

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Eficiencia *in Vitro* de Métodos de Control Químico y Biológico Sobre  
*Nodulosporium* sp., Asociado a *Theobroma cacao* L.

Por:

**LISVIANA SANTIAGO SANTIAGO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Eficiencia *in Vitro* de Métodos de Control Químico y Biológico Sobre  
*Nodulosporium sp.*, Asociado a *Theobroma cacao* L.

Por:

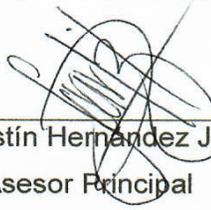
**LISVIANA SANTIAGO SANTIAGO**

TESIS

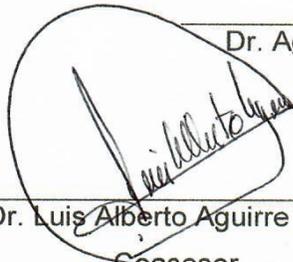
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dr. Agustín Hernández Juárez

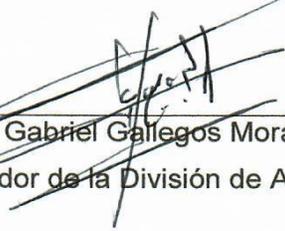
Asesor Principal

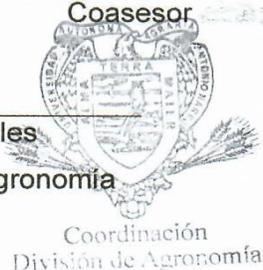
  
Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe

Coasesor

  
Ing. Aideé González Ruiz

Coasesor

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Porque gracias a él estoy aquí en este mundo maravilloso, y me permite cumplir mis sueños y bendecirme siempre.

### **A MI ALMA TERRA MATER**

Gracias por abrirme las puertas, por la oportunidad que me brindaste y el apoyo que siempre hubo para salir adelante.

### **A MIS PROFESORES**

Por compartirme sus conocimientos, experiencias y consejos durante mi paso por las aulas y fuera de ellas, sin duda alguna fueron piezas claves en mi formación profesional, agradezco mucho y de corazón a cada uno de ustedes.

### **A MI ASESOR EL DR. AGUSTIN HERNÁNDEZ JUÁREZ**

Porque ha contribuido mucho en la realización de esta investigación, por el apoyo que me ha brindado y sobre todo por la paciencia y el tiempo que se toma para la revisión de esta investigación, por todo esto muchas gracias.

### **A LA ING. AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ**

Gracias por tu amistad y tu apoyo incondicional en la realización de este trabajo, sin ti no lo hubiese logrado muchas gracias por todo.

### **A LA DRA. MIRIAM SÁNCHEZ VEGA**

Gracias por brindar su tiempo y apoyo incondicional, para que este logro fuera posible.

### **AL DR. LUIS ALBERTO AGUIRRE URIBE**

Gracias por su participación en esta investigación

## DEDICATORIA

**A DIOS** por cuidar mis pasos durante este trayecto de mi vida, para poder cumplir mis metas y sobre todo por las bendiciones que me ha dado siempre.

### **A MIS PADRES**

**Sr. Maclovio Santiago Luna:** Papí gracias por creer en mí y darme el carácter para poder enfrentarme al mundo eres una de las personas que más amo en este mundo, al cual agradezco de todo corazón por tenerte como padre, siempre trato de tomar lo bueno de la vida porque tú, me has enseñado que no importa en qué situaciones estemos Dios siempre está con nosotros, gracias por tu amor y el apoyo que me has dado siempre...*te amo padre.*

**Sra. Elvia Santiago Tomás:** Mamí gracias por todas las enseñanzas y el apoyo que siempre me ha brindado y estar conmigo cuando más la he necesitado, sobre todo por confiar en mí, y alentarme siempre para que no me diera por vencida nunca ha ser la persona que soy ahora, este logro es también suyo madre gracias por todo el amor que siempre me ha dado, *la amo.*

**A mis hermanos Zotico, Verónica, Epifania, Edgar y Vigail:** Hermanos ustedes son y serán siempre mi pilar, porque sé que no importa cuántas veces me equivoque y cuantas veces me caiga ustedes estarán ahí para levantarme como lo han hecho hasta ahora, agradezco también a Dios por tener unos hermanos como ustedes, porque cada uno de ustedes me ha enseñado algo diferente para mi formación personal, éste logro es para cada uno de ustedes porque sin su apoyo no habría cumplido mi sueño, gracias hermanos los amo mucho.

**A Roberto Damián Santiago:** Amor tengo tanto que decirte, primero eres lo mejor que me ha pasado en mí vida te amo tanto y no sé cómo agradecer todo lo que haces por mí, sin ti no hubiese podido seguir en este viaje, sin duda alguna tú fuiste y eres una pieza muy importante en mi formación y superación porque tú me das el ejemplo de lucha, éste trayecto no ha sido fácil, pero tú lo hiciste fácil, porque estabas ahí cuando yo más te necesitaba, tus palabras de aliento, tu apoyo

incondicional secaban mis lágrimas cuando sentía que ya no podía seguir adelante, gracias amor porque confiaste en mí para cumplir éste sueño.

**A mis amigos Diana Luz Hernández, Odelia Martínez, Maximiliano Huerta Y Candelaria Gómez,** gracias por brindarme su amistad y por haberme acompañado en este viaje de conocimientos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE CUADROS .....	x
RESUMEN .....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivo General .....	3
1.1.1. Objetivos Específicos .....	3
1.2. Hipótesis .....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Generalidades de <i>Nodulosporium</i> sp. ....	4
2.1.1. Ubicación Taxonómica .....	5
2.1.2. Descripción Morfológica .....	5
2.1.3. Distribución .....	8
2.1.4. Importancia y daños .....	8
2.2. Métodos de Control de Enfermedades Fungosas en Plantas .....	10
2.2.1. Métodos culturales .....	10
2.2.2. Métodos Físicos .....	11
2.2.3. Métodos Biológicos .....	12
2.2.3.1. Generalidades del uso de agentes biológicos en el control de hongos fitopatógenos.....	12
2.2.3.2. Organismos antagonicos .....	13
2.2.3.3. Microorganismos antagonistas como agentes de control en enfermedades de las plantas.....	13
2.2.3.4. Interacciones Biológicas entre Organismos como Mecanismos de Acción .	13
2.2.3.5. Importancia del uso de agentes biológicos en el control de hongos fitopatógenos.....	14
2.2.4. <i>Trichoderma harzianum</i> .....	16
2.2.4.1. Ubicación taxonómica .....	17
2.2.4.2. Morfología .....	17
2.2.4.2.1. Características macroscópicas .....	17
2.2.4.2.2. Características microscópicas .....	17
2.2.4.3. Biología.....	19

2.2.4.4. Ecología .....	19
2.2.4.5. Principales mecanismos de acción de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	21
2.2.4.5.1. Mecanismos directos.....	21
a) Micoparasitismo .....	21
b) Antibiosis.....	22
c) Competencia por espacio y nutrientes .....	22
2.2.4.5.2. Mecanismos Indirectos .....	22
a) Estimulación del crecimiento .....	22
b) Inducción de resistencia .....	23
2.2.4.5.3. Importancia del micoparasitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> en el control biológico .....	23
2.2.5. <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
2.2.5.1. Ubicación taxonómica .....	25
2.2.5.2. Morfología .....	25
2.2.5.3. Biología.....	27
2.2.5.4. Ecología .....	27
2.2.5.5. Mecanismos de Acción de <i>Bacillus subtilis</i> .....	28
a) Producción de lipopéptidos .....	28
b) Producción de enzimas líticas .....	29
c) Producción de sideróforos .....	30
d) Respuesta sistémica inducida .....	31
2.2.5.6. Importancia de <i>Bacillus subtilis</i> en el control de hongos fitopatógenos.....	32
2.2.6. Métodos químicos.....	33
2.2.6.1. Generalidades del control mediante fungicidas químicos .....	33
2.2.6.2. Tipos de fungicidas.....	34
2.2.6.3. Clasificación de los fungicidas según su uso.....	35
a) Contacto.....	35
b) Sistémicos.....	35
2.2.6.4. Mecanismos de acción .....	36
2.2.6.5. Importancia del uso de productos químicos en el control de hongos fitopatógenos.....	36
2.2.6.6. Ingredientes químicos en el control de hongos fitopatógenos .....	37
2.2.6.6.1. Azoxystrobin (Amistar®) .....	37
2.2.6.6.1.1. Propiedades fisicoquímicas de la formulación .....	37
2.2.6.6.1.2. Mecanismo de acción.....	38

2.2.6.6.1.3. Modo de penetración .....	39
2.2.6.6.2. Clorotalonil (Trevanil 720F).....	39
2.2.6.6.2.1. Características físicas y químicas de la formulación .....	39
2.2.6.6.2.2. Mecanismo de acción.....	40
2.2.6.6.2.3. Modo de penetración .....	41
2.2.6.6.3. Tiabendazol (Tecto® 60).....	41
2.2.6.6.3.1. Propiedades físicas y químicas de la formulación .....	41
2.2.6.6.3.2. Mecanismo de acción.....	41
2.2.6.6.3.3. Modo de penetración .....	42
III. MATERIALES Y METODOS .....	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
4.1. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre <i>Nodulosporium sp.</i> .....	48
4.2. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>Nodulosporium sp.</i> .....	51
4.3. Inhibición <i>in vitro</i> del fungicida azoxystrobin sobre <i>Nodulosporium sp.</i> .....	54
4.4. Inhibición <i>in vitro</i> del fungicida clorotalonil sobre <i>Nodulosporium sp.</i> .....	55
4.5. Inhibición <i>in vitro</i> del fungicida tiabendazol sobre <i>Nodulosporium sp.</i> .....	57
V. CONCLUSIÓN.....	60
VI. LITERATURA CITADA .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Conidióforo y conidios del tipo <i>Nodulosporium</i> sp. ....	7
<b>Figura 2.</b> Conglomerados peritesoides cubiertos por conidióforo de <i>Nodulosporium</i> sp. ....	7
<b>Figura 3.</b> Características microscópicas de <i>T. harzianum</i> . ....	18
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en medio de cultivo PDA. ....	18
<b>Figura 5.</b> Colonias de <i>B. subtilis</i> en PDA. ....	26
<b>Figura 6.</b> Morfología de colonias de <i>B. subtilis</i> . ....	26
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción de azoxystrobin, para inhibir la respiración en las mitocondrias ....	38
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de acción de clorotalonil, actividad de contacto multisitio. ....	40
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de acción de tiabendazol, inhibidores de la mitosis y la división celular. ....	42

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos para evaluar el efecto inhibitorio in vitro sobre <i>Nodulosporium</i> sp. con fungicidas comerciales.....	46
<b>Cuadro 2.</b> Diámetro de micelio, porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium</i> sp., en medio PDA con <i>Trichoderma harzianum</i> a 7 días de evaluación. ....	49
<b>Cuadro 3.</b> Medias del crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Nodulosporium</i> sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación. ....	50
<b>Cuadro 4.</b> Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Nodulosporium</i> sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación. ....	51
<b>Cuadro 5.</b> Diámetro de crecimiento, porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium</i> sp., en medio PDA con <i>Bacillus subtilis</i> a 7 días de evaluación. ....	52
<b>Cuadro 6.</b> Medias del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Nodulosporium</i> sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.....	52
<b>Cuadro 7.</b> Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Nodulosporium</i> sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación. ....	53
<b>Cuadro 8.</b> Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium</i> sp., en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida azoxystrobin a 7 días de evaluación. ....	54
<b>Cuadro 9.</b> Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium</i> sp., en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida clorotalonil a 7 días de evaluación. ....	56
<b>Cuadro 10.</b> Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium</i> sp., en medio PDA a diferentes concentraciones con el fungicida tiabendazol a 7 días de evaluación.....	57
<b>Cuadro 11.</b> Concentración inhibitoria y límites fiduciales de fungicidas químicos aplicados a <i>Nodulosporium</i> sp., en medio PDA a 7 días de evaluación. ....	59

## RESUMEN

El cacao es un cultivo originario de México, con alta importancia cultural y económica, principalmente para la producción de chocolate, cuya producción se concentra principalmente en el sur de México, en los estados de Tabasco y Chiapas. Uno de los problemas más importantes y de mayor impacto para la producción de cacao son las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, principalmente dos especies, *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* (Agaricales: Marasmiaceae) con pérdidas de hasta 80% en la producción. Recientemente, en el estado de Chiapas se observaron frutos de cacao, con daños típicos de pudrición con esporulación en forma de polvo blanco, manchas de color chocolate y con forma de giba, típicas de moniliasis, no obstante; se encontró asociada a esta, el hongo *Nodulosporium* sp., el cual se ha reportado como fitopatógeno en otras plantas de importancia. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia *in vitro* de los productos químicos azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol y los agentes de control biológico *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* para el control del hongo *Nodulosporium* sp. Se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de *T. harzianum* y *B. subtilis* sobre *Nodulosporium* sp., el tiempo en el que el antagonista-fitopatógeno entraron en contacto y se calculó el porcentaje de crecimiento radial y porcentaje de inhibición del crecimiento radial, además del tipo de antagonismo para *T. harzianum* con base en la escala de Bell. El efecto inhibitorio de *Nodulosporium* sp. por los fungicidas comerciales azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol se evaluó en 8 concentraciones en cada uno, además de un tratamiento testigo sin fungicida (0 ppm). La evaluación consistió en medir el crecimiento micelial, en dos ejes (horizontal y vertical) del fitopatógeno, cada 24 horas, hasta el llenado del testigo y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, se determinó los valores de la concentración inhibitoria al 50 y 90% (CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub>) y sus límites fiduciales al 95% de confiabilidad mediante un análisis Probit. Con ambos métodos de control, se realizó un análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos con una prueba de rango múltiple de Tukey (P<0.05) para determinar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento micelial y porcentaje

de inhibición. El control biológico del fitopatógeno *Nodulosporium* con el antagonista *B. subtilis* y *T. harzianum* en confrontación ejercen un efecto inhibitorio significativo sobre el fitopatógeno con 71.86 y 69.93% respectivamente; mientras que los antagonistas expresaron su crecimiento sin dificultad, incluso *T. harzianum* sobrecreció al patógeno y lleno por completo la superficie del medio de cultivo, ubicándose en la clase 1 de antagonismo de Bell. *Nodulosporium* sp., presento susceptibilidad a la acción de los fungicidas azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol adicionados en medio PDA. El tiabendazol fue más efectivo; con 2.5 ppm inhibe el crecimiento micelial del hongo, seguido por el clorotalonil que a 1000 ppm ya no permite el crecimiento del hongo y azoxystrobin, aunque menos efectivo ya que requiere concentraciones altas arriba de 1000 ppm para tener un buen control. Los productos químicos azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol y los agentes de control biológico *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* son eficientes para el control *in vitro* del hongo *Nodulosporium* sp.

**Palabras claves:** Azoxystrobin, *Bacillus subtilis*, clorotalonil, *Nodulosporium* sp., fitopatógenos, fungicidas, tiabendazol, *Trichoderma harzianum*.

## I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) proviene de *Theobroma*; vocablo griego que significa “alimento de los dioses”, sin embargo, la palabra cacao deriva del maya *cacau*; *cac* que significa rojo y *cau* que significa fuerza y fuego. Los mayas, dieron a conocer el cacao al pueblo azteca, el cual a su vez adopto su cultivo y empezó a consumirlo en forma de bebida hecha con cacao molido, agua y miel; a la que se le llamo *xocolatl*, que significa en náhuatl “agua espumosa” (Avendaño *et al.*, 2011).

De los beneficios más destacados y controvertidos del cacao podemos destacar los radicales libres y los antioxidantes, el polvo de cacao crudo contiene más de 300 compuestos químicos diferentes y casi cuatro veces el poder antioxidante del chocolate oscuro promedio; además contiene proteína, calcio, caroteno, tiamina, riboflavina, magnesio y sulfuro. Otros beneficios complementarios, son la anandamida, endorfinas, feniletilamina y serotonina, los cuales afectan directamente al cerebro, relacionados a la felicidad, bienestar y buen humor del ser humano (SIAP, 2017).

Se estima que la producción anual en México asciende a las 27 mil toneladas de producto, con un valor mayor a los mil millones de pesos; producción concentrada principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas (SIAP, 2017).

Los estados de Tabasco y Chiapas producen el 99.45% del total nacional del cacao; el primero con mayor superficie de cultivo, aproximadamente 40,887 hectáreas y una producción de 13,383 toneladas; mientras que Chiapas con una superficie sembrada de 16,782 hectáreas y una producción de 5,247 toneladas (SIAP, 2018). La superficie dedicada a este cultivo, así como la producción anual sea reducido considerablemente, tal es el caso, que en el 2002 se reportó una producción de 46,194 ton de cacao seco y para 2010, apenas se produjeron 19,000 toneladas y el

rendimiento promedio por ha se estimó en 300 Kg (Plan Rector Cacao Chiapas, 2012).

En el Estado de Chiapas, este cultivo ocupa el sexto lugar en superficie cultivada, y se distribuye principalmente en cuatro regiones agroeconómicas del estado: Soconusco, Norte, Centro y Selva Palenque; con gran importancia desde el punto de vista ecológico, económico, cultural e histórico (Plan Rector Cacao Chiapas, 2012).

De los principales problemas fitosanitarios, las enfermedades son el factor biótico de mayor impacto para la producción de cacao en el mundo y Latinoamérica. En Centroamérica, las bacterias, los virus y los nematodos no causan problemas significativos, sin embargo; los hongos y principalmente dos especies del orden Agaricales, familia Marasmiaceae destacan por su importancia, la moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora roreri* y la escoba de bruja *Moniliophthora perniciosa*. Estas dos enfermedades pueden causar pérdidas de hasta el 80% de los frutos, y han sido la causa del abandono de muchos cacaotales en Centroamérica. Le sigue en importancia la mancha negra, causada por organismos del género *Phytophthora* sp. (Peronosporales: Peronosporaceae) responsable de graves pérdidas en la producción. La mancha negra puede atacar diferentes partes de la planta de cacao, pero, al igual que la moniliasis, su mayor impacto se da en los frutos, que son el órgano de interés comercial por contener las semillas con que se hace el chocolate (Phillips y Bustillos, 2009).

Además de los patógenos antes mencionados, para la zona del Soconusco se han observado mazorcas de cacao con características típicas de pudrición con esporulación en forma de polvo blanco, manchas de color chocolate y con forma de giba, asociada al hongo *Nodulosporium* sp. (González, 2018, Comunicación personal), además de que este hongo se ha reportado como fitopatógeno en otras plantas de importancia (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2003; De la Torre-Almaráz *et al.*, 2009).

## **1.1. Objetivo General**

Evaluar la eficiencia *in vitro* de métodos de control químico y biológico sobre *Nodulosporium* sp.

### **1.1.1. Objetivos Específicos**

Evaluar la eficiencia *in vitro* de tres productos químicos de control sobre el hongo *Nodulosporium* sp.

Evaluar la eficiencia *in vitro* de dos agentes de control biológico sobre el hongo *Nodulosporium* sp.

## **1.2. Hipótesis**

- a). Se espera que el control químico presente un control de 80% de *Nodulosporium* sp.
  
- b). Se espera que el control biológico presente un control de 50% de *Nodulosporium* sp.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades de *Nodulosporium* sp.

El género *Hypoxylon* Bull., está delimitado por cuatro caracteres principales: anamorfos *Nodulosporium* Preuss., como el criterio principal para reconocer un hongo Xylariaceae como miembro de Hypoxyloideae, estromata unipartite tejido estromal por debajo de la capa peritecial sólido y homogéneo y estromata no en posición vertical, es decir; con una altura menor que la longitud y la anchura (Rogers *et al.*, 2018).

*Hypoxylon* difiere de los géneros en Xylarioideae como *Nemania* Gray., que tiene anamorfos tipo *Geniculosporium* Chesters y Greenhd., *Biscogniauxia* Kuntze y *Camillea* Fr., que tienen estromas bipartitos, *Daldinia* Ces. y De Not., que tiene anillos concéntricos, *Entonaema* A. Möller que tiene una cavidad hueca revestida con tejido gelatinoso y *Rhopalostroma* D. Hawksw., que tiene stipitate estromata (Rogers *et al.*, 2018).

De los hongos Ascomycetes de la familia Xylariaceae, *Hypoxylon*, después de *Xylaria* Hill ex Schrank., es el género con mayor número de especies en el territorio mexicano (San Martín, 1992). La revisión mundial del género por Ju y Rogers (1996) y el trabajo de Van der Gucht *et al.* (1997), arrojan un total de 121 especies, de tal manera que México con 41, cuenta con 34% de esa cantidad global. El número de componentes de *Hypoxylon* presentes en el país debe ser mayor si se considera que no se ha explorado micológicamente de una manera minuciosa, ni la mitad del territorio de la República. Por lo anterior es de esperarse la existencia en México de especies ya citadas de otras latitudes y por supuesto también de otras nuevas para la ciencia (Van der Gucht *et al.*, 1997).

### 2.1.1. Ubicación Taxonómica

*Hypoxylon* se encuentra clasificado según (Bull., 1791) como:

**Reino:** hongos

**División:** Ascomycota

**Clase:** Euascomycotina

**Subclase:** Pyrenomycetes

**Orden:** Xylariales

**Familia:** Xylariaceae

**Género:** *Hypoxylon* Bull.

### 2.1.2. Descripción Morfológica

*Hypoxylon* tiene estrecha afinidad con *Entonaema* y *Daldinia* debido a que comparte con ellos la conexión anamórfica del tipo *Nodulosporium* sp., y caracteres teleomórficos como la presencia de pigmentos estromáticos, la morfología del anillo apical de las ascas (más ancho que alto), el episporio conspicuo y generalmente dehiscente en KOH a 10%, así como la localización de la línea germinal por lo regular dorsal y recta, raramente sigmoide o espiral, en las ascosporas (Ju et al., 1997; San Martín et al., 1999).

Los anamorfos de *Hypoxylon* son atribuibles al género de forma *Nodulosporium* sp., para facilitar la comunicación, *Nodulosporium* sp., se subdivide en cuatro tipos, basados en los patrones de ramificación de las estructuras conidiógenas en listadas en orden ascendente de complejidad: *Sporothrix* Hektoen y CFP Perkins., *Virgariella* S. Hughes, *Nodulosporium* y *Periconiella* (G. Winter) Sacc. El género *Nodulosporium* presenta conidióforos simples a menudo septados, (Figura. 1) sin un eje dominante con ramificaciones dicotómicas o no ramificadas, ramas adicionales que surgen del primer nivel y segundo nivel de regiones conidiógenas,

ramas que terminan con tres o cuatro células conidiógenas que surgen en espirales del eje principal y/o de ramas principales o de ramas subordinadas adicionales, este proceso de producción de conidiógenas suelen continuar varias veces, puede dar lugar a varios niveles de regiones conidiógenas quedando una o dos en cada término, pero con conidióforos originales y ramas adicionales que dan como resultado una estructura más compleja y espesa, no obstante, *Periconiella* al igual que *Nodulosporium* tienen la tendencia a producir más de dos células conidiógenas en cada extremo de la rama. Son similares en la producción frecuente de ramas adicionales, pero difieren en que la última es más simple en su ramificación (Rogers *et al.*, 2018).

*Nodulosporium sp.*, presenta colonia micelial blanquecina y aspecto algodonoso con anillos concéntricos, adquiriendo una coloración ligeramente verdosa y al final pardo claro, crecimiento conglomerado de micelio que forma cuerpos globosos oscuros, en cuyo interior hay ascas y ascosporas con masa micelial pardo claro que contiene conidióforos y conidios hialinos, con forma elipsoidal y un extremo truncado, con medidas de 5.14- 6.66 × 4.13-4.86 mm. Estroma aglomerado o pulvinado formando peritecios globosos negros y labios periteciales conspicuos, (Figura. 2) superficie negra brillante, de consistencia serosa. Los peritecios globosos a subglobosos miden de (0.32-0.48 mm de diámetro) con ostiolos umbilicados con gránulos rojizos a negruzcos dispersos inmediatamente bajo la gruesa capa peritecial y entre las paredes, las ascas miden entre 153.1-173.37 µm de longitud total, de 10.2-12.83 µm de anchura, la parte del alineamiento de esporas de 82.37-99.96 µm y el tallo de la asca de 59.08-83.36 µm de longitud, las ascosporas son pardo-oscuro, unicelulares, elipsoides inequilaterales, con extremos ligeramente redondeados (De la Torre-Almararáz *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Conidióforo y conidios del tipo *Nodulosporium* sp.



**Figura 2.** Conglomerados peritesoides cubiertos por conidióforo de *Nodulosporium* sp.

### 2.1.3. Distribución

Xylariaceae es la familia más grande del orden Xylariales y una de las familias más grandes de Ascomycota. Aunque su distribución es cosmopolita, su mayor diversidad se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales (Sir *et al.*, 2002).

Los miembros del género *Nodulosporium* se encuentran como saprófitos o patógenos débiles en madera de árboles de clima templado o principalmente tropical o como endófitos (quizás en simbiosis mutualista) en los tejidos internos de plantas leñosas o herbáceas (San Martin *et al.*, 1999).

Las especies de *Hypoxylon* con aspecto hipoxiloide presentan una gran diversificación en los trópicos y subtrópicos, variando entre especies patógenas muy dañinas a especies endofíticas. Algunas crecen en madera muerta de un hospedante específico, mientras que otras lo hacen sobre un amplio rango de sustratos (Hladki *et al.*, 2009).

### 2.1.4. Importancia y daños

En el encino o roble *Quercus* L. (Fagaceae), el género *Hypoxylon* presenta mayor distribución dentro de las plantas leñosas en el mundo, formando parte importante de las masas arboladas de las regiones montañosas. Este género se distribuye ampliamente en el nuevo mundo desde el sur de Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba (Nixon, 1998; Valencia, 2004). Las especies del género *Quercus* son de excepcional valor por la calidad de su madera, así como por otros muchos de sus usos y productos, entre ellos: leña, carbón, uso artesanal, corcho, taninos, colorantes, alimento para el hombre y el ganado (Nixon, 1998; Valencia, 2004).

*Hypoxylon* sp., presente en casi toda la república mexicana, causa daños muy significativos en los pinos, encinos y robles y provoca muerte descendente, principalmente en los estados de Colima, Guanajuato, Jalisco, Nayarit y Aguascalientes (Moreno-Rico *et al.*, 2010).

Los síntomas que provoca es una pudrición blanquecina de la albura y con ello canchales de diferentes dimensiones en los encinos afectados, sobre todo en la base del tallo. La madera al inicio presenta manchas húmedas, posteriormente son secas y en los márgenes se observan líneas oscuras. También, causa amarillamiento, marchitamiento y caída de las hojas, muerte descendente de las ramas y finalmente, declinamiento y muerte del árbol, principalmente los que se encuentran debilitados por sequía u otros factores abióticos y bióticos (Downer, 2006; Swiecki y Bernhardt, 2006).

Poco se conoce sobre la actividad de este hongo relacionado con la muerte de encinos en México. En la sierra fría de Aguascalientes, Romo *et al.* (2007) reportaron la presencia de ascomas de *Hypoxylon* spp., en los tallos de *Quercus obtusata* Bonpl. y *Quercus potosina* Trel. Sin embargo, no identificaron la especie del hongo y no relacionaron su presencia con síntomas en los árboles. En un estudio realizado en la Sierra de Lobos, Gto., Vázquez *et al.* (2004) encontraron que los principales agentes biológicos responsables de la declinación de los bosques de encino son el efecto combinado de *Nectria galligena* (Bres.) Rossman y Samuels., e *Hypoxylon thouarsianum* (Lév.) Lloyd., quienes actúan en sinergia y causan una fuerte micosis en los encinos con un comportamiento agresivo.

En 2001, plantas de mezquite (*Prosopis laevigata* L.) con muerte descendente de ramas, fueron observadas en la reserva de la Biosfera de Tehuacán Puebla, se encontró ramas con daños, en el cual se desarrolló un hongo de color pardo claro que produjo conidióforos y conidios hialinos, verdosos, elipsoides con un extremo truncado. En el estroma pulvinado y aglomerado hubo masas de peritecios negros conspicuos y globosos. Las ascosporas son pardo-oscuro, unicelulares, elipsoides desiguales, con extremos redondeados y un tubo germinativo a lo largo de la espora. El hongo fue identificado como *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm y su anamorfo como una especie del tipo *Nodulosporium* (De la Torre-Almararáz *et al.*, 2009).

## **2.2. Métodos de Control de Enfermedades Fungosas en Plantas**

Las medidas aplicadas de manejo del patosistema, relacionado con hongos en plantas, casi en su totalidad son métodos de control que se utilizan antes de que las plantas enfermen, es decir, los métodos son preventivos y no curativos. Los métodos de control se clasifican de acuerdo con ciertos principios fundamentales derivados del conocimiento de la causa y desarrollo de la enfermedad. Toda enfermedad infecciosa tiene variabilidad de acuerdo a los fitopatógenos en la naturaleza, particularmente los hongos. El control de la enfermedad se puede lograr mediante un sólo procedimiento, pero en la mayoría de los casos exige la utilización de medidas múltiples e implica un programa integrado de manipulación del ambiente y de los factores culturales, biológicos, físicos y químicos. Parámetros epidemiológicos que gobiernan su avance o desarrollo como son la cantidad de inóculo inicial, la tasa de infección y el tiempo. Esto quiere decir que los métodos de control de las enfermedades, deben tener efecto sobre esos parámetros, particularmente el inóculo inicial y la tasa de infección (Achicanoy, 2001).

### **2.2.1. Métodos culturales**

Los métodos culturales se basan en las actividades del agricultor o labores de cultivo destinadas a evitar que el patógeno establezca relación con el hospedero y comprenden principalmente medidas de reducción del patógeno y el suministro de condiciones desfavorables para el patógeno. En las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, generalmente la reducción del hospedero no resulta fructífera; en ocasiones, la eliminación de plantas voluntarias, de malezas y hospederos alternos es suficiente para reducir considerablemente el inóculo, así como la rotación de cultivos y el saneamiento. En ciertos casos, en las enfermedades virales y algunas bacteriales, la destrucción de las plantas infectadas y las sospechosas, es una medida exitosa para eliminar patógenos (Achicanoy, 2001).

### **2.2.2. Métodos Físicos**

Los métodos físicos para el control de las enfermedades contribuyen a erradicar el patógeno o a reducir su cantidad y comprenden medidas que utilizan temperaturas altas o bajas y, el uso de las radiaciones (Achicanoy, 2001).

El tratamiento de calor permite preservar la micro flora antagónica y se logra mediante vapor aireado a presión, con una temperatura entre 60 y 82°C durante 30 minutos que destruye semillas de maleza, nematodos, algunos oomicetos y la mayoría de las bacterias y hongos fitopatógenos localizados principalmente en los primeros 15 cm de la superficie del suelo (Achicanoy, 2001).

Otra estrategia de control físico es la solarización, que consiste en cubrir el suelo húmedo con plástico (generalmente transparente) durante la época soleada con el objetivo de elevar la temperatura de los primeros 10 o 15 cm del suelo a niveles letales para la mayoría de los fitopatógenos del suelo, incluyendo insectos y malezas. El período de tratamiento debe ser mayor a 4 semanas (Achicanoy, 2001).

Además, la práctica de acolchado, consiste en elevar la temperatura alrededor de 52°C en los primeros 5 cm de la superficie eficiente y es ampliamente utilizada para control de fitopatógenos del suelo y de material de propagación (Achicanoy, 2001).

En postcosecha, se utilizan para el control de enfermedades principalmente la refrigeración, que consiste tratar los productos carnosos durante el transporte y almacenamiento. Las temperaturas cercanas al punto de congelación, inhiben o retardan el desarrollo de los patógenos. De igual forma se sabe que varios tipos de radiaciones electromagnéticas (luz ultravioleta UV, rayos X y rayos  $\gamma$ ) y radiaciones particuladas (partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ), eliminan los patógenos de productos de post cosecha particularmente frutos y hortalizas (Achicanoy, 2001).

### **2.2.3. Métodos Biológicos**

#### **2.2.3.1. Generalidades del uso de agentes biológicos en el control de hongos fitopatógenos**

El control biológico se define como la utilización de microorganismos naturales o modificados, para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos benéficos para las plantas (Pérez, 2004). La mayoría de los microorganismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. En los últimos años el empleo de bacterias y hongos antagonistas de enfermedades agrícolas ha cobrado una singular importancia, debido a que no solo actúan contra un grupo determinado de microorganismos fitopatógenos (como lo hacen los plaguicidas químicos), sino que se están utilizando para un grupo muy amplio de microorganismos fitopatógenos (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

Aunque el control biológico no pretende reemplazar completamente los sistemas de control químico, puede ser utilizado junto con otras técnicas como parte de un sistema integrado de control y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción existentes actualmente. El control biológico depende de un funcionamiento efectivo del microorganismo antagonista apropiado para cada ecosistema particular planta-patógeno (Pérez, 2004).

Es necesario mencionar que el control biológico tiene un potencial enorme, pero se necesita una investigación mayor sobre este tema para lograr un control efectivo, no hay que olvidar que el control biológico tiene propiedades y requerimientos muy distintos a los métodos de control tradicionales, y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción existentes actualmente (Rubio y Fereres, 2005).

### **2.2.3.2. Organismos antagónicos**

El control de los fitopatógenos se puede lograr biológicamente en forma total o parcial, mediante el uso de organismos biocontroladores antagónicos (que reducen la cantidad de inóculo, causan inhibición o lisis, es decir, muerte), y por lo general ocurre en la naturaleza. Hiperparasitismo son el mico parasitismo, los bacteriófagos y los hongos nematófagos (depredación). El mico parásito del género *Trichoderma* particularmente la especie *T. harzianum*, es la alternativa de control biológico más importante en las enfermedades del suelo; igualmente los géneros *Gliocladium* Corda y *Paecilomyces* Samson, se han reportado como antagonistas. Entre las bacterias se tiene los géneros *Bacillus* Cohn., y *Pseudomonas* Migula (Achicanoy, 2001).

### **2.2.3.3. Microorganismos antagonistas como agentes de control en enfermedades de las plantas**

Varios tipos de microorganismos (hongos, bacterias y virus) se han descrito como agentes de control biológico de enfermedades en cultivos. Prácticamente todas las plagas y enfermedades son afectadas en alguna medida por organismos antagonistas, en muchos casos estos entes biológicos representan el factor más importante en la regulación de las poblaciones de microorganismos fitopatógenos en la naturaleza (Pérez, 2004; Ezziyyani *et al.*, 2006; Mondino y Vero, 2006).

### **2.2.3.4. Interacciones Biológicas entre Organismos como Mecanismos de Acción**

Los organismos al convivir en una determinada área establecen interacciones en función de su sobrevivencia a lo que se le conoce también como interferencia y expresa el detrimento de sus funciones vitales; dentro de esto se encuentra implicada la competencia como una de las interacciones biológicas más común entre los organismos. En la naturaleza existe una continua interacción entre los microorganismos fitopatógenos y sus antagonistas, de forma tal que ellos ayudan a la regulación natural de las enfermedades. En condiciones naturales los

microorganismos están en una proporción dinámica en la superficie de las plantas. No es fácil establecer con precisión los mecanismos que actúan en las interacciones entre los microorganismos antagonistas y los fitopatógenos sobre la planta. En general, los antagonistas tienen varios modos de acción y la combinación de estos son importantes para poder elegir un antagonista ideal. Si estos poseen diversos modos de acción, se reducen los riesgos de que los fitopatógenos adquieran resistencia, lo cual se logra mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción. Así, se han descrito varios mecanismos entre los cuales esta: colonización e inoculación, antagonismo, antibiosis, competencia, fungistasis, transmisión de hipovirus, resistencia sistémica adquirida, micoparasitismo y mecanismos combinados mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Rubio y Fereres, 2005; Mondino y Vero, 2006; Ezziyani *et al.*, 2006).

#### **2.2.3.5. Importancia del uso de agentes biológicos en el control de hongos fitopatógenos**

Los agentes bióticos o abióticos son capaces de alterar el normal funcionamiento de las plantas, con distintas enfermedades, y provocar según la severidad de estas la muerte de los organismos vegetales. Dentro de los agentes bióticos, entre los distintos fitopatógenos, los hongos constituyen uno de los principales grupos tanto por la diversidad de especies existentes, como por las pérdidas que originan, que constituyen más de un tercio en los cultivos de gran importancia económica mundial (Andrés *et al.*, 1988).

La manera de combatir tales pérdidas, basada tradicionalmente en el empleo de compuestos químicos (control químico) se caracteriza por una elevada eficiencia, económica, rápida en el control, pero también por producir una toxicidad inespecífica que elimina junto con los organismos fitopatógenos, otros organismos benéficos, producir resistencia y generar un gran impacto ambiental. Los inconvenientes que presenta el control químico, además, se han potenciado en los

últimos años debido al cambio en los sistemas de cultivo (monocultivo, explotaciones intensivas, etc.) (Rey *et al.*, 2000).

Este hecho, unido a la necesidad creciente de una mejora en la productividad de los cultivos, consecuencia de un aumento de la población, a una mayor concientización social ante el enorme deterioro medioambiental que supone la utilización masiva de compuestos químicos, la exigencia por parte de los consumidores en la mejora de la calidad de los alimentos y el compromiso de los gobiernos en la reducción de estos productos, han provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos. Una de estas alternativas o un complemento al uso de pesticidas químicos en la protección de los cultivos, lo constituye el control biológico que incluye estrategias y métodos para controlar las enfermedades a través de la actividad de organismos vivos distintos al hombre (Melgrejo y De Cal, 2006).

Los hongos como agentes de control biológico juegan un papel muy importante en el control de enfermedades. De esta forma, han sido aplicados con éxito frente a insectos (micoinsecticidas), malas hierbas (micoherbicidas), nematodos (miconematicidas), bacterias (micobactericidas) y hongos (micofungicidas), existiendo estos productos comerciales en distintas partes del mundo. A pesar de que hay otros tipos de agentes de biocontrol, tienen ventajas frente a los otros organismos: la mayoría de especies fúngicas, tienen la capacidad de infectar directamente al hospedero por penetración de su capa externa, mientras que los virus y bacterias deben de ser ingeridos (en el caso del control de insectos) para ser efectivos; por otra parte la diversidad genética de los hongos permite conseguir distintos agentes de biocontrol desde una especie fúngica, además frente a las bacterias tienen un mayor potencial como antagonistas por su crecimiento hifal que les permite una mayor y más rápida dispersión en el suelo y en la rizósfera (Whipps, 2001; Chincholkar y Mukerji, 2007).

#### **2.2.4. *Trichoderma harzianum***

El género *Trichoderma* fue introducido por Persoon hace casi 200 años y consiste de hongos anamórficos aislados principalmente del suelo y de materia orgánica en descomposición (Grondona *et al.*, 1997). Este género comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente. Pertenece al grupo de hongos deuteromicetes u hongos imperfectos, al orden hifales (moniliales) y se caracteriza por presentar conidióforos hialinos, muchas veces blanquecinos, no verticilados, fiálides simples o en grupos, conidias hialinas, unicelulares ovoides que yacen en pequeños racimos terminales, se les reconoce fácilmente por su rápido crecimiento y el color verde de las conidias. En su estado vegetativo presentan un micelio o septos simples. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Son anaerobios facultativos y se reproducen asexualmente por conidios. Las hifas que llevan las esporas o conidióforos son ramificadas (Barnett y Hunter, 1972; Atlas y Bartha, 1992; Alexopoulos *et al.*, 1996; Hermosa *et al.*, 2000; Rodríguez y Verónica, 2002; Harman *et al.*, 2004).

Las especies de este género (en su mayoría micoparasíticas), son las antagonistas más utilizadas para el control de enfermedades producidas por hongos debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en varios sustratos, combate una amplia variedad de hongos fitopatógenos responsables de la mayoría de las enfermedades en cultivos, pero sobretodo porque no ataca plantas superiores (De la Cruz *et al.*, 1995; Vázquez- Garcidueñas *et al.*, 1998; Rey *et al.*, 2000; Howell, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004).

#### **2.2.4.1. Ubicación taxonómica**

*Trichoderma harzianum* se encuentra clasificado con base en Mycobank (2018):

**Reino:** Fungi

**División:** Ascomycota

**Subdivisión:** Pezizomycotina

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Hypocreaceae

**Género:** *Trichoderma*

**Especie:** *Trichoderma harzianum* Rifai

#### **2.2.4.2. Morfología**

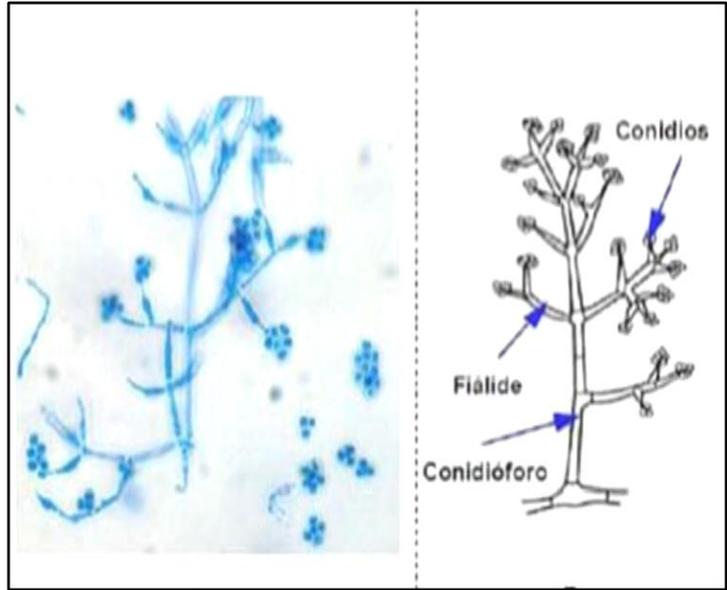
##### **2.2.4.2.1. Características macroscópicas**

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas- verdes, amarillo- verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos (Barnett y Hunter, 1972; Arango *et al.*, 1988).

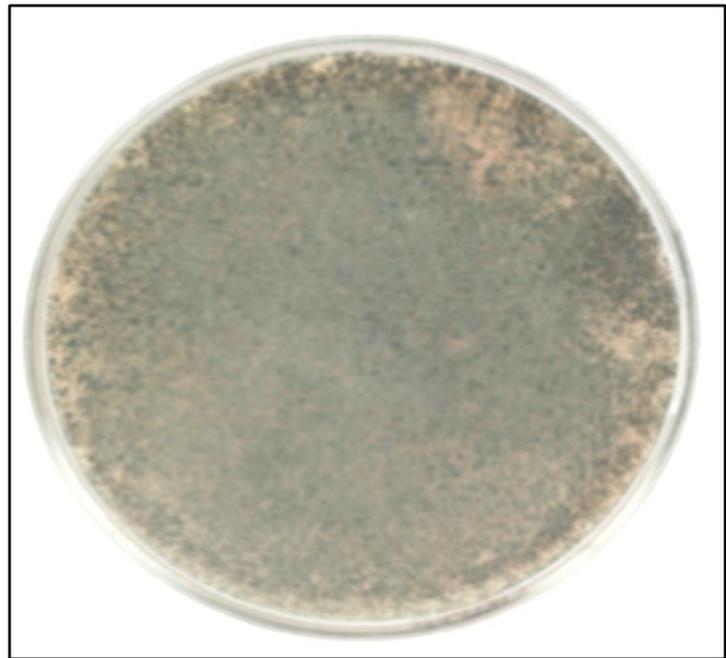
El revés de las colonias es usualmente no coloreado, (Figura. 4) amarillo, ámbar o amarillo- verde, y muchas especies producen grandes cantidades de clamidosporas en cultivos sumergido (Howell, 2003).

##### **2.2.4.2.2. Características microscópicas**

Los conidióforos son erectos, hialinos, en las mayorías ramificadas, no verticiladas, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos, (Figura. 3) hinchadas en la región central pero delgadas hacia el ápice; son unicelulares sub-globosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Barnett y Hunter, 1972; Arango *et al.*, 1988).



**Figura 3.** Características microscópicas de *T. harzianum*.



**Figura 4.** Crecimiento de *T. harzianum* en medio de cultivo PDA.

#### **2.2.4.3. Biología**

*Trichoderma* sp., es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprófito o parásito, propiedades que benefician su actividad antagónica, es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de la superficie de raíces de varias plantas de madera y parasita estructuras de diferentes hongos patógenos debido a la competencia por nutrientes y micoparasitismo (Camargo, 2005).

Las colonias de *Trichoderma* presentan crecimiento rápido, y forman una colonia delgada sobre la superficie del agar, debido a la condición que presenta a través de su desarrollo. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan penachos blancos y algodonosos, de micelio blanco, conformando una red densa, responsable del pigmento característico (Barnett, y Hunter, 1982).

Las especies del genero *Trichoderma* presentan conidióforos complejos y altamente ramificados en forma piramidal o cónica dando origen a estigmas, con extremos ahusados. Al microscopio las fiálides se observan más estrechas en la base que en la parte superior, que permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de estas (Barnett y Hunter, 1982).

La abundancia de *Trichoderma* spp. en varios suelos, junto con la habilidad para degradar varios sustratos orgánicos, su versatilidad metabólica y su resistencia a inhibidores microbianos, sugiere que este hongo puede poseer la habilidad para sobrevivir en varios nichos ecológicos, pero depende de las condiciones que prevalezcan y sobre las especies involucradas (Riegel y Nielsen, 1996).

#### **2.2.4.4. Ecología**

El micelio y las esporas de resistencia de varios hongos fitopatógenos del suelo son invadidos y parasitados o bien lisados por otros hongos, que por regla general no son fitopatógenos. Entre los hongos micoparásitos más comunes se destaca *Trichoderma* sp., principalmente *T. harzianum*, que ha demostrado parasitismo

sobre micelio de *Rhizoctenia* sp., DC y *Sclerotinia* sp., (Lib.) De Bary, e inhibe el crecimiento de muchos otros hongos, como *Pythium* sp., Pringsheim, *Fusarium* sp., y *Fomes* sp., (Fr.) P. y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de esos patógenos (Agrios, 2004; Kredics *et al.*, 2003).

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitats, especialmente en aquellos que contiene materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivo, especialmente en aquellos que son atacados por hongos (Grondona *et al.*, 1997; Stefanova *et al.*, 1999; Zago *et al.*, 2001). Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Domsch *et al.*, 1980).

Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos le confiere a este hongo la disponibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica. Aparte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* sp., ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Varios autores reportan algunos mecanismos, con los cuales *Trichoderma* sp., actúan como biocontrolador y como colonizador de raíces, como son: micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta al ayudar al desarrollo del sistema radicular, mejora la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y genera resistencia inducida. Es importante resaltar que, de estos, los primeros cuatro mecanismos mencionados tienen acción directa sobre el hongo fitopatógeno, los otros son indirectos, ya que su acción es impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta (Grondona *et al.*, 1997; Altomore *et al.*, 1999; Carsolio *et al.*, 1999, Kullnig *et al.*, 2000).

*Trichoderma* sp., presenta diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, además de esto produce una gran cantidad de enzimas inducibles en presencia de hongos fitopatógenos. De las enzimas extracelulares producidas por *T. harzianum*, tres diferentes enzimas con actividad quitinolítica se han purificado y parcialmente caracterizado: N- acetil glucosamidasa, quitobiosidasa y endoquitinasa (Margolles-Clark *et al.*, 1996; Garisto y Harman, 2001).

#### **2.2.4.5. Principales mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum***

Los modos de acción de estos hongos antagonistas pueden resumirse en mecanismos directos, que engloban el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia; e indirectos, que incluyen la estimulación del crecimiento y la inducción de resistencia vegetal a estrés biótico y abiótico. Todos estos mecanismos pueden darse de forma simultánea en un mismo aislado, y no se excluye ninguno de ellos. De la eficacia de cada uno de ellos o de su combinación dependerá el éxito en la supresión de la enfermedad (Benítez *et al.*, 2004).

##### **2.2.4.5.1. Mecanismos directos**

###### **a) Micoparasitismo**

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al hospedero. *Trichoderma* spp., pueden ejercer control directo por el rango de parasitismo de hongo, detectando otros hongos y creciendo sobre el (Benítez *et al.*, 2004).

El proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas, comienza por el crecimiento quimiotrófico hacia el hospedero, estimulado por las moléculas procedentes del mismo (Chet *et al.*, 1981). Los hongos del genero *Trichoderma* se adhiere con carbohidratos unidos a lectinas en la pared celular del patógeno (Howell, 2003). El paso siguiente consiste de la producción de,

peptaiboles y enzimas hidrolíticas (Howell, 2003), lo cual facilita la entrada de la hifa de *Trichoderma* dentro del lumen del hongo parasitado y la asimilación del contenido de la pared celular (Benítez *et al.*, 2004).

#### **b) Antibiosis**

La antibiosis ocurre durante la interacción de los compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Howell *et al.*, 1998).

*Trichoderma harzianum* es capaz de segregar una gran cantidad de compuestos antimicrobianos capaces de afectar a los fitopatógenos. Estos metabolitos secundarios, que pueden ser tanto volátiles como no volátiles, pueden actuar mediante contacto directo con los patógenos o mediante contacto en la distancia (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

#### **c) Competencia por espacio y nutrientes**

Los aislados de *T. harzianum* se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, que le confiere mayor capacidad a la hora de colonizar un espacio. De este modo, compiten directamente por los mismos nichos que algunos hongos fitopatógenos; la colonización de los sitios de unión de estos patógenos en la planta por *T. harzianum* permite reducir la enfermedad. Además, su carácter saprofito les permite utilizar un amplio rango de sustratos, compitiendo directamente por los nutrientes presentes en el medio (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

### **2.2.4.5.2. Mecanismos Indirectos**

#### **a) Estimulación del crecimiento**

Otro de los mecanismos antagonistas producidos por *T. harzianum* se basa en la promoción del crecimiento de la planta (Bailey y Lumsden, 1998). Diversos aislados de esta especie estimulan el crecimiento vegetal hasta un 300%, debido a que son capaces de sintetizar determinados compuestos con carácter hormonal (Brotman *et al.*, 2010).

Estos aislados producen además diferentes ácidos orgánicos que disminuyen el pH, solubilizan el fósforo del medio, así como otros nutrientes, mejorando el desarrollo de la planta. Además, las enzimas hidrolíticas producidos por estos hongos movilizan la materia orgánica del medio, y facilitan la absorción de compuestos más simples por parte de la planta, y en definitiva su estado nutricional (Verma *et al.*, 2007).

#### **b) Inducción de resistencia**

Numerosos autores han revelado que las asociaciones de *T. harzianum* con la planta, así como algunos de los compuestos producidos por el hongo, favorecen la inducción de mecanismos de resistencia en la planta, la presencia del hongo y los elicitores que produce son capaces de activar mecanismos de defensa (Bailey y Lumsden, 1998), reprogramando la expresión de diferentes genes y activando diferentes rutas enzimáticas esta inducción de los mecanismos acelera la respuesta frente al ataque de un patógeno, y mejora de este modo la resistencia de la planta, por lo tanto; una respuesta más rápida frente a un ataque disminuye el impacto de la enfermedad o el daño producido.

#### **2.2.4.5.3. Importancia del micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* en el control biológico**

La capacidad de *T. harzianum* de parasitar otros hongos (Chet *et al.*, 1998), es un mecanismo que puede actuar junto a fenómenos de antibiosis y competencia. Las hifas de *T. harzianum* son capaces de detectar la presencia de un posible hospedero en el medio, mediante la detección de moléculas liberadas por el posible hospedero, debido a la acción de las enzimas líticas producidas por *T. harzianum*. Mediante quimiotropismo, *T. harzianum* es capaz de crecer hasta el hospedador, reconociéndolo mediante lectinas específicas. Es entonces cuando *T. harzianum* es capaz de crecer rodeando al patógeno, mediante la formación de ovillos y apresorios, que atraviesan la pared celular del hongo y permiten que las hifas de *Trichoderma* penetren en el hospedero (Brotman *et al.*, 2010).

Este fenómeno está ligado a la síntesis de una gran batería de enzimas líticas que degradan la pared del patógeno. Entre estas enzimas destacan las quitinasas, las glucanasas y las proteasas (Viterbo *et al.*, 2002); la combinación de estas hidrolasas es capaz de lisar completamente la pared celular del hospedador, compuesta principalmente por quitina, un polímero formado por N-acetil-glucosamina unida mediante enlace 1,4, o de celulosa en el caso de los oomicetos. Además, también encontramos en la pared fibras de glucano, polisacárido lineal de residuos de glucosa unidos por enlace 1,3 con ramificaciones con enlace 1,6. Todos estos compuestos están inmersos a su vez en una matriz proteica. El sistema hidrolítico encargado de lisar esta estructura ha sido profundamente estudiado en algunas especies de *Trichoderma*. De este modo, para *T. harzianum*, se han descrito hasta cinco quitinasas (CHIT42, CHIT33, CHIT37, CHIT52, y CHIT40) y dos N-acetil-glucosaminidasas (EXC1 y EXC2); cuatro 1,3-glucanasas (BGN13.1, GLUC78, GLU36 y LAM1.3) y tres 1,6-glucanasas (BGN16.1, BGN16.2, y BGN16.3); y tres proteasas (PRB1, PAPA, y PRA) (Rincón *et al.*, 2008).

### **2.2.5. *Bacillus subtilis***

El género *Bacillus* se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza (Chatterjee *et al.*, 2007). Este género, además ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos (Sosa *et al.*, 2006; Reinoso-Rozo, 2007).

La mayoría de los *Bacillus* spp. producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pal y Gardener, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008). De hecho, *Bacillus* sp. actúa vía antibiosis, competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Kloepper *et al.*, 2004).

Dentro del género *Bacillus* la especie con mayores antecedentes como antagonista es *Bacillus subtilis*, varios autores han analizado la liberación de compuestos con

propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas (Cazorla y Romero, 2007).

Numerosos estudios sugieren la utilización de *B. subtilis* para controlar biológicamente diversos hongos fitopatógenos, tales como *Cercospora kikuchii* T. Matsumoto y Tomoy (Mycosphaerellaceae) (Soldano *et al.*, 2010) *Cercospora beticola* Sacc. (Mycosphaerellaceae) (Collins y Jacobsen, 2003), *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn. (Ceratobasidiaceae) (Montealegre *et al.*, 2003), *Botrytis cinerea* Pers. (Sclerotinaceae) (Hang *et al.*, 2005), *Colletotrichum gloeosporioides* (Stoneman) Spauld. y H. Schrenk (Glomerellaceae) (Senghor *et al.*, 2007) y *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

#### 2.2.5.1. Ubicación taxonómica

*Bacillus subtilis* se encuentra clasificado con base en Mycobank (2018):

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilos

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Bacillaceae

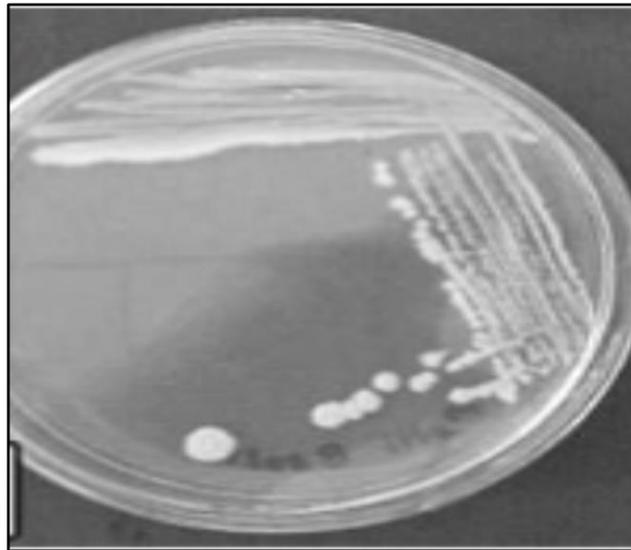
**Género:** *Bacillus*

**Especie:** *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn.

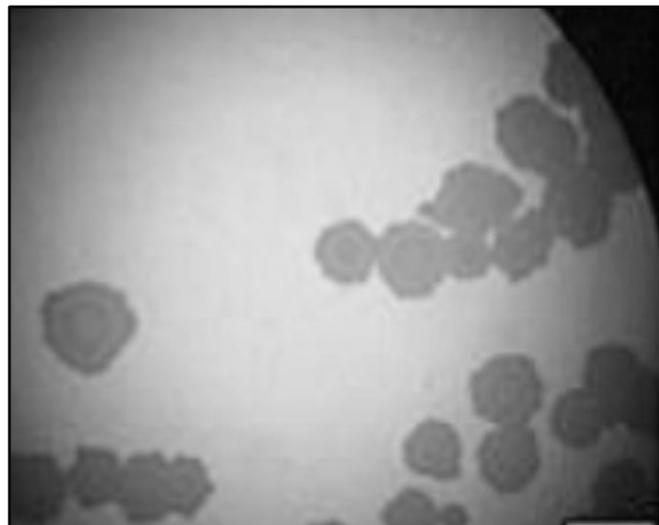
#### 2.2.5.2. Morfología

Entre las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma peritrica, pueden llegar a medir de 0.5-2.5 a 1.2-10  $\mu\text{m}$ , (Figura 5 y 6) además son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva, quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia (Holt *et al.*, 2000).

También cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno, una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias es que presentan una potencial capacidad para producir antibióticos, lo que puede servir como antifúngico, para proteger a plantas de enfermedades producidas por hongos (Castillo *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Colonias de *B. subtilis* en PDA.



**Figura 6.** Morfología de colonias de *B. subtilis*.

### 2.2.5.3. Biología

Debido a sus características, *B. subtilis*, microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999).

En base a su capacidad para crecer en presencia o ausencia de oxígeno, los organismos se dividen en tres grupos (Schmitz *et al.*, 1999): a) aerobios que pueden utilizar otros aceptores finales de electrones diferentes al oxígeno, tales como el nitrato y el nitrito, entre otros. El transporte de electrones desde NADH hasta estos aceptores esta acoplado a la fosforilación de ADP; b) facultativos; y c) anaerobios estrictos.

### 2.2.5.4. Ecología

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resisten factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos lo que permite que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70°C. Es un gran controlador biológico, *B. subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfii*, (Atheliaceae) *Fusarium* spp., (Nectriaceae) *Verticillium* spp., (Plectosphaerellaceae) *Sclerotinia sclerotiorum*, (Sclerotiniaceae) *Phytophthora capsici*, (Pythiaceae) *Pythium* spp, (Pythiaceae), *Rhizoctonia solani*

(Ceratobasidiaceae) y el nematodo agallador de raíces *Meloidogyne* spp. (Heteroderidae) (Cuervo, 2010).

#### **2.2.5.5. Mecanismos de Acción de *Bacillus subtilis***

Una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

En la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola (Raaijmakers y Mazzola, 2012).

Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen la excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inducen la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

##### **a) Producción de lipopéptidos**

Una de las características más importantes del género *Bacillus* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales han sido los más estudiados. Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi o  $\beta$ -amino, clasificándose en 3 diferentes familias (Iturinas, Fengicinas y Surfactinas), de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Ongena y Jaques, 2008; Falardeau *et al.*, 2013).

Estas moléculas son sintetizadas por complejos multi-enzimáticos, conocidos como sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés, nonribosomal peptide

synthetase), las cuales son independientes del ARN mensajero (Chowdhury *et al.*, 2015).

Las familias de las Iturinas, Fengicinas y Surfactinas, han sido ampliamente estudiadas por su actividad antibacteriana y antifúngica (Meena y Kanwar, 2015). La actividad antimicrobiana de estos LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos lipopéptidos pueden tener múltiples mecanismos de acción, alterando procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento del ARN (Zhang *et al.*, 2016).

El papel de los LPs se ha evidenciado en la inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos, así como la identificación de múltiples isoformas de lipopéptidos en extractos generados a partir de cultivos líquidos de *B. subtilis* (Touré *et al.* 2004). No obstante, los lipopéptidos no son los únicos metabolitos del antibioma del género *Bacillus* involucrados en el control biológico de fitopatógenos, éstos han sido propuestos como los metabolitos más eficientes para esta actividad biológica debido a su papel ecológico y capacidad antimicrobiana, por lo cual se han utilizado para la búsqueda y selección de agentes de control biológico promisorios de este género (Cawoy *et al.*, 2015).

## **b) Producción de enzimas líticas**

La producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más reportados, especialmente contra patógenos de origen fúngico. La pared celular de hongos está conformada por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes que varían según la especie fúngica (Bowman y Free, 2006). La fracción de polisacáridos puede comprender hasta un 80% de la pared celular de hongos,

encontrándose principalmente quitina (10-20%) y glucano (50-60%), los cuales están compuestos por residuos de beta-1,3-glucosa y beta-1,4-N-acetilglucosamina, respectivamente. Estos polímeros tienen un papel estructural determinante en la rigidez de la pared celular, mediante una red extensa de enlaces glucosídicos. Así, la interferencia en estos enlaces deteriora la pared celular de hongos fitopatógenos, lo que conduce a su lisis y muerte celular (Bowman y Free, 2006; Latgé, 2007).

La producción de enzimas líticas como quitinasas y  $\beta$ -glucanasas excretadas por los agentes de control biológico, que incluye el género *Bacillus*, han mostrado un efecto inhibitorio contra patógenos de origen fúngico (Compant *et al.*, 2005). Estas enzimas son responsables de la degradación de los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos. Actualmente, existen diversos estudios científicos que reportan el papel de estas enzimas en la actividad antifúngica *in vitro* obtenidas de cepas del género *Bacillus* (Kishore *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Shafi *et al.*, 2017).

### **c) Producción de sideróforos**

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para importantes funciones celulares, tales como en las reacciones redox de las proteínas con cofactores (Fe-S), en la cadena de transporte de electrones, y en la función de catalizar reacciones enzimáticas vitales, como aquellas en las que se encuentra involucrado el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). El Fe es encontrado en la naturaleza mayormente en forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de baja solubilidad, imposibilitando su uso por algunos seres vivos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

En respuesta a la restricción de hierro en el ambiente, algunos microorganismos han desarrollado diversas estructuras proteicas receptoras, de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro, llamados sideróforos, facilitando la captación de  $\text{Fe}^{3+}$  (Thyagarajan *et al.*, 2017).

Los sideróforos son metabolitos secundarios que actúan como secuestrantes o quelantes de hierro, consecuencia de su elevada constante de disociación por este metal, oscilando entre  $10^{22}$  y  $10^{55}$ . Lo cual permite la formación de complejos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo, así los microorganismos productores de sideróforos, mediante un receptor específico localizado en la membrana, pueden utilizarlo por dos mecanismos: 1) directamente mediante el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo a través de la membrana celular, o 2) reducido extracelularmente a complejos  $\text{Fe}^{2+}$  (Neilands, 1995).

Los sideróforos en función de su principal grupo quelante se clasifican en: hidroxamatos (utilizando ácidos hidroxámicos), catecolatos (conteniendo anillos catecol), carboxilatos, fenolatos, y en combinación de dos o más de estos grupos (Wilson *et al.*, 2016).

Diversas especies del género *Bacillus* han sido reportadas por su capacidad para controlar enfermedades de plantas mediante la secreción de sideróforos, y así limita el crecimiento y colonización de microorganismos fitopatógenos dependientes del hierro (Fgaier y Eberl, 2011).

#### **d) Respuesta sistémica inducida**

Durante la historia evolutiva, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse de la invasión de organismos patógenos (bacterias, hongos, nematodos, insectos, etc.). Dichos mecanismos se encuentran latentes y son activados por estímulos durante la interacción con agentes patógenos, en términos generales estos mecanismos se conocen como resistencia sistémica adquirida y se caracteriza por activarse no solo en el sitio de la infección, sino de manera sistémica en otros tejidos (Pieterse *et al.*, 2014).

La resistencia sistémica adquirida es activada a través de estímulos percibidos principalmente por dos receptores, los receptores de reconocimiento de patrones y

repetición rica en leucina que se une a nucleótidos (Pieterse *et al.*, 2014). El primero de éstos percibe componentes celulares como quitina fúngica o flagelinas desencadenando la primera línea de defensa, conocida como PTI (PAMP-triggered immunity), en patógenos con mecanismos para evadir a PTI, una segunda línea de defensa es activada, la cual percibe proteínas efectoras de virulencia mediante receptores NB-LRRs (Boller y Felix, 2009).

*Bacillus* produce una gran diversidad de moléculas elicitoras que inducen respuesta sistémica en plantas, incluyendo a lipopéptidos (Chowdhury *et al.*, 2015), fitohormonas (Ryu *et al.*, 2003) y compuestos volátiles (Kim *et al.*, 2015). Estos últimos activan genes PR (Pathogenesis related), los cuales protegen de la invasión de agentes patógenos, además de genes PR, *Bacillus* activa otros mecanismos de protección en plantas, los cuales incluyen cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016) o la producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas, auxinas o glucosinolatos en general (Pretali *et al.*, 2016).

#### **2.2.5.6. Importancia de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos**

El control biológico o el uso de microorganismos antagonistas como bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades en pre y postcosecha (Sharma *et al.*, 2009).

El potencial de *Bacillus* spp. para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha utilizado en el control biológico de fitopatógenos. La formación de endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, pudiéndose formular fácilmente en productos estables (Wulff *et al.*, 2002).

De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Estos péptidos generalmente tienen un PM < 2000 Da, particularmente *B. subtilis* es una especie que produce diferentes metabolitos secundarios en la forma de lipopéptidos

con buena actividad antifúngica, antibacteriana y frente a algunas levaduras; como consecuencia son de alto valor biotecnológico y farmacéutico (Volpon *et al.*, 2000). La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia a antibióticos convencionales (Oard *et al.*, 2004).

### **2.2.6. Métodos químicos**

Alrededor del 60% de los productos químicos utilizados actualmente son fungicidas. Algunos de estos compuestos químicos son tóxicos para la mayoría de los fitopatógenos (amplio espectro), mientras que otros pueden ser tóxicos para uno o varios de ellos. La mayoría de las sustancias químicas se usan para el control de las enfermedades de las partes aéreas de la planta; otras para el tratamiento del suelo; para el tratamiento de material de propagación; para el tratamiento de heridas; para desinfestar almacenes y, para proteger a los frutos, hortalizas y granos durante el transporte y almacenamiento (Achicanoy, 2001).

#### **2.2.6.1. Generalidades del control mediante fungicidas químicos**

La palabra fungicida se deriva de los términos latinos "fungus": hongo y "caedo": matar. En este sentido etimológico, fungicida es todo agente con habilidad para destruir organismos fungosos. El calor, los ácidos, la luz ultravioleta, son agentes físicos fungicidas. Sin embargo, el término fungicida se refiere a los productos químicos usados en la prevención y en algunos casos en la erradicación o curación de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos (Ochoa, 2004). En este sentido estricto, es conveniente distinguir entre acción fungicida y acción fungistática. Se habla de la primera cuando la sustancia química produce la destrucción del organismo fungoso, es decir, ocasiona una acción irreversible. En cambio, cuando la actividad es reversible, produciendo un efecto inhibitorio temporal en la germinación de las esporas, se hace referencia a una acción fungistática (Ochoa, 2004).

En la actualidad se cuenta con un amplio espectro de compuestos fungicidas; estos pueden adaptarse en pequeñas parcelas o miles de hectáreas utilizando maquinas apropiadas para este fin (Ochoa, 2004).

Entre las características deseables en un fungicida se encuentran:

- Aspectos biológicos: debe ofrecer un control de la enfermedad eficaz y consistente.
- No debe ser toxico a la concentración recomendada. No debe afectar adversamente a otras partes del ecosistema del cultivo.
- Aspectos toxicológicos: residuos que queden en el cultivo no deben ser un problema para el consumidor. No debe construir un peligro durante la aplicación.
- Aspectos de la formulación: debe ser seguro al almacenarse y transportarse. El método de formulación debe aumentar su eficiencia como fungicida. Debe ser fácil de aplicar a la concentración precisa (Ochoa, 2004).

#### **2.2.6.2. Tipos de fungicidas**

Según su toxicidad

- Categoría I: toxicidad alta

Compuesto cuya DL50 va de 0.50mg del toxico por kg de peso. Estos productos son muy peligrosos, solo pueden manejarse bajo normas de seguridad muy estrictas y por personal preparado.

- Categoría II: toxicidad media

Compuestos cuya DL50 va de 50-500mg del toxico por kg de peso. Productos medianamente tóxicos y peligrosos que pueden manejarse bajo normas de seguridad.

- Categoría III: toxicidad baja o moderada

Se encuentran en ella productos con DL50 superior a 500mg del toxico de peso (Patiño y Rodríguez, 2001).

### **2.2.6.3. Clasificación de los fungicidas según su uso**

En el caso de los fungicidas sistémicos, para poder determinar el modo de acción es necesario cuantificar una amplia gama de interacciones complejas que son difíciles de medir, ya que el producto necesita vencer algunos obstáculos para llegar su sitio de acción. Estos obstáculos que el producto tiene que pasar son:

- Cutícula de la planta
- Células subcuticulares
- Metabolismo de la planta hospedera
- Absorción dentro de la planta durante la translocación
- Membrana del patógeno
- Metabolismo que se desarrolla en el patógeno (Alfonso, 2008).

#### **a) Contacto**

La mayoría de los fungicidas se usan como protectante debido a que forman una barrera protectora en la planta. Los fungicidas de contacto actúan en sitios múltiples, ya que interfieren con los procesos metabólicos centrales de los hongos. Además, la mayoría de estos fungicidas afectan la producción de energía o ATP, inhiben la respiración o desacoplan la fosforilación oxidativa (Patiño y Rodríguez, 2001).

#### **b) Sistémicos**

Interrumpen el desarrollo del agente causal de la enfermedad, después de la iniciativa de la infección. Comprende un grupo reducido de fungicidas, se usa con fines de protección sistémica, en la cual la sustancia química se introduce o absorbe en el sistema circulatorio de la planta actuando como una especie de vacuna (Patiño y Rodríguez, 2001).

#### **2.2.6.4. Mecanismos de acción**

La acción fungicida es usualmente expresada en uno de los efectos físicamente visibles: la inhibición de la germinación de esporas o la inhibición de crecimiento micelial. Muchos fungicidas previenen la germinación de esporas o matan la espora inmediatamente iniciado el proceso de germinación. Algunos de estos inhibidores químicos o fungicidas también retardan o detienen el crecimiento del hongo cuando se aplican después de que se ha desarrollado el estado de infección (Tabares, 2002).

Todos los fungicidas son inhibidores metabólicos; es decir, bloquean algunos procesos metabólicos vitales de la célula. Por consideración se ha clasificado a los diferentes mecanismos de acción dentro de tres amplios grupos:

- Interferencia con la división celular
- Inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo celular
- Interferencia con la función y síntesis de la pared celular de los hongos (Tabares, 2002).

#### **2.2.6.5. Importancia del uso de productos químicos en el control de hongos fitopatógenos**

Las enfermedades son comunes en las plantas, a menudo producen un impacto económico significativo en el rendimiento y calidad, lo que nos indica que el manejo de enfermedades es un componente esencial en la producción de la mayoría de los cultivos. En un sentido general, existen tres razones principales por las cuales se utilizan los fungicidas (McGrath, 2004).

(a) Para controlar a la enfermedad durante el establecimiento y desarrollo de un cultivo.

(b) Para incrementar la productividad de un cultivo y reducir sus daños. Los cultivos alimenticios enfermos pueden producir menos si sus hojas, necesarias para la fotosíntesis, son afectadas por una enfermedad. Los daños pueden afectar las

partes comestibles del cultivo o, en el caso de cultivos ornamentales, pueden perder su vistosidad, en ambos casos se puede afectar el valor comercial del cultivo.

(c) Para mejorar el período de almacenamiento y la calidad de las plantas y los productos cosechados. Las pérdidas por enfermedades ocurren después de la cosecha, durante el almacenamiento. Los hongos a menudo echan a perder (hacen inutilizable) frutas, hortalizas, tubérculos y semillas almacenadas. Algunos hongos que infectan granos producen toxinas (micotoxinas) que producen trastornos severos e incluso la muerte de los seres humanos y animales que las consumen. Los fungicidas han sido utilizados para reducir la contaminación por micotoxinas en trigo afectado por la fusariosis de la espiga, pero la mayoría de los fungicidas desarrollados, no han sido suficientemente eficientes para ser utilizados en el manejo de micotoxinas asociadas con otras enfermedades (McGrath, 2004).

#### **2.2.6.6. Ingredientes químicos en el control de hongos fitopatógenos**

##### **2.2.6.6.1. Azoxystrobin (Amistar®)**

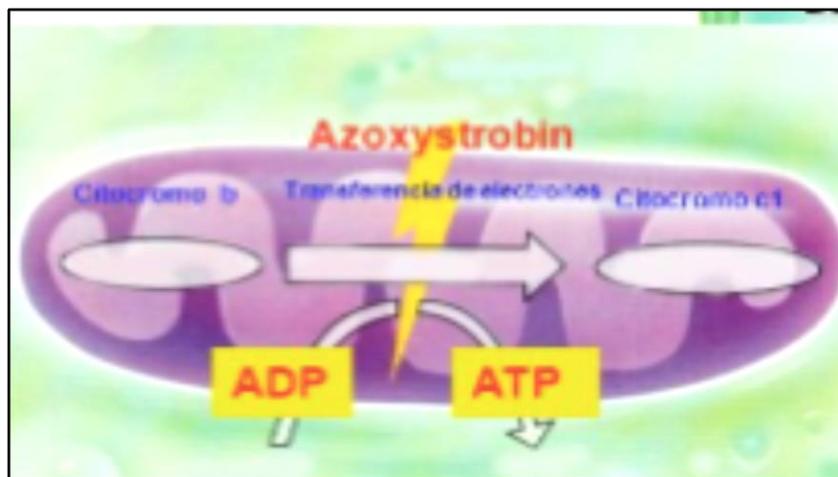
Inhíbe el proceso respiratorio de los hongos, es especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno. Además, la azoxistrobina posee actividad translaminar, otorgando una mejor eficacia en cultivos densos. Su efecto de contacto y prolongada residualidad, aseguran la protección de las hojas, retarda la senescencia y las mantiene verdes por más tiempo, lo que favorece el llenado de grano (Syngenta, 2017).

##### **2.2.6.6.1.1. Propiedades fisicoquímicas de la formulación**

- Estado Físico: Sólido (Gránulos)
- Flamabilidad: No inflamable
- Densidad: 0.54 g / cm<sup>3</sup>
- Solubilidad: En agua: Miscible

### 2.2.6.6.1.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las estrobilurinas se basa en la inhibición de la respiración, deteniéndose entre otras funciones básicas celulares (Figura. 7) las síntesis de proteínas, ARN y ADN, debido a una deficiencia en ATP. La diana de las estrobilurinas se localiza en el complejo mitocondrial citocromo bc1 (complejo III), concretamente se unen al citocromo b de este complejo, cerca del centro Qo y de la ferrosulfoproteína de Rieske, de ahí que estos compuestos también se conozcan con el nombre de inhibidores Qo (QoI). Las estrobilurinas actúan bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c, y por tanto interrumpiendo el flujo de electrones hacia el complejo terminal del citocromo c oxidasa, lo que a su vez destruye la fuerza protón-moriz generada por ambos complejos. Todo ello se traduce en la reducción de la producción de ATP. Además, el bloqueo de la respiración genera electrones en estado de alta energía que provoca una rápida aparición de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrogeno, que hacen que las estrobilurinas tengan actividad fungicida (Pérez *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Mecanismo de acción de azoxystrobin, para inhibir la respiración en las mitocondrias

### **2.2.6.6.1.3. Modo de penetración**

- Azoxystrobin tiene propiedades sistémicas y traslaminares
- Es muy bien absorbido y redistribuido dentro de la planta
- Una gran cantidad del producto es tomado por la planta lo cual asegura que el ingrediente activo que permanece sobre la hoja prevenga la infección al afectar las esporas de los hongos.
- Se difunde a través de la hoja hasta alcanzar los tejidos vasculares para posteriormente moverse acropetalmente por transpiración.
- El resultado es una distribución uniforme del azoxystrobin dentro de la hoja, dando una excelente protección (Syngenta, 2017).

### **2.2.6.6.2. Clorotalonil (Trevanil 720F)**

Trevanil 720 FW, es un fungicida preventivo de contacto, que actúa esencialmente en la protección de las plantas contra las infecciones de los hongos fitopatógenos. Por consiguiente, el fungicida debe estar presente en las plantas antes del inicio de la infección. Los síntomas generales de su acción sobre las células de los hongos son el retraso del crecimiento del micelio y la inhibición de la germinación de las esporas. Se considera que el clorotalonil actúa como un fungitóxico no específico (Gowan, 2018).

#### **2.2.6.6.2.1. Características físicas y químicas de la formulación**

Sólido cristalino de color blanco, sin olor. Su punto de ebullición es igual a 350 °C a 760 mm Hg y su punto de fusión a 250 °C; su densidad relativa es igual a 1.7 a 25°C. Su solubilidad en agua es igual a 0.6 mg/kg a 25 °C. Es ligeramente soluble en disolventes orgánicos. Su presión de vapor es menor a 0.01 mm Hg a 40°C (Gowan, 2018).

### 2.2.6.6.2.2. Mecanismo de acción

Clorotalonil protege la planta contra el proceso de infección del hongo. Para ello, el fungicida debe estar presente en la parte de la planta donde se dé la infección antes de que ésta tenga lugar. La prevención de la infección es el resultado de la interacción entre el clorotalonil y las células fúngicas como resultado de una pérdida de viabilidad de las mismas. El producto inhibe la respiración de las células del hongo, debido a que las moléculas del clorotalonil se unen a grupos sulfhidrilo de los aminoácidos. Las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se desactivan y no se produce ATP. Al no poder completar este proceso esencial, la célula muere. Se considera que clorotalonil actúa como un fungitóxico general, no específico. Se caracteriza por ser de acción rápida, acumulándose grandes cantidades en las células del hongo y reaccionando indiscriminadamente con los componentes celulares. Los síntomas generales de la interacción entre el clorotalonil y las células fúngicas son el retraso en el crecimiento del micelio y la inhibición de la germinación de las esporas (Arysta, 2017).

j



**Figura 8.** Mecanismo de acción de clorotalonil, actividad de contacto multisitio.

### **2.2.6.6.2.3. Modo de penetración**

Trevanil 720 FW, es un fungicida multisitio, inhibe la respiración de las células del hongo (Figura. 8) debido a que las moléculas del clorotalonil se unen a grupos sulfhidrilo de los aminoácidos. Las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se desactivan y no se produce ATP. Al no poder completar este proceso esencial, la célula muere (Gowan, 2018).

### **2.2.6.6.3. Tiabendazol (Tecto® 60)**

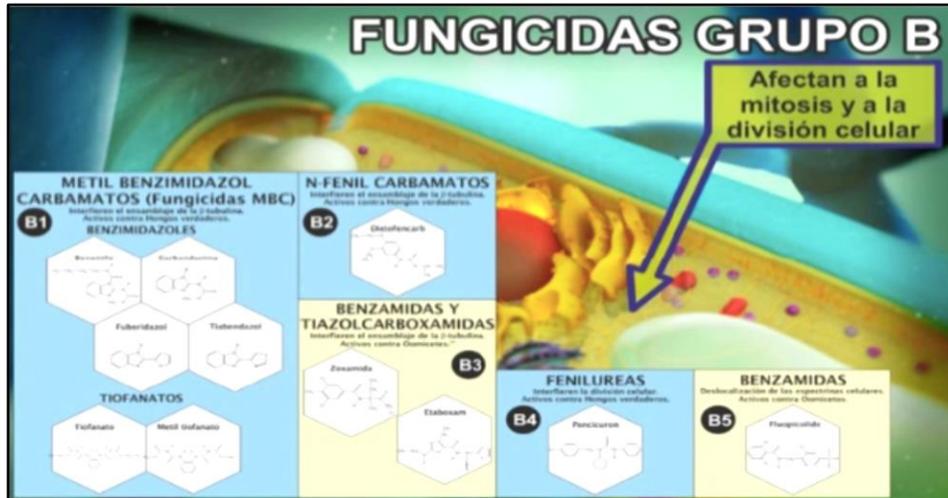
Tecto® 60 es un fungicida sistémico de amplio espectro que puede ser utilizado para tratamientos preventivos y/o curativos. Puede aplicarse como aspersión foliar antes de la cosecha o en tratamientos postcosecha (Syngenta, 2018).

#### **2.2.6.6.3.1. Propiedades físicas y químicas de la formulación**

Tiene una apariencia de polvo blanco, sin olor, la presión de vapor es de  $4 \times 10^{-9}$  mm Hg a 25°C, como característica radiactiva, es estable bajo condiciones normales de almacenaje (Syngenta, 2018).

#### **2.2.6.6.3.2. Mecanismo de acción**

El Tiabendazol detiene la división nuclear interfiere en el ensamblaje de microtúbulos al unirse a proteínas de  $\beta$ -tubulina. La tubulina (microtúbulos-cytoesqueleto), es una molécula importante en la formación y segregación de cromosomas en la división celular; la alteración de esta afecta la mitosis a nivel de la metafase (Figura. 9) (El huso acromático es distorsionado y la separación del núcleo es suspendida, causando la muerte de la célula fungosa) (Román, 2014).



**Figura 9.** Mecanismo de acción de tiabendazol, inhibidores de la mitosis y la división celular

### 2.2.6.6.3.3. Modo de penetración

Acción sistémica y de contacto, a concentraciones bajas, los benzimidazoles, inhiben la elongación del micelio y a altas actúan sobre la germinación de las esporas. Aunque hace tiempo se conoce que los derivados de benzimidazol interfieren en la mitosis de los hongos, su acción real debida al efecto sobre los microtúbulos, se ha interpretado hace relativamente poco tiempo. La inhibición de la formación de microtúbulos trae, como consecuencia, la ausencia de división celular, lo que produce además una desorganización citoplasmática de tipo general (Danaher *et al.*, 2007).

### III. MATERIALES Y METODOS

Localización. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (25°21'13"N, 101°01'56"O, 1610 msnm).

**Recolecta de frutos de cacao.** Se recolectaron frutos (mazorcas) de 15-20 cm de longitud del cultivo de cacao de la variedad criollo-trinitario, con sintomatología típica de pudrición de mazorca (puntos aceitosos, decoloración o manchas chocolate, maduración irregular o en forma de protuberancia o giba, necrosis con y sin esporulación en forma de polvo fino y esporas maduras) (Phillips-Mora *et al.*, 2005), en una parcela no comercial en el municipio de Villa de Comaltitlán, Chiapas. El material biológico infectado se colocó en bolsas de polietileno transparente estériles con cierre hermético tipo “ziploc”, contenido en hieleras de poliestireno expandido y se trasladado a la UAAAN.

**Aislamiento y purificación del hongo *Nodulosporium* sp.** El tejido vegetal enfermo se procesó en el laboratorio de fitopatología. El aislamiento del hongo para la obtención de colonias puras, se llevó a cabo por dos vías; la primera consistió en tomar esporas directamente del tejido dañado de la mazorca, utilizando una aguja de disección estéril y sembrarlas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon) y la segunda vía consistió en seccionar tejido vegetal enfermo con un bisturí, el cual se desinfecto con un triple lavado con hipoclorito al 3%, agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O), alcohol al 70% y dH<sub>2</sub>O y sembrarlo en medio de cultivo PDA. En ambas vías de aislamiento, se incubó a 27 ± 2 °C en una cámara de crecimiento (Binder®).

**Identificación morfológica.** La identificación morfológica se realizó mediante montas de estructuras del micelio y sus respectivas conidias y esporas en porta y cubreobjetos, con una solución de lactofenol y azul de algodón y con apoyo de un microscopio estereoscopio. Su observación se llevó a cabo a 40 y 100X en

microscopio compuesto y se apoyó de las claves taxonómicas para géneros de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998).

**Microorganismos de control biológico.** Los agentes de control biológico *T. harzianum* y *B. subtilis* fueron obtenidos del cepario del Departamento de Parasitología de la UAAAN. El hongo *T. harzianum* fue corroborado con claves taxonómicas para géneros de Barnett y Hunter (1998) y para la especie, las claves de Kubicek y Harman (1998) y *B. subtilis* mediante pruebas bioquímicas (Schaad *et al.* 2001).

**Re-Activación de los agentes de control biológico.** Explantes (discos de 5 mm de medio de cultivo con el microorganismo) de *T. harzianum* y *B. subtilis* fueron limpiados con un triple lavado de dH<sub>2</sub>O y sembrados en medio de cultivo PDA en caja de Petri e incubados a  $28 \pm 2$  °C en una cámara de crecimiento (Binder®) hasta el llenado de las cajas para el incremento de *B. subtilis* y *T. harzianum* respectivamente.

**Fungicidas químicos.** Los productos químicos bajo estudio son azoxystrobin (Amistar®), clorotalonil (Trevanil 720F) y tiabendazol (Tecto® 60).

**Efecto antagónico in vitro con microorganismos sobre *Nodulosporium* sp.**

La capacidad antagónica de *T. harzianum* y *B. subtilis*, se llevó a cabo usando la técnica de cultivo dual en medio PDA (cajas de Petri 90 x 15 mm).

Para la confrontación con *T. harzianum*, se colocó un explante (disco con micelio) de 5 mm y otro explante del mismo tamaño de *Nodulosporium* sp. opuestos en el interior de la caja de Petri. Para la confrontación con *B. subtilis*, se colocaron cuatro explantes (disco con la bacteria) de 5 mm en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri y un explante de *Nodulosporium* sp. al centro del mismo tamaño. En ambos casos se realizaron siete repeticiones, se consideró como unidad experimental una caja de Petri, de igual manera se consideraron siete repeticiones testigo del

fitopatógono y de los antagonistas, crecidos por separado. Las cajas de Petri inoculadas y testigos, se incubaron a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C en una incubadora BD 115 L (Binder®). El crecimiento radial del hongo fitopatógono y el antagonista en confrontación se midió con apoyo de un calibrador (vernier) con compuesto digital (Titan®) en dirección uno a al otro cada 24 horas, hasta el llenado del testigo (7 días).

**Evaluación.** Se evaluó por observación el tiempo en el que el antagonista-fitopatógono entraron en contacto y se calculó el porcentaje de crecimiento radial y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) empleando la fórmula de Suarez *et al.* (2008): **PICR**=  $(R1-R2)/R1*100$ .

Donde:

**R1** es el radio mayor (radio del fitopatógono testigo)

**R2** es el radio menor (radio del fitopatógono en enfrentamiento con el antagonista).

Se determinó el tipo de antagonismo para *T. harzianum* con base en la escala de clases del grado de antagonismo de 1-5, denominada escala de Bell (Bell *et al.*, 1982).

Donde:

Clase 1= Antagonista cubre (sobrecrece) al patógono y llena por completo la superficie del medio de cultivo;

Clase 2= Antagonista cubre al menos dos tercios de la superficie del medio;

Clase 3= Antagonista y el patógono, cada uno colonizan aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo (más de un tercio y menos de dos tercios) y ningún organismo parece dominar al otro;

Clase 4= El patógono coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio y parece resistir la invasión del Antagonista; y la

Clase 5= El patógono cubre completamente al Antagonista y llena por completo la superficie del medio de cultivo.

**Análisis de Datos.** Para el crecimiento de los antagonistas y del fitopatógeno testigos y en cultivo dual se realizó un análisis de varianza (ANVA) y comparación de medias con una prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0.05$ ); se utilizó el software SAS/STAT (SAS Institute, 2002).

**Efecto inhibitorio *in vitro* con fungicidas químicos sobre *Nodulosporium* sp.**

Para la evaluación del efecto inhibitorio de los fungicidas comerciales azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol. De estos ingredientes activos, en agua destilada se prepararon concentraciones madre de 4000, 1500 y 100 ppm respectivamente y se derivaron en 8 concentraciones menores en cada uno (Cuadro. 1), además se incluyó un tratamiento testigo sin fungicida (0 ppm) y cada concentración por cada tratamiento, se repitió 10 veces.

**Cuadro 1.** Tratamientos para evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Nodulosporium* sp. con fungicidas comerciales.

<b>Ing. Activo</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Grupo Toxicológico</b>	<b>Concentraciones (ppm)</b>
Agua destilada	Testigo	No aplica	0
Azoxystrobin	Amistar®	Estrobilurina	1000, 1350, 1650, 1950, 2600, 3000, 3200, 3800
Clorotalonil	Trevanil 720F	Ftalonitrilo aromático policlorado	100, 200, 350, 450, 650, 850, 950, 1000
Tiabendazol	Tecto® 60	Benzimidazol	0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60

La preparación de los medios PDA (Cajas de Petri 90 x 15 mm) se realizaron en matraz de Erlenmeyer y se esterilizaron en una olla de presión (Presto Modelo 79291, capacidad 21 L.) por 15 minutos a 15 libras a 121°C y se dejaron enfriar a 50°C (10-15 min) sin llegar a la solidificación y posteriormente se le añadieron las concentraciones correspondientes de cada tratamiento fungicida. Cada concentración fue extendida en las cajas de Petri, sobre las cuales se colocó en el

centro un explante de 5 mm de *Nodulosporium* sp. Las cajas de Petri, se incubaron a una temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días en una incubadora BD 115 L (Binder®).

**Evaluación.** La evaluación consistió en medir el crecimiento micelial, en dos ejes (horizontal y vertical) del fitopatógeno, cada 24 horas, hasta el llenado del testigo (7 días), utilizando como apoyo un calibrador (vernier) con compuesto digital (Titan®). Con los datos obtenidos en la evaluación se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula de Abbott (1925), tomando como 100% el crecimiento micelial del testigo (0 ppm).

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento testigo} - \text{Crecimiento concentración}}{\text{Crecimiento testigo}} * 100$$

Con el porcentaje de inhibición micelial se realizó un análisis Probit de máxima verosimilitud y se determinó los valores de la concentración inhibitoria al 50 y 90% ( $CI_{50}$  y  $CI_{90}$ ) y sus límites fiduciales al 95% de confiabilidad.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento micelial, se realizó un análisis de varianza (ANVA) y comparación de medias de los tratamientos con una prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0.05$ ), utilizando el software SAS/STAT (SAS Institute, 2002).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El género *Nodulosporium* presento un rápido crecimiento, al extenderse en su totalidad sobre la caja de Petri (9 cm de diámetro) en un periodo de 7 días. Este hongo se ha asociado como endófito a diversas plantas; Salgado y Cepero, (2005) lo encontraron en hojas de *Rosa hybrida* L. (Rosaceae), Márquez-Dávila *et al.* (2013) aislado a partir de hojas y tallos de cacao *T. cacao*, Lizarazo-Medina *et al.*, (2014) en hojas de dos especies de orquídeas *Cattleya percivaliana* (Rchb. F.) O'brien y *Cattleya trianae* L. Linden y Rchb. F. (Orchidaceae) y se aisló también de cacahuananche *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth. Ex. Walp. (Fabaceae) (Sánchez-Fernández, 2016). Además, se ha reportado como fitopatógeno, ocasionando muerte descendente, pudrición del tronco negro y resinosidad de ramas de mezquite *P. laevigata* (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2003; De la Torre-Almaráz *et al.*, 2009), provocando pudrición basal del estípote en palma africana de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaceae) (Mestizo *et al.*, 2012) y pudrición basal en el cáliz de Flor de Jamaica *H. sabdariffa* (Ruiz-Ramírez *et al.*, 2015).

### 4.1. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre *Nodulosporium sp.*

En el estudio para el control biológico del fitopatógeno *Nodulosporium* con el antagonista *T. harzianum*, este último; no permitió el crecimiento del fitopatógeno reduciendo su crecimiento hasta un 69.93%; lo que indica que *T. harzianum* al estar en confrontación ejerce efecto inhibitorio sobre el hongo *Nodulosporium sp.*, superior al 50% del crecimiento micelial; lo que indica un buen control (Suarez *et al.*, 2008), mientras que el antagonista expresa su crecimiento sin dificultad, incluso sobre el fitopatógeno (Cuadro 2). Con base en la escala de Bell *et al.* (1982), *T. harzianum*, se ubica en la clase 1; el antagonista tuvo contacto con el fitopatógeno a las 72 horas, posteriormente este último fue invadido por *T. harzianum*, alcanzando cobertura total en el medio de cultivo y sobrecreciendo al patógeno.

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos (González *et al.*, 2002). Suarez *et al.*

(2008), reportan que *T. harzianum* es un antagonista con habilidades de micoparasitismo, competencia por espacio e inhibe el crecimiento para el control *in vitro* de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Nectriaceae).

Al respecto, Rivero (2008) al evaluar el efecto de antibiosis de dos aislados de *Trichoderma* spp., en cultivo dual con *Alternaria padwickii* (Ganguly) M. B. Ellis, *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoemaker, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (*Cochliobolus lunatus* R.R. Nelson y Haasis) (Pleosporales: Pleosporaceae) y *Phoma* sp., Saccardo (Pleosporales: Pleosporaceae) observó inhibición significativa del crecimiento radial de estos patógenos; lo que nos indica el potencial de inhibición de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos.

**Cuadro 2.** Diámetro de micelio, porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA con *Trichoderma harzianum* a 7 días de evaluación.

No.	Diámetro de micelio (mm)				%C	%I
	Testigo	Cultivo dual		Testigo		
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>Nodulosporium</i> *	<i>Nodulosporium</i>		
1	86.6	86.6	26.7	86.6	30.83	69.16
2	86.6	86.6	26.2	86.6	30.25	69.74
3	86.6	86.6	21.9	86.6	25.28	74.71
4	86.6	86.6	24.9	86.6	28.75	71.24
5	86.6	86.6	27.2	86.6	31.40	68.59
6	86.6	86.6	26	86.6	30.02	69.97
7	86.6	86.6	29.4	86.6	33.94	66.05
$\bar{X}$	86.6	86.6	26.04	86.6	30.07	69.93

No.=Repeticiones.  $\bar{X}$ = Promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición.

En el crecimiento micelial se encontraron diferencias altamente significativas ( $P<0.05$ ) entre *Nodulosporium* sp. en cultivo dual con *T. harzianum* para un periodo de 7 días; por lo que se puede deducir que el antagonista crece con gran rapidez a tal grado que sobrecrece a *Nodulosporium* y este comienza a decrecer con síntomas de necrosis (comienza a morir el fitopatógeno) (Cuadro 3). En este sentido, Stefanova *et al.* (1999) informaron de la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma* y concluyeron que

estos mismos son los responsables de la reducción del crecimiento micelial del hongo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (Pythiales: Pythiaceae).

**Cuadro 3.** Medias del crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Media (mm) <sup>***</sup>
<i>T. harzianum</i> testigo	86.60 a
<i>T. harzianum</i> cultivo dual	86.60 a
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	26.04 b
<i>Nodulosporium</i> sp. testigo	86.60 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey;  $P < 0.05$ ).  $R^2=0.99$ ,  $CV=1.60$ ,  $F=4883.80$ ;  $gl=3,27$ ;  $P=<0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P < 0.001$ .

En los resultados del porcentaje de crecimiento de *T. Harzianum* y *Nodulosporium* solos y en cultivo dual, se observa que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un porcentaje de crecimiento menor del fitopatógeno en cultivo dual con *T. harzianum*, inhibiendo al fitopatógeno significativamente en 69.93% (Cuadro 4); estos resultados indican que *T. harzianum* exhibe un efecto antagónico sobre *Nodulosporium* en cultivo dual *in vitro*. Esto probablemente se debe a que *T. harzianum* expone diferentes mecanismos, como micoparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes y espacio para disminuir poblaciones de otros hongos, principalmente fitopatógenos (Chet *et al.*, 1997; Kulling, 2000). Con base en evaluaciones previas de Papavizas y Lumsden (1980), Lorito *et al.*, (1993), Herrera-López *et al.*, (1999), y Sid Ahmed *et al.*, (2000) mencionan que *T. harzianum* presenta gran velocidad de crecimiento, efecto de hiperparasitismo, que se manifiesta en inhibición del crecimiento micelial de otros hongos, no solo por compartir el mismo sustrato, sino también porque produce antibióticos (trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, penicilina, trichotecenos, trichorzianinas) y enzimas ( $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, proteasas y celulosas) degradadoras de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo.

**Cuadro 4.** Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Trichoderma harzianum* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Crecimiento (%)***	Inhibición (%)***
<i>T. harzianum</i> testigo	100.00 a	00.00 b
<i>T. harzianum</i> cultivo dual	100.00 a	00.00 b
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	30.07 b	69.93 a
<i>Nodulosporium</i> sp. testigo	100.00 a	00.00 b
CV	1.60	7.57

Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey;  $P < 0.05$ ).  $R^2=0.99$ ,  $F=4883.80$ ;  $gl=3,27$ ;  $P=<0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P < 0.001$ . CV= Coeficiente de Variación.

#### 4.2. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre *Nodulosporium* sp.

Con base en los resultados de control de *B. subtilis* sobre *Nodulosporium* sp., en cultivo dual y con respecto a sus testigos, se observa que *B. subtilis* presenta un lento crecimiento comparado con el hongo *Nodulosporium* sp., e incluso el antagonista y el fitopatógeno nunca tuvieron contacto en la caja de Petri, no obstante; si se aprecia en la confrontación que *B. subtilis* no permite el buen desarrollo del hongo, con un crecimiento promedio de 28.13% (Cuadro 5); e incluso se pudo observar al noveno día (se mantuvo para observar el seguimiento del comportamiento del hongo y la bacteria), que *Nodulosporium* sp., comenzó a decrecer y el micelio tomo una coloración café en la periferia del hongo; esto, probablemente debido a que *B. subtilis* produce una amplia variedad de metabolitos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999), sideróforos, toxinas y lipopéptidos (LPs) cíclicos no ribosomales (Ongena y Jaques, 2008; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Falardeau *et al.*, 2013), con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos. La actividad antimicrobiana de los LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células fúngicas, inhibiendo el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, deteniendo la germinación de esporas de patógenos e interrumpiendo el crecimiento del tubo germinativo y del micelio y provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos

fitopatógenos (Butt *et al.*, 1999; Touré *et al.* 2004; Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006).

**Cuadro 5.** Diámetro de crecimiento, porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA con *Bacillus subtilis* a 7 días de evaluación.

No.	Diámetro de crecimiento (mm)				%C	%I
	Testigo	Cultivo dual		Testigo		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Nodulosporium</i> *	<i>Nodulosporium</i>		
1	23.15	19.8	22.1	86.6	25.51	74.48
2	22.85	22.85	26.9	86.6	31.06	68.93
3	23.67	20.17	24.5	86.6	28.29	71.70
4	23.5	23.7	22.8	86.6	26.32	73.67
5	23.7	23.5	23.9	86.6	27.59	72.40
6	23.95	23.95	25.45	86.6	29.38	70.61
7	22.42	19.05	24.95	86.6	28.81	71.18
$\bar{X}$	23.32	21.86	24.37	86.6	28.14	71.86

No.=Repeticiones.  $\bar{X}$ =Promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición.

El diámetro de crecimiento de *B. subtilis* y *Nodulosporium* sp., solos y en confrontación, presento diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre tratamientos, con mayor crecimiento en *Nodulosporium* sp., solo y en cultivo dual, mientras que *B. subtilis* en cultivo dual presentó un menor crecimiento, comparado con su testigo, este último nos indica que, este organismo es de lento crecimiento. No obstante, para el caso de *Nodulosporium* sp., en cultivo dual, el fitopatógeno se vio afectado por la presencia de *B. subtilis*, con respectivo al testigo.

**Cuadro 6.** Medias del crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Media(mm)***
<i>B. subtilis</i> testigo	23.32 bc
<i>B. subtilis</i> cultivo dual	21.86 c
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	24.37 b
<i>Nodulosporium</i> sp. testigo	86.60 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey;  $P<0.05$ ).  $R^2=0.99$ ,  $CV=3.46$ ,  $F=3848.59$ ;  $gI=3,27$ ;  $P <0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P <0.001$ .

Del crecimiento e inhibición de *B. subtilis* y *Nodulosporium* sp., solos y en confrontación se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 7), con el menor porcentaje de crecimiento del hongo en cultivo dual y a su vez el mayor porcentaje de inhibición en este mismo tratamiento; lo que indica que *B. subtilis* tiene un efecto antagonista y permite tener un excelente control sobre *Nodulosporium* sp. Entre las principales vías por las cuales cepas de *B. subtilis* evitan el establecimiento y desarrollo de organismos patógenos, está determinado por su perfil bioquímico; existen diferentes mecanismos, que incluyen, la producción de una gran variedad de metabolitos biológicamente activos, con capacidad de inhibir el desarrollo y crecimiento normal de agentes fitopatógenos, entre éstos, se encuentran los lipopéptidos cíclicos no ribosomales, clasificados en 3 diferentes familias, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Iturinas, Fengicinas y Surfactinas), sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inducen resistencia sistémica en plantas (IRS) (Butt *et al.*, 1999; Ongena y Jaques, 2008; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Falardeau *et al.*, 2013).

**Cuadro 7.** Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Bacillus subtilis* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Crecimiento (%)***	Inhibición (%)***
<i>Bacillus subtilis</i> testigo	97.37 ab	2.63 bc
<i>Bacillus subtilis</i> cultivo dual	91.27 b	8.73 b
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	28.14 c	71.86 a
<i>Nodulosporium</i> sp. testigo	100.00 a	00.00 c
CV	5.83	22.21

Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey;  $P < 0.05$ ).  $R^2=0.98$ ,  $F=384.34$ ;  $g=3,27$ ;  $P=<0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P < 0.001$ . CV=Coeficiente de Variación.

Evaluaciones realizadas por Villa *et al.* (2007) con tres cepas de *B. subtilis* en cultivo dual frente a los hongos *F. solani*, *F. sporotrichois* y *F. oxisporum*, observaron que *B. subtilis* disminuye el crecimiento micelial de estos hongos entre 50 y 60% por excreción al medio de metabolitos antifúngicos. Al respecto, Corrales *et al.* (2011) con *Bacillus subtilis*, aislada de rizósfera de plantas aromáticas, realizaron pruebas

de antagonismo *in vitro* en medio PDA frente a *Fusarium acuminatum* Ellis y Everh. (Hypocreales: Nectriaceae) y encontraron de 70-100% de inhibición del micelio del hongo por la producción de sustancias antifúngicas.

#### 4.3. Inhibición *in vitro* del fungicida azoxystrobin sobre *Nodulosporium* sp.

El fungicida azoxystrobin mostro efectividad para el control *in vitro* de *Nodulosporium* sp., causando inhibición sobre el crecimiento micelial en 82.90% en una concentración alta (Cuadro 8). El crecimiento del hongo *Nodulosporium* sp., en presencia del fungicida azoxystrobin presento diferencias altamente significativas ( $P<0.05$ ), con un decrecimiento micelial a medida que aumento la concentración. La azoxistrobina (activo principal de este fungicida), actúa inhibiendo el proceso respiratorio de los hongos y resulto especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno; además, de que posee actividad translaminar, efecto de contacto y prolongada residualidad, para una mejor eficacia (Syngenta, 2018).

**Cuadro 8.** Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida azoxystrobin a 7 días de evaluación.

Concentración Ppm	Diámetro de micelio (mm)			%C***	%I***
	DV	DH	DP***		
Testigo (0)	86.60	86.60	86.60 a	100.00 a	00.00 i
1000	45.13	45.13	45.13 b	52.11 b	47.89 h
1350	43.31	43.15	43.23 c	49.92 c	50.08 g
1650	40.82	40.82	40.82 d	47.14 d	52.86 f
1950	36.32	36.32	36.32 e	41.94 e	58.06 e
2600	23.36	23.36	23.36 f	26.97 f	73.02 d
3000	19.76	19.76	19.72 g	22.82 g	77.18 c
3200	18.04	18.04	18.04 h	20.83 h	79.17 b
3800	14.81	14.81	14.81 i	17.10 i	82.90 a
CV	--	--	3.01	3.00	2.19

DV=Diámetro vertical, DH=Diámetro horizontal, DP=Diámetro promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición. CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey;  $P<0.05$ ).  $R^2=0.99$ ,  $F=4065.97$ ;  $gI=8.89$ ;  $P<0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P<0.001$ .

Azoxystrobin es un fungicida efectivo para el control de hongos fitopatógenos, no obstante requiere concentraciones altas; Félix y Gálvez (2002) evaluando este fungicida en un rango de las 10 ppm contra *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Pleosporales: Pleosporaceae) observaron un efecto inhibitorio en la germinación de los conidios; no obstante, observaron un efecto mínimo en el desarrollo micelial en un periodo de 10 días de evaluación, lo que indica que bajo la dosis de 10 ppm, este fungicida ejerce un efecto fungistático muy leve, pero no suprime el desarrollo del hongo, lo que sugiere una actividad curativa limitada contra *A. alternata*. Por otro lado, Herrera *et al.* (2011) en concentraciones de 500 ppm, encontraron un 93.61% de efectividad en *A. alternata*.

Torres *et al.* (2013) con este fungicida, encontraron una inhibición del 100% de la germinación de conidios a una concentración de 450 mg L<sup>-1</sup> y 96% del crecimiento micelial con una concentración de 1250 mg L<sup>-1</sup>. Gaviria-Hernández *et al.* (2013) encontraron un porcentaje de inhibición de 38.75 y 70% del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (Glomerellales: Glomerellaceae) respectivamente, a una concentración de 95 ppm.

#### **4.4. Inhibición *in vitro* del fungicida clorotalonil sobre *Nodulosporium* sp.**

El hongo *Nodulosporium* sp., fue susceptible al fungicida clorotalonil, con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diámetro de crecimiento micelial, porcentaje de crecimiento e inhibición, en las diferentes concentraciones utilizadas, con un decrecimiento de micelio a medida que se aumentó la concentración de fungicida, correlacionado a su vez en el incremento del porcentaje de inhibición (Cuadro 9).

La efectividad del fungicida clorotalonil, se debe a la acción que este producto ejerce sobre hongos fitopatógenos, e interviene en la síntesis de las enzimas y provoca que el hongo no se desarrolle y muera (Thomson, 1997) e inhibe la respiración de las células del hongo, debido a que las moléculas del clorotalonil se unen a grupos sulfhidrilos de los aminoácidos, las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se

desactivan y no se produce ATP, y al no poder completar este proceso esencial, la célula muere. Los síntomas generales de la interacción entre el clorotalonil y las células fúngicas son el retraso en el crecimiento del micelio y la inhibición de la germinación de las esporas (Arysta, 2017).

**Cuadro 9.** Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida clorotalonil a 7 días de evaluación.

Concentración Ppm	Diámetro de micelio (mm)			%C***	%I***
	DV	DH	DP***		
Testigo (0)	86.6	86.6	86.60 a	100.00 a	00.00 f
100	21.74	21.31	21.52 b	24.85 b	75.14 e
200	19.56	19.56	19.56 b	22.57 b	77.41 e
350	15.81	15.81	15.81 c	18.15 c	81.85 d
450	15.08	15.08	15.08 c	17.41 c	82.59 d
650	11.64	11.64	11.64 d	13.44 d	86.56 c
850	12.01	12.01	12.01 d	13.87 d	86.13 c
950	7.83	7.83	7.83 e	9.04 e	90.96 b
1000	5.00	5.00	5.00 f	5.77 f	94.23 a
CV	--	--	7.01	7.01	2.34

DV=Diámetro vertical, DH=Diámetro horizontal, DP=Diámetro promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición. CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey;  $P < 0.05$ ).  $R^2 = 0.99$ ,  $F = 2690.81$ ;  $g/l = 8,89$ ;  $P < 0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P < 0.001$ .

Para el control de *Spilocaea oleagina* (Castagne) S. Hughes (Pleosporales: Venturiaceae) se encontró que el clorotalonil tiene un efecto *in vitro* en la germinación de conidios (Obanor *et al.*, 2005). Pérez y Iannacone (2006), evaluaron diversos fungicidas, entre ellos el clorotalonil para el control de *C. gloeosporioides*, encontrando alta efectividad sobre la germinación de conidios en cultivo *in vitro*, aislados de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae).

Arahana *et al.* (2012) determinaron que el clorotalonil es efectivo previniendo la germinación de esporas de fitopatógenos como *Monilinia Honey* (Sclerotiniaceae). Mogollón y Castaño (2012), evaluaron el efecto *in vitro* de inductores de resistencia y encontraron que el fungicida clorotalonil es efectivo e inhibe totalmente el

desarrollo de la sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mycosphaerellaceae).

#### 4.5. Inhibición *in vitro* del fungicida tiabendazol sobre *Nodulosporium* sp.

El fungicida tiabendazol presentó un efecto altamente significativo sobre el hongo *Nodulosporium* sp., inhibiendo totalmente el crecimiento micelial del hongo, y es importante señalar que se produjo la inhibición desde la concentración más baja (0.5 ppm) y a partir de 2.5 ppm, el micelio del hongo no pudo desarrollarse sobre el medio (Cuadro 10). Este fungicida ejerce una acción sistémica y de contacto a concentraciones bajas, los benzimidazoles inhiben la elongación del micelio y a altas actúan sobre la germinación de las esporas. Además, se conoce que los derivados de benzimidazol interfieren en la mitosis de los hongos y su acción real es debida al efecto sobre los microtúbulos. La inhibición de la formación de microtúbulos trae, como consecuencia, la ausencia de división celular, produciéndose además una desorganización citoplasmática de tipo general (Danaher *et al.*, 2007).

**Cuadro 10.** Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA a diferentes concentraciones con el fungicida tiabendazol a 7 días de evaluación.

Concentración Ppm	Diámetro de micelio (mm)			%C***	%I***
	DV	DH	%I***		
Testigo (0)	86.6	86.6	86.6 a	100.00 a	00.00 c
0.5	12.31	12.31	12.31 b	14.21 b	85.78 b
1	12.13	12.13	12.13 b	14.01 b	85.99 b
2.5	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
5	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
10	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
20	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
40	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
60	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
CV	--	--	4.88	4.88	1.08

DV=Diámetro vertical, DH=Diámetro horizontal, DP=Diámetro promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición. CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey;  $P < 0.05$ ).  $R^2 = 0.99$ ,  $F = 12243.8$ ;  $g/l = 8,89$ ;  $P < 0.0001$ . \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P < 0.001$

Arahana *et al.* (2012) demostraron la efectividad *in vitro* del tiabendazol sobre la germinación de esporas de *Monilinia Honey* (Helotiales: Sclerotiniaceae).

Yossen y Conles (2014) evaluaron de forma *in vitro* en medio envenenado la eficacia de fungicidas con distintos modos de acción y con grupos químicos no relacionados, para el control de *F. oxysporum* Schldl. y *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach y Nirenberg (Hypocreales: Nectriaceae), encontrando que ambos aislados fueron susceptibles significativamente a tiabendazol con valores de 80-99% de inhibición en concentraciones de 1,2 y 4 ppm.

Resultados similares al presente encontraron Ruiz *et al.* (2016), al evaluar el tiabendazol *in vitro* por 8 días contra *Colletotrichum* spp., con un control significativo con crecimiento micelial de 12.54 mm, no obstante; para la inhibición micelial requirieron mayor cantidad de ingrediente activo; concentraciones de 50 a 1000 mg/L (50-1000 ppm).

El hongo *Nodulosporium* obtenido de mazorcas de cacao, presento susceptibilidad a la acción de los fungicidas azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol adicionados en medio PDA. No obstante, de estos tres; el tiabendazol fue más efectivo, ya que con 2.5 ppm inhibe el crecimiento micelial del hongo, por lo que se requiere de poco ingrediente activo para su control, seguido por el clorotalonil que a 1000 ppm ya no permite el crecimiento del hongo y azoxystrobin el menos efectivo por requerir concentraciones altas arriba de 1000 ppm para tener un buen control (Cuadros 8, 9 y 10).

El hongo *Nodulosporium* sp., con base en los resultados de acuerdo a cada fungicida probado, presento diferentes valores en la Concentración Inhibitoria media (CI<sub>50</sub>), lo cual sugiere la variación natural del hongo en niveles de resistencia ante los fungicidas evaluados (Cuadro 11), corroborando la efectividad del tiabendazol con la CI<sub>50</sub> más baja, seguido por clorotalonil y azoxystrobin.

**Cuadro 11.** Concentración inhibitoria y límites fiduciales de fungicidas químicos aplicados a *Nodulosporium* sp., en medio PDA a 7 días de evaluación.

Fungicidas	Ppm			
	CI <sub>50</sub>	Límites fiduciales 95%		CI <sub>90</sub>
		Inferior	Superior	
Azoxystrobin	1290	1056	1479	6024
Clorotalonil	13.7	0.84	40.52	1035
Tiabendazol	0.00003	1.35	0.0041	1.70

## V. CONCLUSIÓN

Los productos químicos azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol y los agentes de control biológico *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* son eficientes para el control *in vitro* del hongo *Nodulosporium* sp.

Los agentes de control biológico mostraron durante el mismo periodo de evaluación un efecto de control de *Nodulosporium* sp., similar a los productos químicos.

Los productos químicos clorotalonil y tiabendazol en bajas concentraciones presentaron un efecto de control efectivo de *Nodulosporium* sp. El producto azoxystrobin para tener un buen control de *Nodulosporium* sp., requiere altas concentraciones. El tiabendazol es el producto más efectivo, y requiere concentraciones muy bajas para el control de *Nodulosporium* sp.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abbott W., S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology* 18: 265-267.
- Achicanoy, L. H. 2001. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. 54 (1) (2):1251-1273.
- Agrios, G. 2004. Fitopatología. Editorial Limusa. Noriega editores 838 pp.
- Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gómez B., Jiménez-Francisco B., García-Moya E. y Preciado-Ortiz R. E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y tosidióforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35:9-21.
- Alexopoulos, C., Mims C. And blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4<sup>th</sup> edition. Jhon wiley & sons. New york. 869 pp.
- Alfonso, P. D.P. y Sandoval S.E.R. 2008. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas. 80pp.
- Altamore, C., Norvell W. A., Bjorkman T. and Harmn G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrientes by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Rifai* 1295-22. *Applied and environmental microbiology*. 65(7): 2926-2933.
- Andrés, Y. M., Melgarejo N. P., García-Jiménez J., Jorda G.M., López G. M., y Duran-Villa N. 1988. Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de agricultura pesca y alimentación. Madrid (España). 2<sup>a</sup> Edición ,559 pp.
- Arahana, V., Borja E., Salgado C., Tobar J. y Torres M. L. 2012. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Monilinia* spp. que afecta el cultivo de durazno (*Prunus persica*) en provincias de la Sierra Ecuatoriana. *Avances*. 4(1): 5-10.
- Aranda, F.J., Teruel J.A. and Ortiz A. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1713:51-56. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>

- Arango, M., Ordoñez N., Castañeda E. Y Restrepo A. 1988. Manual hongos contaminantes del laboratorio. Instituto nacional de salud. Corporación para Investigación Biológica. 127pp.
- Arysta, Life Science. 2017. Ficha Técnica Fungitox ® 720 SC. Disponible en: [http://www.arysta.com.co/ProductosProteccion/PDF/F.T.%20FUNGITOX%20\(vr.%202\).pdf](http://www.arysta.com.co/ProductosProteccion/PDF/F.T.%20FUNGITOX%20(vr.%202).pdf). Fecha de consulta 30 de abril del 2018.
- Atlas, R.M. y Bartha R. 1992. Microbial ecology, fundamentals and applications. Third edition. Ed. Benjamín/Cummings. Redwood city, usa. 69-73,77-83, 463-466pp.
- Avendaño, A. C. H., Villareal F. J. M., Campos R. E., Gallardo M. R. A., Mendoza L. A., Aguirre M. J. F., Sandoval E.A. y Espinosa Z. S. 2011. Diagnóstico del cacao en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 74pp. ISBN: 978-607-12-0219-2.
- Bailey, B.A., Lumsden R.D., 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London. 185–204pp.
- Barnett, H. and Hunter B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. 241 pp.
- Barnett, H. and Hunter B. 1982. Illustrated genera of imperfect fungi. third edition. Burgess publishing. Mineapolis, minesota. Usa 241 pp.
- Barnett, H. L. and Hunter B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society Press. United States of America. 218 pp.
- Bell, D. K., Wells H. D. and Markham C. R. 1982. *In Vitro* Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. *Phytopathology*.72: 379-382.
- Benítez, T., Rincón A.M., Limón M.C. and Codón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma strains*. *International microbiology*. 7: 249-260.

- Boller, T. and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology*. 60:379-406. <http://dx.doi.org/10.1146/an-nurev.arplant.57.032905.105346>.
- Bowman, S.M. and Free S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brotman, Y., Kapuganti J.G. and Viterbo A. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20(2): R390– R391.
- Bulliard, J. B. F. 1791. *Histoire des Champignons de la France*.1:168
- Butt, T.M., Harris J.G. & Powel K.A.1999. Microbial Biopesticides: The European scene. In "Biopesticides. Use and delivery". Eds.F.R. Hill & J.J. Menn. Humana Press, NJ. 23-44pp.
- Camargo, H. 2005. Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza satriva*), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista *Trichoderma harzianum*. *Tranferencia Tecnologica y Emprendimiento CITTE* 20-2. 17p
- Carsolio, C., Benhamou N., Harán S., Cortes C., Gutiérrez A., Chet I. and Herrera-estrella A. 1999. Role de *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3):929-935.
- Castillo, C., Sosa B. y Scorza J. 2004. Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 24(1) (2):65-67.
- Cawoy, H., Debois D., Franzil L., De Pauw E., Thonart P. and Ongena M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens. *Microbial Biotechnology*. 8:281-295. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12238>.
- Cazorla, F. and Romero D. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journada Appl Microbiology*. 103(5):1950-1959.

- Chatterjee, S.N., Bhattacharya T., Dangar T.K. and Chandra G. 2007. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *Afrontier J biotechnology* 6(13):1587-1591.
- Chet, I, Inbar J, and Hadar Y (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, Soderstrom eds. *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Heidelberg: Springer Verlag. 165–184pp.
- Chet, I. and Baker R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma Hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71:286-290.
- Chet, I., Benhamou N., Haran S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Cook R., Baker K.F. 1983. *The Nature and Practise of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, 539pp.
- Chincholkar, S.B., Mukerji K.G. 2007. Biological Control of Plant Diseases. Chincholkar S.B., Mukerji K.G. eds. *Haworth Food and Agricultural Products Press*. The Haworth Press, Inc., New York. 74(1):174. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.10.016>
- Chowdhury, S.P., Hartmann A., Gao X. and Borriss R. 2015. Bio-control mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a Review. *Frontiers in Microbiology*. 6:780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Collins, D.P. and Jacobsen B. J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biological Control* 26(2):153-161.
- Compant, S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Barka E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71:4951-4959. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959>.
- Comunicación Personal, G.R. 2018. Sobre *INodulosporium* sp.
- Corrales, L.C., Sanchez L.C., Cuervo J., Bautista D., Gonzalez L. y Guevara M. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. 8(3):63-759. ISSN: 1794-2470

- Cuervo, L. J.P. 2010. Tesis de asilamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Basicas. 28pp.
- Danaher, M., De Ruyck H., Crooks S.R.H., Dowling G., O’Keeffe M. (2007). Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*. 845(1):1-37. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.046>
- De La Cruz, J., Pintor-Toro J., Benítez T. and Llobell A. 1995. Purification and characterization of an endo -  $\beta$ - 1, 6- glucanasa from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of bacteriology*. 77(7):1864-1871.
- De La Torre-Almaráz. R., F. M. Cota-Trujillo and F. San-Martín. 2003. First report of *Hypoxyton diatrypeoides* inducing Dieback and Black Trunk Rot on Mesquite (*Prosopis laevigata*) in Mexico. *Plant Disease*. 87(4):447.
- De La Torre-Almaráz, R., F. M. Cota-Trujillo, J. L. García-Rojas, J. E. Campos y F. San-Martín. 2009. Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. *Agrociencia*. 43(2):197-208.
- Domsch, k., Gams, W. And Traute–Heide, A. 1980. Compendium of soil fungi. Academic press. London, U.K. 1:430.
- Downer, J., 2006. Diagnosing your oak tree: Part 1 "Diseases". *Landscapes Notes*. University of California. 19 (4):12.
- Ezziyyani, M., Pérez C., Ahmed A., Requena M. and Candela M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*capsicum annum* L.). *Anales de Biología*. 26:35-45.
- Ezziyyani, M., SID A. A., Pérez S.C., Requena M.E. y Candela M.E. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Murcia, España. *Revista, Horticultura*. 19:18-15
- Falardeau, J., Wise C., Novitsky L. and Avis T.J. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis*

- lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*. 39:869-878. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>.
- Faraldo-Gómez, J. D. and Sansom M.S. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:105-116. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1015>.
- Félix-Gastélum, R. y Gálvez-Figueroa, C. A. 2002. Control del moho negro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de azoxystrobin en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:72-76.
- Fgaier, H. and Eberl H.J. 2011. Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *Journal of Theoretical Biology*. 273:103-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.12.034>
- Garisto, B. and Harman G. 2001. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12):5643-5647.
- Gaviria-Hernández, V., Patiño-Hoyos L. F., y Saldarriaga-Cardona A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 14(1):67-75.
- Gong, M., Wang J.D., Zhang J., Yang H., Lu X.F., Pei Y. and Cheng J.Q. 2006. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 *in vitro* and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 38:233-240. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- González, C. M. M., Torres P., I. y Guzmán M. H. 2002. Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. *Proceedings of the 16th International Pepper Conference*.
- Gowan, 2018. Ficha Técnica Trevanil720FW. Disponible en: <http://www.gowanmexicana.com/productosgmd.php?producto=42&idioma=3&categoria>. Fecha de consulta 30 de abril del 2018.
- Grondona, I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M., Mateo P., Bridge P., Monte E. And Garcia-Acha I. 1997. Physiological and biochemical characterization of

- Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (8):3189-3198.
- Hang, N.T.T., Oh S.O., Kim G.H., Hur J.S. and Koh Y.J. 2005. *Bacillus subtilis* s1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathology*. 21(1):59-63.
- Harman, G., Howell C., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2:43-56.
- Hermosa, M., Grondona E., Iturriaga E., Díaz-Minguez J., Castro C., Monte E. and García-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):1890-1898.
- Herrera-López, J., Pérez-Jiménez M., Llobel A., Monte-Vázquez E. & Zea-Bonilla T. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 261-265.
- Herrera, P.E., Pérez B.I.M., Alejo C. J., Suarez T.J.M. y Sánchez R. E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su Control in vitro. *Fitosanidad*, 15(4):231-236.
- Hjeljord, L. and Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biocontrol: An Overview, in 135- 151pp.
- Hladki, A.I. y Romero A.I. 2009. Novedades para los géneros *Annulohyphoxylon* e *Hyphoxylon* (Ascomycota, Xylariaceae) en la República Argentina. *Darwiniana*, 47(2):278-288.
- Holt, J., Krieg N., Sneath, P., Staley J. and Williams S. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 787 p.
- Howell, C. 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.

- Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman G. E., Kubicek C.P. *Trichoderma and Gliocladium*, Taylor & Francis, Padstow. 2:173- 18.
- Ju, Y. M. and Rogers J. D. 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. Mycologia Memoirs 20. APS Press. St. Paul, Minnesota. 382 pp.
- Ju, Y.M., Rogers J.D. and San Martín F. 1997. A Revision of the Genus *Daldinia*. Mycotaxon 61:243- 293.
- Kim, J.S., Lee J., Lee C.H., Woo S.Y., Kamg H., Seo S.G. and Kim S.H. 2015. Activation of pathogenesis-related genes by the *Rhizobacterium*, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. Plant Pathology Journal. 31:195-201. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2014.0122>.
- Kishore, G.K., Pande S. and Podile A.R. 2005. Biological Control of Late Leaf Spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with Chitinolytic Bacteria. Phytopathology. 95:1157-1165. [http:// dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157](http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157).
- Kloepper, J.W., Ryn C.M. and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. Phytopathol 94:1259-1266.
- Kredics, L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Kevei F. and Nagy e. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food technology and biotechnology. 41(1):37-42.
- Kubicek, C. P. and Harman G. E (Eds.). 1998. *Trichoderma and Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis. London, England. 1:300.
- Kullnig, C., Mach R., Lorito M. and Kubicek C. 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. Harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. Applied and Environmental Microbiology. 66(5):2232-2234.
- Layton, C., Maldonado E., Monroy L., Corrales L.C. y Sánchez L.C. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por topatógenos. Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 9:177-187. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.501>.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee P. and Chuenchi S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold

- pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology technology* 48(1):113-121.
- Li, Y., Gu Y., Li J., Xu M., Wei Q. and Wang Y. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>.
- Liu, D., Cai J., Xie C., Liu C. and Chen Y. 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microbial Technology*. 46:252-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007>.
- Lizarazo-Medina, P. X., M. M. Mendoza-Salazar y A. I. Gutiérrez-Gallo. 2014. Diversidad de la microbiota endófitas de *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* cultivadas en invernadero. *Actualidades Biológicas*. 37(102):307-318.
- Lorito, M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M., Transmo A., Woo S.L. & Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Margolles–Clark, E., Hayes, C., Harman G. and Penttila M. 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(6): 2145-2151.
- Márquez-Dávila, K., E. Arévalo; B. León, J. Cayotopa, D. Olivera, G. J. Samuels. 2013. Composición de comunidades de hongos endofitos de cacao nativo en cuencas del alto amazonas del Perú. *Fitopatología*. 45(1):17.
- McGrath, M.T. 2004. Qué son los fungicidas *Trans. Santamaria. L* and Ureta R.J.C. 2014. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.
- Meena, K.R. and Kanwar S.S. 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*. 2015:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/473050>.
- Melgrejo, P., De La Cal A. 2006. Biofungicidas y Control Biológico de Hongos Fitopatógenos: Aplicación en la Filosfera. 28as Jornadas de Productos Fitosanitarios. *Phytoma*, 182:59-63.

- Mestizo, Y. A., G. Bandera, H. Aya, G. Sarria, F. Varón, M. Navia y G. Martínez. 2012. Caracterización de síntomas e identificación de microorganismos en palmas de aceite afectadas por la Pudrición basal del estípote. *Palmas*. 33(4):13-27.
- Michel, A.A.C. 2001: Cepas nativas de *Trichoderma* spp (Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis presentada para obtener el Título Académico de Doctor en Ciencias: Área Biotecnología. Universidad de Colima, México. 152 pp.
- Mogollón, O. A. M. y Castaño Z. J. 2012. Evaluación *in vitro* de Inductores de Resistencia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 65(1): 6327-6336.
- Mondino, P. y Vero S. 2006: Control biológico de patógenos en plantas. Editorial. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158 pp.
- Montealegre J.R., Reyes R., Pérez L.M., Herrera R., Silva P. and Besoain X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal biotechnology*. 6:116-127.
- Moreno-Rico, O., Velásquez-Valle R., Sánchez-Martínez G., Siqueiros-Delgado M. E., Cerda-Lemus M., y Díaz-Moreno R. 2010. Diagnóstico fitopatológico de las principales enfermedades en diversas especies de encinos y su distribución en la Sierra Fría de Aguascalientes, México. 29:165-189.
- Mycobank, Database. 2018. Ubicación taxonómica de *Trichoderma harzianum*. Disponible en: <http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx> Fecha de consulta 15 de mayo.
- Mycobank, Database. 2018. Ubicación taxonómica de *Bacillus subtilis*. Disponible en: <http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx>. Fecha de consulta 15 de mayo.
- Nakamura, L.K., Roberts M.S. and Cohan F.M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. *Nov.* and *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* subsp. *International Journal Systematic Bacteriology*. 49: 1211-1215.

- Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 270:26723-26726. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>.
- Nixon, C.K., 1998. "El género *Quercus* en México". En: *Diversidad biológica de México orígenes y distribución*. UNAM. México. 792 p.
- Oard S., Rush M. C., and Oard J. H. 2004. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology*. 97:169-180.
- Obanor, F., Walter, M., Jones, E., and Jaspers, M. 2005. In vitro effects of fungicides on conidium germination of *Spilocaea oleagina*, the cause of olive leaf spot. *New Zealand Plant Pathology Protection Society*. 58:278-282.
- Ochoa, D. 2004. Determinación de los niveles de sensibilidad en aislamiento colombiano de *Phytophthora infestans* hacia tres fungicidas comúnmente utilizados en su control. Trabajo de grado para optar por el título de microbiólogo industrial. Pontificia universidad javeriana. Facultad de ciencias básicas. 75pp.
- Ongena, M. and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*. 16:115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- Papavizas, G.C. & Lumsden R.D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413.
- Pal, K.K. and Gardener, B.M. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. En: APSnet, [www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI-biologicalControl.pdf](http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI-biologicalControl.pdf). Fecha de consulta: abril de 2018.
- Patiño, L. y Rodríguez M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más relevantes en vid (*Vitis vinifera*), variedad chardonnay en el viñedo San Martín en el municipio de Sogamoso, departamento de Boyacá. Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas.
- Pérez, C. N. 2004: Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127-284 pp.

- Pérez, D. y Iannaccone J. 2006. Control Químico de la Antracnosis Causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en el Cultivo del Camu Camu (*Myrciaria dubia* Myrtaceae) en Ucayali, Perú. *Fitopatología Brasileira* 31(5):518. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000500015>.
- Pérez, G. A., Fernández O.D., De Vicente A., Torrés J.A y López R. F.J. 2005 resistencia a inhibidores de la biosíntesis de ergosterol y a estrobilurinas en oídio de cucurbitáceas. *Phytoma*, Edic. 173.
- Phillip-Mora, W. y Bustillos C. 2009. Catálogo Enfermedades del cacao en Centroamérica. Serie Técnica. Técnico Manual. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 93:24
- Phillips-Mora, W., Castillo J., Krauss U., Rodríguez E. and Wilkinson J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54: 483-490.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R. L., Weller D.M., Van Wees S.C. and Bakker P. A. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347-375. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.
- Plan Rector Cacao Chiapas. 2012 Comité Estatal Sistema Producto Cacao En Chiapas 33 p.p. Disponible en: [http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/EPT%20COMITE%20SISTEMA%20PRODUCTO%20CACAO%20CHIAPAS/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR\\_CACAO\\_CHIAPAS\\_2012.pdf](http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/EPT%20COMITE%20SISTEMA%20PRODUCTO%20CACAO%20CHIAPAS/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CACAO_CHIAPAS_2012.pdf).
- Pretali, L., Bernardo L., Butterfield T.S., Trevisan M. and Lucini L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. *Phytochemistry*. 130:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04>.

- Raaijmakers, J.M. and Mazzola, M. 2012. Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. Annual Reviews of Phytopathology. 50:403-424. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-17>.
- Reinoso-Pozo, Y., Vaillant-Flores D., Casadesús-Romero L., García-Pérez E. y Pazos V. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos patógenos. Fitosanidad. 11(1):35-40.
- Rey, M., Delgado-Jarana J., Rincón, A.M., Limón M.C. y Benítez T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicida. Revista Iberoamericana de Micología 17:31-36.
- Riegel, D. and Nielsen G. 1996. *Trichoderma* spp. as plant growth stimulants. CRC. Critical Reviews in Biotechnology 7(2): 97-106.
- Rincón, A.M., Codón A.C., Benítez T. 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás V., Escobar C., Rodríguez P. P. y Marcos J.F. (eds.), Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 345-368pp.
- Rivero, G.D. 2008. Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oriza sativa* L.). Revista de Protección Vegetal. 23(1):67.
- Rogers, J. D., Ju Y.M., and Adams M. J. 2018. Home of Xylariaceae. Mycology. Disponible en: [http://mycology.sinica.edu.tw/Xylariaceae/Format/but\\_YMJ.jpg](http://mycology.sinica.edu.tw/Xylariaceae/Format/but_YMJ.jpg). Fecha de consulta: 22 de abril del 2018.
- Román, A. 2014. Manual de Métodos y mecanismos de acción de los fungicidas. Control de Enfermedades I. Escuela superior Politecnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Agronómicas. 93pp.
- Romo, D.B., Velázquez V.R., Siqueiros D.M.E., Sánchez M.G., De la Cerda L.M., Moreno R.O. y Pérez M.B.E., 2007. "Organismos con efecto potencial en el declinamiento de encinos de la Sierra Fría, Aguascalientes, México". Investigación y Ciencia, 15:11-19.
- Rubio, S.V. y Fereres C.A. 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos 16pp.

- Ruiz-Ramírez, R., J. Hernández-Morales, V. Ayala-Escobar, L. Soto-Rojas, S. Gerardo Leyva-Mir y J. Hernández-Ruiz. 2015. Hongos Asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Deshidratados y Almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(1):12-30.
- Ruíz, R. F. G., Cruz V. J. K., Narciso Y. Ávila S. N. Y. y Santíz, R. E. 2016. Evaluación de la sensibilidad in vitro ejercida por Azoxystrobin, Metalaxil-M, Tiabendazol, Trifloxistrobin, en *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en frutos de papaya (*Carica papaya*). *Temas de Ciencia y Tecnología*. 20 (60): 57-64.
- Ryu, C.M., Hu C.H., Reddy M.S. and Kloepper J.W. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*.160:413-20. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00883.x>
- Salgado, S. C y M. C. G Cepero. 2005. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22: 99-101.
- Sánchez-Fernández, R. E., D. Diaz, G. Duarte, P. Lappe-Oliveras, S. Sánchez and M. L. Macías-Rubalcava. 2016. Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology*. 71(2): 347-364.
- San Martín, F. 1992. A mycofloristic and cultural study of the Xylariaceae of Mexico. Ph. D. Thesis. Washington State University. Pullman, Washington. 560 pp.
- San Martín, F., Ju Y. M. y Rogers J. D. 1999. Algunas especies de *hypoxylon* (Pyrenomycetes, Xylariaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*. 47:31-53.
- S.A.S., Institute. 2002. The SAS System for Windows, Release 9.0. SAS, Institute, Cary N. C. U.S.A.
- Schaad, N. W., Jones J. B. and Chun W. (Eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. The American Phytopathological Society Press. United States of America. 373 pp.

- Schmitz, R. A., Rolf D., Deppenmeier U. and Gottschalk G. 1999. The anaerobic way of life. En *The Prokaryotes on line*. Ed. M Dworkin. Springer-Verlag, New York, EUA. 1115pp.
- Senghor, A.L., Liang W.J. and Ho W.C. 2007. Integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit in taiwan by the combination of *Bacillus subtilis* and fruit bagging. *Biocontrol Sci Technology*. 17(8):865-870.
- Sha, J., Tian H. and Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31:446-459. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>.
- Sharma, R. R., Singh D. and Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50: 205-221.
- SIAP. 2017. Cacao, de la época prehispánica para el mundo [www.gob.mx/firco/articulos/cacao-de-la-epoca-prehispanica-para-el-mundo?idiom](http://www.gob.mx/firco/articulos/cacao-de-la-epoca-prehispanica-para-el-mundo?idiom). Fecha de consulta 24 de abril del 2018.
- SIAP. 2017. Economía Social con sabor a cacao <https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/economia-social-con-sabor-cacao?idiom=es> fecha de consulta 24 de abril del 2018 48:21–434.
- SIAP. 2018. Avance de siembras y cosechas. Situación al 31 de MARZO de 2018. [infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenDelegacion](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion). Fecha de consulta 24 de abril del 2018
- Sid, Ahmed A., Pérez Sánchez C. & Candela M.E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824.
- Singh, U.B., Malvivya D., Wasiullah, Singh S., Imran M., Pa-thak N., Alam M., Rai J.P., Singh R.K., Sarma B.k., Sharma P.K. and Sharma A.K. 2016. Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology*: 108:300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>.

- Sir, E. B., Hladki A. I., Parrado M. and Romero A. I. 2002. Biodiversity of Xylariaceae (Ascomycota) and their hosts in protected areas from Tucuman (Argentina): Biodiversidad de la familia Xylariaceae (Ascomycota) y sus hospedantes en áreas protegidas de Tucumán (Argentina). *Kurtziana*, 37(2): 35-48.
- Soldano, A., Garate V., Vaccari M.C., Latorre R. G., Lurá M.C. y González A.M. 2010. Inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchii* por especies de *Bacillus* y efecto sobre la acumulación de cercosporina. *FAbIClb*. 14:97-106.
- Sosa, A., Carreras B., Fernández-Larrea O. y Torres D. 2006. Aislados de *bacillus* spp. Promisorios para el control de hongos patógenos. *Fitosanidad* 10(2):55.
- Stefanova, M., Leiva A., Larrinaga L. y Coronado M. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 16: 509-516.
- Suarez, C., Fernández R., Valero N., Gámez N. y Peaz A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Zacc. Asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(3): 35-43.
- Swiecki, T.J. and Bernhardt. 2006. A field guide to insects and diseases of California oaks. Gen. Tech Rep. PSW-GTR-197. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 151 p.
- Syngenta Agro, S. A. de C.V. 2018. Benzimidazol. Disponible en: <http://www.agromich.com/imagenes/productos/tecto/63.pdf>. Fecha de consulta 30 de abril del 2018.
- Syngenta Crop, protection S. A. 2018. Azoxystrobin. Modo de penetración Disponible en: <http://www.ingagricola.com/wp-content/uploads/2017/04/AMISTAR-50-WG.pdf>. Fecha de consulta 30 de abril del 2018.
- Tabares, F. 2002. Evaluación *in vitro* de diferentes compuestos químicos agrícolas para el control de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. Acutatum*, causantes de la antracnosis de los cítricos. Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. 78pp.

- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía M. M. y Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 42:131-138. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>.
- Thomson, W. 1997. *Agricultural Chemicals. Book IV: Fungicides*, Thomson Publications, Fresno, CA. 12 Edition. 236pp.
- Thyagarajan, S. I., Ramanathan G., Singaravelu S., Kandhasamy S., Perumal P.T. and Sivagnam U.T. 2017. Microbial Side-rophore as MMP inhibitor: An interactive approach on wound healing application. *Wound Medicine*. 17:7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wndm.2016.12.002>.
- Torres de la Cruz, M., Ortíz García C. F., Téliz Ortíz D., Mora Aguilera, A. y Nava Díaz C. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:65-69.
- Touré, Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A. and Thonart P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 1151-1160. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Valencia, A.S. 2004. "Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México". *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 75: 33-53.
- Van der Gucht, K., Ju Y.M y Rogers J. D. 1997. New *Hypoxylon* species from Papua New Guinea and notes on some other taxa. *Mycologia* 89(3):503-511
- Vázquez, S. L., Tamarit U.J.C., Quintanar O.J. y Varela F.L., 2004. "Caracterización de la declinación de bosques de encino en "Sierra de Lobos" Guanajuato, México". *Polibotánica*. 17:1-14.
- Vazquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales C. and Herrera-Estrella A. 1998. Analysis of the  $\beta$ -1, 3- glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4):1442-1446.

- Verma, M., Brar S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. and Valéro J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.; Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37:1-20.
- Villa, P., Alfonso I., Rivero M.J. y González G. 2007. *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, Icidca. 41(1):52-56.
- Viterbo, A., Ramot O., Chernin L. and Chet I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:549–556.
- Volpon, L., Besson F., Lancelin J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS Letters* 485: 76-8
- Wang, X., Wang L., Wang J., Jin P., Liu H. and Zheng, Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-Induced Resistance to *Colletotrichum acutatum* Is Associated with Priming of Defense Responses in Loquat Fruit. *PLOS ONE*. 9 (11):e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>
- Whips, J.M. 2001. Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:482- 511.
- Wilson, B.R., Bogdan A.R., Miyazawa M., Hashimoto K. and Tsuji Y. 2016. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*. 22:1077-1090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mol-med.2016.10.005>.
- Wulff, E. G., Mguni C. M., Mansfeld-Giese K., Fels J., Lübeck M. and Hockenhull J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Plant Pathology* 51(5): 574-584.
- Yossen, V. E. y Conles M. Y. 2014. Eficacia de fungicidas in vitro para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. *Revista Industrial y Agrícola Tucumán*. 91(1): 19-25.

- Zago, E.L., zago C.C. and Ferreira Da Silva A. 2001. Selecao de *Trichoderma* spp. Visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. *Ciencia Rural*. 31(5): 885- 887.
- Zhang, B., Qin Y., Han Y., Dong C., Li P. and Shang Q. 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular tar- gets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. *Biochimica Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics*. 1864:1152-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.003>