con abundante producción de microconidios y macroconidios. Microconidio de forma ovalada unicelular y en ocasiones de dos células, conidiación a partir de monofiálides cortas con esporulación en forma de falsas cabezas. Macroconidio creciendo a partir del esporodoquio o a partir de la hifa; macroconidio en forma de hoz, corto usualmente 3-septada, de paredes delgadas con el lado dorsal más curvo que el lado ventral; célula apical cónica o curvada, célula basal en forma de pie. Clamidosporas abundantes, de rápida formación de paredes lisas, presentándose solas mayormente o en parejas en menor proporción, desarrollándose principalmente en las hifas de manera terminal aunque también se desarrollan intercaladamente entre las hifas. Las

clamidosporas son las estructuras de resistencia del género *Fusarium*. (Nelson *et al.* 1983; Watanabe, 2002; Leslie *et al.* 2006; The University of Adelaide, 2016)

Tabla 1.
Forma y tamaño de estructuras de *Fusarium oxysporum* (μ)

Macroconidia				Microconidia			Clamidospora	
Tamaño	Forma	Célula apical	Célula basal	Tamaño	Forma	Esporulación	Forma	Tamaño
(26.14-32.41 x 2.94-3.70)	Con el lado dorsal más curvo que el lado ventral	Protuberado	Forma de pie	(2.21-3.12 x 6.31-8.98)	Mayormente Ovalada unicelular. Dos células ovaladas en menor proporción.	Monofiálides en falsas cabezas. Macro y Microconidias	Solitaria, creciendo en su mayoría de manera terminal y en menor proporción intercaladamente entre las hifas.	(6.67-10.16 x 7.12-10.94)

9. Glosario (Ulloa y Hanlin, 2006).

Anamorfo: estado asexual, conidial o imperfecto de un hongo, que produce sus esporas por mitosis.

Clamidospora: espora de origen asexual, recubierta por una pared celular recia y de tipo perdurante, que funciona como espora de resistencia o latencia.

Conidióforo: hifa, simple o ramificada, que se diferencia morfológica y fisiológicamente de una somática por producir y sustentar conidios, estos son generados en células especializadas denominadas conidiógenas.

Esporodoquio: fructificación formada por una masa compacta de hifas cortas que constituyen un estroma en forma de cojinete; en los extremos de dichas hifas (conidióforos) se producen las esporas.

Flocoso: tomentoso, flojamente algodonoso o lanoso, o más densamente aglomerado en copos como la franela.

Macroconidio: conidio o espora de reproducción asexual, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por ser pluricelular.

Micelio: conjunto o masa de hifas que constituye el cuerpo o talo de un hongo.

Microconidio: se refiere a un conidio pequeño, generalmente unicelular.

Napiforme: de forma similar a un nabo, hinchado u bulboso en el ápice y adelgazado abruptamente hacia la base.

Piriforme: de forma parecida a la de una pera.

Septado: con septos o particiones.

Septo: pared transversal en una célula o en una hifa.

10. Referencias.

Barnett, H.L., and Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera og imperfect fungi. MACMILLAN PUBLISHING COMPANY. New York, USA. pp. 7-39.

Fernández, M. E., Jaimes, M. P., Sánchez, G. D., Chora, P. G., Hernández, H. V. M. 2015. Diversidad de *Fusarium* en la raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Micología. 42:33-43.

Figueroa, R. M. G., Guerrero, A. B. Z., González, M. M., Pons, H. J. L., Jiménez, B. J. F., Ramírez, P. J. G., Andrio, E. E., Mendoza, E. M. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2):124-134.

Holliday, P. 1980. *Fungus diseases of tropical crops*. General Publishing Company. Toronto, Canada. pp. 163-196.

Leslie, F. J., and Summerell, A. B. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Professional. Iowa, U.S.A. pp. 278.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Consultado el 26 de Febrero del 2016.

Nelson, P. E., Toussoun, A. T., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium species an illustrated manual for identification*. University Park and London. Pennsylvania State, USA. pp. 185.

The University of Adelaide. 2016. Mycology online. *Fusarium sp.* en: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/) Consultado el 19 de Marzo del 2016.

Ulloa, M. y Hanlin, R. T. 2006. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 672 p.

Watanabe, T. 2010. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC PRESS. Washington, U.S.A. pp. 184-186.