

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Interacción de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Sin. *F. moniliforme* Sheld.) en diferentes materiales de maíz y evaluación *in vitro* con *Trichoderma* spp. como biocontrol.

POR:

EPIFANIO CASTRO DEL ANGEL

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO

PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Interacción de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Sin. *F. moniliforme* Sheld.) en diferentes materiales de maíz y evaluación *in vitro* con *Trichoderma* spp. como biocontrol.

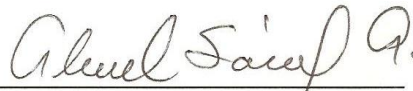
POR:

EPIFANIO CASTRO DEL ANGEL

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:


INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

APROBADA POR:



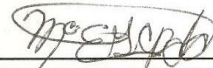
Dr. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE

ASESOR PRINCIPAL



MC. ANGÉLICA BERLANGA PADILLA

COASESOR



MC. Ma. ELIZABETH GALINDO CEPEDA

COASESOR



Dr. MARIO ERNESTO VÁZQUEZ BADILLO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Coordinación
División de Agronomía



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Marzo de 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por no desampararme y enseñarme el camino de la vida, por bendecirme en todo momento, por darme salud y bienestar. Por permitirme lograr una etapa más en mi vida.

A mi “ALMA MATER” por darme alojamiento, por permitir mi formación profesional y por todos los momentos que en ella viví.

Al Dr. Abiel Sánchez Arizpe por su apreciable e incondicional amistad, sus consejos, su disponibilidad y por hacer posible este trabajo.

A la MC. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por su colaboración, disposición y sus aportaciones en este trabajo.

A la MC. Angélica Berlanga Padilla por su colaboración y sus aportaciones en este trabajo de tesis.

A la T.A. Silvia Ovalle Nava y María Cristina Sánchez Valdés por su amistad y sus consejos y por apoyarme en este trabajo.

“A todos ellos mil gracias”

DEDICATORIA

A mis padres:

Alfredo Castro Peña y Rafaela del Ángel Hilario

Por depositar toda su confianza en mí y permitirme seguir superándome, por su apoyo moral y económico, por su cariño y amor que me han brindado siempre y enseñarme las cosas buenas de la vida, por todos sus sabios consejos y por todos los bellos momentos que he vivido con ellos.

A mis abuelos:

Pablo del Ángel Rodríguez y Juana Hilario Martínez

Por su cariño y amor que me brindaron siempre, por sus consejos y por estar conmigo siempre, aunque uno de ellos se me ha adelantado en el camino de la vida, pero nunca lo he de olvidar.

A mis Hermanos:

Alfredo, Ramsés y Yariela Rubí

Por darme su cariño y su amistad y por todos los momentos que hemos vivido juntos, por todo el amor y aprecio que me han brindado.

“Con todo amor y cariño para ellos”

A mi novia:

Rosy que con ella he vivido momentos muy bonitos, llego cuando menos lo esperaba y le dio sentido a mi vida, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su cariño, amor, comprensión y por permitirme formar parte de su vida.

A mis amigos:

Abraham, Bernardo, Daniel, Omegar, Juan, Karen y Mario, por su apreciable e incondicional amistad, por todos los buenos momentos que pase con todos ellos y por aguantar mi forma de ser, porque sé que a veces soy insoportable, a todos mis compañeros de la generación CX de parasitología.

A mi primo:

Alberto Nieto que con el pase parte de mi niñez, por su apreciable amistad y estar conmigo en las buenas y en las malas.

Señor:

Ayúdame a decir la verdad delante de los fuertes

Y a no decir mentiras para ganarme el aplauso de los débiles.

Si me das fortuna, no me quites la razón.

Si me das éxito, no me quites la humildad.

Si me das humildad, no me quites la dignidad.

Ayúdame siempre a ver la otra cara de la medalla,

No me dejes inculpar de traición a los demás por no pensar

igual que yo.

Enséñame a querer a la gente como a ti mismo y a no juzgarme

como a los demás.

No me dejes caer en el orgullo si triunfo, ni en la desesperación

si fracaso.

Más bien, recuérdame que el fracaso es la experiencia que

precede al triunfo

Mahatma Gandhi

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” (UAAAN) consistió en seleccionar 100 semillas de diferentes materiales de maíz al azar, la variable a evaluar fue incidencia de *F. verticillioides*, se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y una total de 80 unidades experimentales, obteniendo los siguientes resultados: la incidencia de *F. verticillioides* se encontró en niveles de 92.0 % en el material criollo negro y de 43.0 % en el teocintle y un 72.75 % de incidencia. Así mismo se identificaron y cuantificaron los hongos asociados a la semilla, obteniendo resultados de 72.75% para *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* sp. (1.25%), *Aspergillus niger* (1.62%), *Aspergillus flavus* (3.125%) y 21.25% de granos que no se infectaron. Se probó a *Trichoderma* spp. como biocontrol de *F. verticillioides* en cultivos duales y mediante la producción de metabolitos, Los porcentajes de inhibición en cultivos duales, fueron procesados por un análisis de varianza en un diseño completamente al azar, arrojando los siguientes resultados: 42.64% y 57.23% de inhibición respectivamente. *T. longibrachiatum* recibió calificación de uno en la escala de clasificación de Bell *et al.*, (1982); *T. asperellum* cepa T22 recibió calificación de 2 en la misma escala. Para probar la antibiosis de las dos especies de *Trichoderma* mediante la producción de metabolitos en medio líquido PD (Papa Dextrosa), se hicieron inoculaciones a 500 y 1000µL del filtrado y se sembraron discos de 5mm de diámetro con micelio de *F. verticillioides*, incubándose a 28°C por espacio de siete días, se hicieron evaluaciones del crecimiento micelial cada 24h, los resultados del área de crecimiento y del porcentaje de inhibición fueron procesados por un diseño completamente al azar con arreglo factorial **A x B** donde **A:** es la dosis a ensayar y **B:** son el número de días de exposición del patógeno al filtrado, *T. longibrachiatum*, a 500µL (dosis 1) inhibió 20.44% el desarrollo del patógeno y a 1000µL (dosis 2) un 13.7%. Para el hongo *T. asperellum* cepa T22 se encontró inhibición de 28.86% a 500µL y 28.72% a 1000µL.

Palabras clave: Patología de semillas, incidencia, micoflora, antagonismo, antibiosis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Importancia del maíz.....	4
Importancia económica de <i>Fusarium verticillioides</i>	5
Clasificación taxonómica del patógeno.....	5
Descripción del patógeno.....	6
Influencia del ambiente y fuente de inóculo del hongo <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i>	7
Distribución del patógeno.....	8
Diseminación del hongo.....	9

Infección natural de <i>Fusarium verticillioides</i>	10
Sintomatología de la enfermedad causada por <i>Fusarium verticillioides</i>	10
Toxinas producidas por especies de <i>Fusarium</i>	11
Descripción del genero <i>Trichoderma</i>	12
Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i>	13
Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	13
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Localización del experimento.....	16
Materiales genéticos.....	16
Cepas de antagonistas.....	16
Medios de cultivo usados en el experimento.....	19
Aislamiento del patógeno.....	20
Identificación del hongo.....	20
Purificación.....	21
Ensayo No. 1: Incidencia de <i>F. verticillioides</i>	21
Diseño experimental.....	21
Análisis estadístico.....	21
Ensayo No. 2: Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el patógeno <i>F. verticillioides</i> en cultivo dual.....	22
Análisis estadístico.....	24

Ensayo No. 3: Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibiótico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el patógeno <i>F. verticillioides</i> mediante incorporación de filtrado de <i>Trichoderma</i> spp. al medio.....	24
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
Apéndice.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Equipos, aparatos, instrumentos, materiales y sustancias utilizados (as) en la investigación.....	18
2	Escala de (Bell <i>et al.</i> 1982).....	23
3	Incidencia de hongos asociados a semillas de maíz. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.....	27
4	Componentes del medio verde de malaquita agar (MGA): (Castellá <i>et al.</i> , 1997) citado por (Leslie and Summerell 2006)	42
5	Análisis de varianza de incidencia para <i>F. verticillioides</i>	42
6	Resultados de la comparación de medias de incidencia para <i>F. verticillioides</i>	43
7	Análisis de varianza para PICR (Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial)	43
8	Resultados de la comparación de medias para PICR.....	44
9	Radios de crecimiento del patógeno (RCP) y radios de crecimiento de antagonistas (RCA), correspondientes a cultivos duales evaluados a las 120 h.	44
10	Análisis de varianza para antibiosis, mediante la incorporación de filtrado de <i>T. longibrachiatum</i> contra <i>F. verticillioides</i>	45

11	Comparación de medias para <i>F. verticillioides</i> mediante antibiosis por el efecto del filtrado de <i>T. longibrachiatum</i>	45
12	Tabla de medias respecto al crecimiento diario acumulado de <i>F. verticillioides</i> tratado con filtrado de <i>T. longibrachiatum</i> respecto a las dos dosis.....	46
13	Análisis de varianza para antibiosis, mediante la incorporación de filtrado de <i>T. asperellum</i> contra <i>F. verticillioides</i>	47
14	Comparación de medias para <i>F. verticillioides</i> mediante antibiosis por el efecto del filtrado de <i>T. asperellum</i>	47
15	Tabla de medias respecto al crecimiento diario acumulado de <i>F. verticillioides</i> tratado con filtrado de <i>T. asperellum</i> respecto a las dos dosis.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructuras morfológicas de <i>F. verticillioides</i> A: Macroconidios, B: Conidióforo, C: microconidios (Fotos: E. castro). Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.	25
2	Incidencia de hongos asociados a semillas de maíz. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.....	27
3	Incidencia del hongo <i>F. verticillioides</i> . Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.....	28
4	Escala de clasificación: Clase 1: <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izquierda), Clase 2: <i>Trichoderma asperellum</i> (derecha) (Fotos: E. Castro). Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.....	29
5	Efecto de las dos dosis del filtrado de <i>Trichoderma</i> spp. en el desarrollo de <i>F. verticillioides</i> mediante antibiosis concerniente a la comparación de medias. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.....	31

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz en México se caracteriza por la producción de una amplia gama de variedades, por lo que es posible generar una gran cantidad de productos finales: tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, etcétera.

Por lo general, en nuestro país se hace mención principalmente de dos variedades de maíz: blanco y amarillo o forrajero. El maíz blanco se produce exclusivamente para el consumo humano, en virtud de su alto contenido nutricional; en tanto que el maíz amarillo se destina al procesamiento industrial y a la alimentación animal, se producen diversas variedades, sin embargo la más importante es la del maíz blanco, cuya participación en la producción total de maíz fue de 94.6% en 2004 y 92.9% durante 2005, lo que representa un volumen de producción promedio anual de 19.2 millones de toneladas.

Uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola y de la calidad de las cosechas lo constituyen las plagas y enfermedades, las cuales atacan a los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento hasta la recolección y aun en los almacenes. En el caso del maíz es atacado por diferentes plagas y enfermedades como son hongos, bacterias fitoplasmas, virus, nematodos, insectos, plantas parasitas entre otros.

Una de las restricciones para la movilización de productos, es el alto contenido de residuos tóxicos a causa de la aplicación de químicos con el fin de lograr una cosecha de calidad, dicho esto porque sólo se ve reflejado en el exterior pero el contenido del fruto, grano o semilla en realidad no se hace mención del contenido de residuos tóxicos, al menos que sea para exportación, pero en el mercado local o nacional se queda lo peor de la cosecha y a final de cuentas es lo que consumimos los mexicanos, con la finalidad de que cada vez se consuman alimentos libres de pesticidas el uso de hongos, bacterias o incluso insectos como control biológico, son una herramienta en la agricultura para el manejo integrado de plagas y enfermedades, otra de las ventajas es que el biocontrol de enfermedades es una manera de respetar a la naturaleza y hacer control racionalmente, para no seguir dañando al medio

ambiente, anqué todavía no es muy aceptado, porque a los agricultores les gusta ver el efecto muy rápido y el biocontrol tiende a ser un poco lento.

La calidad de las semillas depende mucho del manejo que se de en campo, es de mucha importancia el buen manejo de los cultivos debido a que de ello depende la producción, además que en las semillas muchos de los hongos se pueden alojar siendo el más relevante *Fusarium verticillioides* el cual se hospeda en forma de micelio o de conidios bajo el pericarpio del grano, por lo tanto tiene mayor prioridad en el manejo de la enfermedad como fuente de inóculo, aunque hay mucha controversia entre autores algunos comentan que la siembra de semilla infectada con *F. verticillioides* no es importante en el ciclo de la enfermedad y otros resaltan que la siembra de semilla infectada se debe a dicho hongo, sea cual sea la razón de la enfermedad creo debemos conocer a que nos estamos enfrentando y la capacidad que tiene el hongo para sobrevivir en el ambiente y causar enfermedades.

Además varios hongos del género *Fusarium* producen una serie de metabolitos secundarios tóxicos llamados “micotoxinas” pertenecientes a la clase de las fumonisinas. Se conocen al menos 18 tipos de estas micotoxinas, siendo las fumonisinas B1, B2 y B3 las mayoritariamente aisladas en alimentos. Se han detectado fumonisinas en maíz y sus productos derivados en todo el mundo y se han notificado concentraciones relevantes en alimentos para consumo humano a base de maíz. Estas micotoxinas son bastante estables en los métodos de elaboración de alimentos.

Las principales especies productoras de fumonisinas son *Fusarium verticillioides* (sinónimo de *F. moniliforme* Sheld.) y *F. proliferatum*, que son hongos comunes del suelo, suelen encontrarse en cereales cultivados en regiones templadas de todo el mundo y son especialmente abundantes en maíz.

OBJETIVOS

Objetivo general

Detección de *F. verticillioides* y su biocontrol por *Trichoderma* spp.

Objetivos específicos

- Identificación de *F. verticillioides* y cuantificación de hongos asociados a la semilla de maíz (Micoflora)
- Determinar la incidencia de *F. verticillioides*
- Determinar la efectividad biológica de *Trichoderma* spp. en cultivos duales y a diferentes dosis mediante incorporación del filtrado, como biocontrol de *F. verticillioides*

Hipótesis

Al menos en uno de los materiales de maíz se encontrará la presencia de *F. verticillioides* y las cepas de *Trichoderma* spp. poseen efecto antagonista en el hongo *F. verticillioides*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del maíz

El maíz es el cultivo más importante de México, forma parte importante en la dieta de los mexicanos; está presente en la elaboración de más de 4 mil productos, ocupa poco más de la mitad de la superficie sembrada del país; representa casi una tercera parte del valor de la producción agrícola; existen poco más de 3 millones de productores de este grano, y es el cuarto productor mundial después de Estados Unidos, China y Brasil (FAO 2009).

Producción nacional

Los principales Estados productores de maíz amarillo son: Chihuahua, Jalisco y Tamaulipas, con una producción total nacional de 1, 330,127.71 toneladas. Los principales estados productores de maíz blanco son Sinaloa, Jalisco y Michoacán con 17, 961,283.54 toneladas. Sinaloa mantiene el 23 % de la producción con más de 4 millones toneladas de maíz, seguido de Jalisco, Michoacán y Chiapas que producen 2, 285,009 , 1,288,971 y 1,228,506 toneladas del grano, respectivamente (SIAP, SIACON, SAGARPA, 2009).

Producción mundial

El principal país productor de maíz en el mundo es Estados Unidos con el 51% del total, con una producción cercana a los 300 millones de toneladas por año. China y Brasil poseen cada uno el 23% y 7%, respectivamente, de la producción mundial. En el 2004 China produjo casi 131 millones de toneladas en una superficie de 25, 000,000 hectáreas, lo cual lo coloca como el segundo productor mundial de este grano, mientras que México produjo en el mismo año 21 millones de toneladas, en una superficie 8, 000,000 de hectáreas, lo que lo coloca en el cuarto lugar (FAO 2009).

Importancia económica de *Fusarium verticillioides*

El hongo *F. verticillioides* es el hongo más importante que limita en gran medida la producción de maíz, causando cuantiosas pérdidas económicas; así como cambios en su contenido nutritivo, sabor en los productos y contaminación de los granos con micotoxinas; además se sabe que este hongo es el más frecuente encontrado atacando a la mazorca (Damarys *et al.*, 1976).

Los hongos reducen la calidad de los alimentos y de las semillas, esto se debe a la producción de sustancias tóxicas y la baja capacidad de germinación; siendo los responsables de la producción de metabolitos conocidos como micotoxinas, las especies que corresponden a los géneros de *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, (Agris, 2005).

F. verticillioides en su etapa sexual produce ácido giberélico en grandes cantidades y causa la enfermedad conocida como “Bakanae” o gigantismo del arroz en Asia Oriental y a la cual se le atribuía más del 70% de las pérdidas de variedades tempranas. El síntoma principal que presenta dicha enfermedad es un alargamiento exagerado de las plántulas (Muntañola, 1999).

Clasificación taxonómica del patógeno (Agris, 2005)

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Hypocreales

Género: *Fusarium*

Especie: *verticillioides*

Descripción del patógeno

F. verticillioides tiene microconidias unidas en cadenas en forma de cabezuelas falsas, unicelulares o bicelulares, en forma de huevos de una coloración que va desde el amarillo hasta el rosado. Macroconidias que tienen forma de punta en los dos extremos con el ápice algunas veces en forma de gancho, con células en la parte de abajo que puede ser verdadera o falsa y estos pueden estar agrupados o desorganizados, cuando están agrupados se denotan brillantes, de color salmón al perder completamente humedad (Alexopoulos y Mims, 1979).

Romero (1988), describió al estado perfecto de *F. verticillioides* con las siguientes características: periferias violáceas, con centrum tipo nutria, ascas cilíndricas adelgazadas en la parte basal; ascosporas en forma oval con los extremos redondeados, bicelulares, con una fase conidial caracterizada por microconidias abundantes, agrupadas en forma de cadenas largas y cortas hialinas, unicelulares; macroconidias angostas de paredes adelgazadas.

Barnett y Hunter (1998), describieron a *F. verticillioides* como micelio extenso algodonoso en cultivo, frecuentemente con algo de tinte rosa, púrpura o amarillo en el medio; conidióforos variables, delgados y simples o gruesos y cortos, ramificados irregularmente o en verticilos de fialides, simples o agrupados en esporodoquios; conidias hialinas, variables, principalmente de dos clases, frecuentemente contenidos en pequeñas cabezas húmedas: macroconidias de varias células ligeramente curvadas o encorvadas en las puntas, típicamente con forma de canoa: microconidias unicelulares, ovoides u oblongas, simples o en cadenas.

El estado perfecto de *F. verticillioides* es *Gibberella fujikoroi* presenta peritecios globosos, violáceos o azulados, negruzcos, blandos y ostiolados. Se pueden formar superficialmente o dentro de un estroma, y pueden estar aislados o en grupos. Las ascas son hialinas, cilíndricas a claviformes y contienen ocho ascosporas fusiformes, ligeramente curvadas y con uno a tres septos (Herrera y Ulloa, 1990).

Influencia del ambiente y fuente de inóculo del hongo *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides inverna en forma de peritecios o micelio en restos de plantas infectadas, particularmente en los tallos de maíz, en la primavera cuando el clima es cálido o húmedo, las ascosporas maduras son liberadas y llevadas por el viento hacia los tallos o mazorcas del maíz, en los cuales penetran directamente o a través de heridas de la planta. También forma conidios en los restos infectados de la planta de maíz, pero los produce con mayor frecuencia en órganos vegetales infectados, sirviendo como inóculo secundario (Agrios, 2005).

Manzo y Claflin (1984), mencionan que en estudios experimentales demostraron que *F. verticillioides*, a pesar de ser un hongo que no forma estructuras de supervivencia como clamidosporas o esclerocios, puede soportar condiciones ambientales muy adversas. Por ejemplo, en Kansas se encontró que puede soportar temperaturas de -16 °C por seis meses o pasar el invierno con temperaturas de hasta 30°C bajo cero; como conidias o hifas en trozos de tallo de sorgo, sin pérdida de viabilidad o patogenicidad.

Reyna (1990), menciona que el crecimiento óptimo de *F. verticillioides* oscila entre los 26 y los 33 °C, y que a temperaturas mayores el crecimiento disminuye.

Cotten y Munkvold (1998), reportan que en residuos de tallo de maíz incorporados al suelo, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* pueden sobrevivir cuando menos por 630 días; esto demuestra que los residuos son una importante fuente de inóculo a largo plazo.

La mayoría de las especies de *Fusarium* son parásitos facultativos y pueden permanecer en forma saprofita en el suelo o rastrojo, pero cuando las condiciones ambientales son favorables se constituyen en fuente de inóculo, iniciándose una interacción con el hospedero durante el ciclo del cultivo y causar enfermedades severas en genotipos susceptibles (Cisneros *et al.*, 2007).

Distribución del hongo

Kucharer (1966) y Naik *et al.* (1982), concluyeron que el hongo *F. verticillioides* lo encontraron establecido en todo el globo terráqueo y sobre todo en zonas templadas, húmedas y semihúmedas, las cuales podemos encontrarlas en las regiones tropicales y subtropicales.

Diversos autores señalan que el hongo *F. verticillioides* tiene una amplia distribución geográfica y un rango de hospederos importante, ataca cultivos como: sorgo, maíz, higo, espárrago, pino y caña de azúcar entre otros (Booth, 1971; Gilbertson *et al.*, 1981).

García (1979), encontró que *F. verticillioides* se encuentra establecido en las zonas maiceras de México las cuales tienen las condiciones bióticas y abióticas necesarias para la sobrevivencia del hongo, el cual causa cuantiosas pérdidas en las cosechas.

Calvert *et al.* (1983), mencionan que en el estado de Missouri los hongos predominantes en muestras analizadas fueron *F. verticillioides* y *F. verticillioides* var. *subglutinans*.

Bottalico *et al.* (1985), encontraron que los tallos enfermos de maíz contenían zaelalenona, toxina producida por el hongo *F. verticillioides*.

González *et al.* (1988), reportaron que los estados de Puebla y Tlaxcala en esos últimos años tuvieron un incremento en el ataque de *F. verticillioides* provocando en las mazorcas con madurez fisiológica y comercial germinación anticipada y pudrición del grano de maíz.

En EE. UU. Leslie *et al.* (1990), determinaron que *F. verticillioides* es la especie que predomina en la parte central y oriental, como patógeno de sorgo y maíz. También señalan que algunas razas de este hongo pueden producir micotoxinas asociadas a graves enfermedades tanto en humanos como en animales.

Chulze *et al.* (2000), mencionaron que *F. verticillioides* causa epidemias destructivas por pudrición de la mazorca en África, Asia, Europa, Norte América, y Sur América.

Diseminación del hongo

Existen varias formas las cuales pueden favorecer a la diseminación del hongo *F. verticillioides* entre los cuales podemos mencionar al hombre, animales, agua, viento e insectos que juegan un papel importante en el incremento de infecciones en las plantas.

Foley (1960), concluyó que el hongo *F. verticillioides* es sistémico y que las plantas de maíz son contaminadas por inóculo el cual es transportado por el viento o el que se encuentra invernando en el suelo, penetrando por la parte basal del tallo, hojas y mazorca. El hongo cuando es alojado en el tallo vive en los nudos y entrenudos de la parte más baja de la planta, debilitándola y haciéndola susceptible al acame.

Scott y Futrell (1970), reportaron al barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* como acarreador de conidias de *F. verticillioides* y que puede inocular plantas sanas al alimentarse del tallo.

Gilbertson *et al.* (1976), observó que entre mayor incidencia de diabroticas deambulaban encima de la mazorcas, aumentaban las posibilidades de tener niveles altos del hongo *F. verticillioides* causante de la pudrición del tallo.

Ooka y Kommendahl (1977), observaron que el aire, era el más efectivo diseminador del patógeno y al hacer monitoreo de diseminación por aire encontraron muestras de las estructuras del hongo hasta distancia que se calcularon entre 300 y 400 km de distancia.

Gilbertson *et al.* (1986), reportaron que en el este de Colorado, EE.UU., en los años de 1982, 1983, y 1984, las plagas de suelo fueron abundantes; en particular individuos de *Diabrotica virgifera*, colectados en diversos sitios se aislaron los hongos *F. verticillioides* y *F. subglutinans*. También se indicó que la abundancia de coleópteros sobre las mazorcas y la cantidad de granos contaminados por los hongos antes citados se correlacionaron positivamente, sugiriendo que las diabroticas fueron los vectores de los hongos.

Infección natural de *Fusarium verticillioides*

Kucharek y Kommendahl (1966), afirman que la infección puede ocurrir en el campo a través de heridas o de grietas en los entrenudos.

Varios investigadores (Lucado, 1970; Kucharek y Kommendahl, 1966), han considerado que la siembra de semilla infectada con *F. verticillioides* no es importante en el ciclo de la enfermedad.

Varias investigaciones han reportado que la infección es mediante semilla (Koehler, 1936; Manns y Adams, 1923; Pammel *et al.*, 1916).

Koehler (1936), señaló que el patógeno penetra por la región de los vellos del jilote, se disemina a las brácteas y pedicelos a través del xilema y finalmente se disemina hasta la raíz. La infección interna del grano no se establece hasta que la mazorca se aproxima a la madurez.

Sintomatología de la enfermedad causada por *Fusarium verticillioides*

Fuentes (1960), reportó en sus observaciones que los síntomas de infección por *F. verticillioides* se denota al encontrarse un color rosado a rojizo hasta llegar a un color gris en los granos de la mazorca.

En el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (1978), se observó que al existir hongos con coloración café- rojizo en los entrenudos basales, eran características de invasión del hongo *F. verticillioides* el cual en ataques severos los debilitan y estas podían sucumbir fácilmente por la acción del viento y de la lluvia.

Álvarez (1984), menciona que cuando la infección por *F. verticillioides* inicia por las raíces trae como consecuencia que las hojas de la parte superior presenten coloración grisácea y estas mueran (la planta parece como si se hubiera helado de su parte terminal).

Las plantas infectadas muestran una decoloración café en la base del tallo con una descomposición del parénquima y haces vasculares sueltos, las mazorcas infectadas desarrollan una característica pudrición de unos cuantos granos aislados o áreas relativamente grandes. Los granos afectados presentan un rayado, debido a la presencia del micelio bajo el pericarpio (De León, 2008).

Toxinas producidas por especies de *Fusarium*

Gelderblom *et al.* (1988), reportaron a las fumonisinas como una nueva clase de toxinas que fueron identificadas de cultivos de *F. verticillioides* y estas toxinas tienen una actividad cancerígena.

Tres grupos de toxinas zearalenonas, tricotecenos y fumonisinas son producidas por varias especies de *Fusarium*, principalmente en maíz (Agrios, 2005).

Zearalenonas parecen ser las más tóxicas para cerdos, en el cual causan anomalías y degeneración del sistema reproductivo, llamado síndrome estrogénico. La hembra se alimenta de comida que contiene Zearalenonas y desarrolla vulva atrofiada con hemorragias, así como ovarios no funcionales, son susceptibles al aborto y los cerdos que nacen son pequeños y débiles. El macho muestra signos de feminización, nombrada atrofia de los testículos y un alargamiento de las glándulas mamarias.

Los tricotecenos, de donde más de 100, son producidos por especies de *Fusarium* y por varios de otros hongos. Son más tóxicas cuando se las comen los cerdos, en los cuales causa inactividad, nudos en intestinos, diarrea, hemorragia, y muerte. Otros animales como vacas, pollos también son afectados.

Fumonisinas son producidas por *F. verticillioides*, las cuales causan pudrición de la mazorca de maíz que afecta tanto como el 90% de los campos de maíz. Las fumonisinas son la causa de mal de parálisis (leucoencefalomalacia equina) en caballos, burros y mulas, edema pulmonar en cerdos y posiblemente cáncer en humanos.

F. verticillioides es conocido por ser una de las especies altamente toxígenas por la producción de fumonisina B1 (FB1), una toxina asociada con el cáncer esofágico, FB2, y moniliformina (MON), una toxina asociada con daño al miocardio (Marasas *et al.*, 2001).

Rheeder *et al.* (2002), confirman que *F. proliferatum* y *F. verticillioides* son los más prolíficos productores de fumonisina B1, B2 y B3 junto con *F. nygamai* que produce bajas pero significativa cantidad de estas tres toxinas.

Descripción del genero *Trichoderma*

El hongo *Trichoderma* se caracteriza por la producción de conidióforos hialinos, muy ramificados, no verticilados; fíalides individuales o en grupos; conidios (phialosporas) hialinas, unicelulares, ovoides, en racimos terminales pequeñas, generalmente fáciles de reconocer por su rápido crecimiento y manchas verdes o cojines de los conidios; saprófitos del suelo o de madera, muy común, algunas especies reportadas como parásitos de otros hongos (Barnett y Hunter, 1998).

Los conidióforos son hialinos, septados, erguidos o laxos, solitarios o frecuentemente ramificados en ángulos más o menos rectos con respecto al eje principal. Las células fiálides esporíferas, producidas individualmente, en pares u en grupos, son hialinas, ovaladas o en forma de frasco; miden 5-15 x 3-4 μm . las fiálides surgen alternadamente o en pares y con frecuencia se producen en ángulo recto con respecto al conidióforo o la ramificación progenitora. los conidios son hialinos o verdes, lisos o rugosos o en forma de huevo, con un diámetro de 3-4 μm , no septados, reunidos en pequeñas bolas esféricas verdes constituidas por 10 a 20 conidios, cada una sobre fiálides (Wharham *et al.*,1996) .

Clasificación taxonómica de *Trichoderma* (Agrios, 2005)

Reino: Fungí

División: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Hypocreales

Género: *Trichoderma*

Especie: *longibrachiatum* Rifai,

asperellum Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg

Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Entender los mecanismos de acción por los cuales los agentes de biocontrol actúan es crítico para mejorar su efectividad, no son mutuamente excluyentes, mientras uno parece ser el principal, a veces actúan en conjunto y se tienen metodologías para estudiarlos y monitorear a los agentes antagonistas (Jensen y Wolffhechel, 1995).

Trichoderma produce numerosos antibióticos y enzimas: (β -1,3- glucanasa, quitinasas, pectinasas, xilasas, glucosidasas, proteasas y celulasas) degradadores de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo, además de manifestar propiedades parasitarias contra diversos hongos, produciendo alteraciones en las hifas del parásito. Inicialmente realiza un reconocimiento y adherencia sobre la pared del patógeno, posteriormente promueve la hidrólisis de las hifas y esclerocios del patógeno por medio de las enzimas producidas (Benítez *et al.*, 2004).

Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competencia directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de determinadas especies como lo es *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia *et al.*, 1999).

Las habilidades antagónicas son descritas como una combinación de varios mecanismos, incluyendo competencia por nutrientes y micoparasitismo directo, el cual incluye la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas que degradan la pared celular (Howell 1998).

Las especies de *Trichoderma* son biocontroladores de patógenos fúngicos del suelo, el micoparasitismo es el principal mecanismo de acción de *Trichoderma* sp. Este agente antagonista envuelve el hongo patógeno y penetra sus células causándole un daño extensivo a nivel celular (pared, membrana y desorden citoplasmático), principalmente en los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Harman *et al.*, 1981 citado por Agamez, 2009).

Los modos de acción más comúnmente reportados para *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio, antibiosis por medio de enzimas o la producción de metabolitos secundarios, e inducción de los sistemas de defensa en la planta (Howell, 2003).

Su actividad comúnmente se ha relacionado con la producción de enzimas quitinolíticas (Viterbo *et al.*, 2002), β 1,3-glucanasa y β 1,6-glucanasa (Bara *et al.*, 2003; Marcello *et al.*, 2010) celulasas y proteasas (Sanz *et al.*, 2004). También puede inducir resistencia sistémica contra patógenos foliares (Yedidia *et al.*, 2003).

Se han encontrado un amplio rango de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas con posibles mecanismos de control biológico han sido descubiertas como el genoma de *Trichoderma* y proteoma analizado (Harman, 2006), además una inducción de sistemas de defensa en la planta (Harman, 2006;Howell, 2003).

Shoresh *et al.* (2005), reportan en su trabajo que *T. asperellum* además de producir enzimas como β 1,3-glucanasa y quitinasas también induce sistemas de defensa en la planta.

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa (Ezziyyani *et al.*, 2004).

La antibiosis en *Trichoderma* spp., puede efectuarse por la producción de enzimas hidrolíticas y por metabolitos secundarios volátiles o no (Jensen y Wolffhechel, 1995).

Se ha reportado que *T. virens* tiene actividad antagónica mediante la producción de “Glitoxina” y “Viridina” cuya síntesis se realiza en un periodo muy corto de 16 horas durante su crecimiento, coagula el protoplasma de *Pythium ultimum* y en presencia de este compuesto no crece; además, de este metabolito produce pacibasina, trichodermina y otros antibióticos y enzimas que han demostrado que participan en la reducción del inoculo de los Fitopatógenos (Howel *et al.*, 1993).

Entre los metabolitos que produce *Trichoderma* spp. el 6PAP (6-pentil- α -pirona) es de los más conocidos y estudiado debido a su potente actividad antifúngica. La habilidad de las cepas de *Trichoderma* para producirlo es muy variada entre las diferentes especies, aun entre cepas de la misma especie; además, una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos a diferentes estados de desarrollo según las condiciones de cultivo (Cooney y Lauren, 1999).

Las especies *T. harzianum*, *T. kinongii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y *T. hamatum* se reportan como micoparasitos de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *P. aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* y *P. nicotianae*, *Rosellinia necatrix*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. roseum*, *B. cinerea*, *Macrophomina phaseolina* y *Verticillium dahliae* entre otros, penetrándolos y causando lisis de micelio (Stefanova y Sandoval, 1995.)

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del experimento

El presente trabajo fue llevado a cabo en las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila; situada a 7 Km al sur de la ciudad de Saltillo, con una localización geográfica de coordenadas de 101°00' Longitud Oeste y 25°22' Latitud norte con una altitud de 1,742 msnm.

Materiales genéticos

Para esta investigación se utilizaron semillas de maíz criollo, mejorado y teocintle, los criollos y el teocintle fueron proporcionados por el Instituto Mexicano del Maíz, las variedades mejoradas fueron adquiridas en diferentes casas comerciales.

Cepas de antagonistas

El hongo *Trichoderma asperellum* cepa T22 fue proporcionado por el Ing. Daniel Díaz González al cual le corrieron pruebas de PCR para la identificación de la especie, la cepa de *T. longibrachiatum* fue proporcionada por la MC. Angélica Berlanga Padilla de igual manera fue identificada con técnicas moleculares.

Cuadro No. 1 Equipos, aparatos, instrumentos, materiales y sustancias utilizadas en la investigación

Equipos y aparatos	Instrumentos
1. Parrilla eléctrica	1. Pinzas de disección
2. Olla de presión	2. Bisturí de disección
3. Balanza analítica	3. Aguja de disección
4. Campana de flujo laminar	4. Mechero de bunsen
5. Cámara SONY Cyber-shot	5. Mechero de alcohol
6. Microscopio compuesto	6. Saca bocados (0.8 , 0.5 mm)
7. Microscopio de disección	7. Regla (30 cm)
8. Incubadora	8. Electromagneto
Materiales	Sustancias
1. Probeta graduada de 1000 mL	1. Hipoclorito de sodio 3%
2. Matraz Erlen meyer	2. Alcohol etílico 96°
3. Vasos de precipitados	3. Agua destilada
4. Cubre objetos	4. Malachite Green Agar (MGA)
5. Porta objetos	5. Papa Dextrosa Agar (PDA)
6. Cajas petri	6. Lactofenol
7. Cinta parafilm	7. Dextrosa

Medios de cultivo usados en el experimento

Para este trabajo se utilizaron tres medios de cultivo:

MGA (Malachite Green Agar) medio selectivo para *F. verticillioides* para aislar el hongo directamente de la semilla, PDA (Papa Dextrosa Agar) para la multiplicación del patógeno, y medio de líquido Papa Dextrosa (PD) para la producción de metabolitos del hongo *Trichoderma* spp..

Forma para preparar un litro de medio de cultivo (PDA, MGA)

En un matraz Erlen Meyer adicionar los componentes en un litro de agua destilada, la cual se pone en una parrilla eléctrica con agitador electromagnético hasta obtener una solución verdadera; posteriormente se esteriliza en autoclave a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada por espacio de 20 min a una temperatura de 120 °C, una vez transcurrido el tiempo indicado se espera a que baje la presión hasta cero para poder retirar la tapa.

Se espera a que la solución se enfrié unos minutos pero que no solidifique; para el llenado de las cajas petri es necesario contar con un medio completamente estéril para evitar contaminación con agentes no deseados, para cumplir con todo esto se utiliza la campana de flujo laminar y bajo flama de un mechero de alcohol se vierte la solución en placas de petri.

Forma para preparar medio líquido Papa Dextrosa (PD).

Se pesan 200g de papa (*Solanum tuberosum*) y se hierven en un litro de agua destilada, se filtra con la ayuda de un lienzo muy limpio, al filtrado se agregan 20g de dextrosa y se esteriliza en una olla de presión.

Aislamiento del patógeno

Este trabajo consistió en seleccionar 100 semillas de maíz de cada material. Posteriormente se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3 % por 2 min; concluido el tiempo indicado se enjuagaron en agua destilada estéril por 1 min y se colocaron en papel de filtro para su secado quedando así listas para la siembra. Las semillas de los materiales mejorados, antes fueron lavadas con agua corriente de la llave más dos gotas de Tween 20 para desprenderlas del tratamiento químico.

Los materiales que se necesitan para la siembra deben estar previamente esterilizados para cumplir con todo esto se enciende la campana de flujo laminar por 30 min antes de usarse y se debe desinfectar con alcohol etílico al 96% para descontaminar el microambiente.

Posteriormente se efectuó la siembra que consistió en colocar las semillas de maíz a una distancia equidistante, con la ayuda de unas pinzas de disección en cajas de petri con medio de cultivo MGA y bajo la flama de un mechero, una vez efectuada la siembra las cajas se sellaron con cinta parafilm y se incubaron a una temperatura de 28° C por espacio de dos semanas.

Identificación del hongo

En este trabajo fue necesario, auxiliarse de dos microscopios, uno compuesto para observar las estructuras fungosas y el otro de disección (estereoscopio) para observar las colonias del hongo y de un manual de laboratorio para identificación de hongos.

El procedimiento de identificación es sencillo, basta con obtener una pequeña porción del hongo con la ayuda de una aguja de disección y colocarla en un portaobjetos con lactofenol, posteriormente se colocó un cubre objeto sobre la muestra y se observó en el microscopio compuesto para definir con mayor exactitud que es el organismo deseado para este trabajo.

F. verticillioides fue identificado con las siguientes características: microconidios abundantes, generalmente hialinos unicelulares, pero en ocasiones bicelulares, tienen forma oval o de garrote y están generalmente aplanados en cada extremo. Los macroconidios se presentan en forma infrecuente, son hialinos, delicados, con paredes delgadas y su forma varía de curvos a casi rectos; tienen de 3-7 septos y la célula basal tiene forma de pie. Nunca hay clamidosporas en el micelio (Wharham *et al.*, 1996).

Purificación

Una vez observado crecimiento suficiente de micelio y haber identificado el patógeno se transfirió a cajas petri con medio de cultivo (PDA) e incubándose a una temperatura de 28°C logrando así un cultivo puro, el método de purificación usado fue por punta de hifa.

Ensayo No. 1:

Incidencia del hongo *F. verticillioides*

Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue un diseño completamente al azar (DCA) para la distribución del experimento.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (ocho tratamientos y diez repeticiones por tratamiento), con un total de 80 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió en diez semillas de maíz. La variable a evaluar fue incidencia de *F. verticillioides*, las medias fueron comparadas con la prueba DMS con un 5 % de probabilidad de error. Se utilizó el programa estadístico de la Universidad de Nuevo León (UANL) versión 2.5.

Ensayo No.2:

Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *F. verticillioides* en cultivo dual.

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Trichoderma*, se evaluó el antagonismo en cultivo dual en medio de cultivo PDA, estableciendo cuatro repeticiones por tratamiento y un testigo absoluto para el patógeno y otro para el antagonista, se colocó en el extremo de la caja petri un disco de PDA con micelio de *F. verticillioides* de 8 mm de diámetro y en el extremo opuesto un disco de *Trichoderma* spp. a una distancia aproximada de 6 centímetros uno de otro, las siembras fueron incubadas a 28°C por espacio de cinco días. La evaluación se hizo tomando el diámetro de las colonias a los 5 días de incubación y mediante observaciones de la formación de una zona de demarcación entre los inóculos, para una correcta medición de las colonias la caja petri se dividió en cuadrantes.

Se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula $PICR = R1 - R2 / R1 \times 100$, usada por Ezziyyani *et al.*, (2004).

Dónde:

R1 es el radio mayor (radio del patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

Análisis estadístico

Las medias de PICR (Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial) fueron procesadas por un análisis de varianza y una comparación de medias de DMS con un 5% de probabilidad de error con el programa de la Universidad de Nuevo León (UANL) versión 2.5.

Se compararon las cepas con respecto a la capacidad antagonista, de acuerdo a la escala establecida por Bell *et al.* (1982), cuadro No 2.

Cuadro No. 2. Escala de Bell *et al.* (1982).

Clase	Características
Clase 1	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> , que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno.
Clase 2	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> , que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3). Uno se sobrepuso al otro.
Clase 4	Hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión por <i>Trichoderma</i> .
Clase 5	Sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio.

Ensayo No. 3:

Evaluación *in vitro* del efecto antibiótico de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *F. verticillioides* mediante incorporación de filtrado de *Trichoderma* spp. al medio.

El filtrado se preparó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 200 mL de (PD) que consistió en el cultivo de los aislados en medio líquido de Papa Dextrosa (PD) esterilizados a 120°C durante 20 minutos, un disco de 8 mm de diámetro se cortó del margen de la colonia miceliana de *Trichoderma* spp. crecida en medio PDA y se transfirió asepticamente a los matraces, se incubó durante siete días con agitación constante a 100 rpm en un agitador orbital, sin presencia de luz y a temperatura ambiente, los matraces se cubrieron con papel aluminio para evitar el paso de luz. Para obtener un filtrado puro el micelio se separó del líquido con la ayuda de un papel filtro Whatman No. 2 para evitar el paso de los sobrenadantes, el líquido se colectó en un matraz de 250 mL y se esterilizó con un filtro millipore de 0.22 μm utilizando una jeringa de 20 mL conectada a un porta filtro y colocado a la boca del matraz. El líquido se vertió en la jeringa con la ayuda de una probeta de 10 mL y empujando el embolo a presión, se hizo pasar la solución en la membrana millipore.

Con el fin de evaluar la pureza del filtrado, se tomó una alícuota de 10 μL y se sembró en cajas de Petri con medio PDA para cada cepa y se incubó a 28°C por tres días, el no desarrollo de los hongos mostro la pureza del mismo.

Las cajas de petri fueron inoculadas con 500 y 1000 μL del filtrado de *Trichoderma* spp. con la ayuda de una micropipeta y se dejaron reposar por 15 min. para que el filtrado se adhiera al medio con papa dextrosa agar (PDA), posteriormente se sembró un disco de 5mm de diámetro en el centro de la caja y se dejó en incubación hasta que el testigo patógeno llenara la caja, se evaluó el desarrollo micelial cada 24h.

Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas de antibiosis usando un diseño completamente al azar con arreglo factorial **A** x **B** con cuatro repeticiones por tratamiento y dos dosis a ensayar; donde **A**: son las dosis a evaluar y **B**: el tiempo en días que tardó el testigo patógeno en llenar la caja. La comparación de medias fue procesado por el método DMS con un 5% de probabilidad de error con el programa de la Universidad de Nuevo León (UANL) versión 2.5.

Se utilizó el siguiente modelo (Padrón, 2003):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Dónde: $i = 1, 2, \dots, a$, $j = 1, 2, \dots, b$, $k = 1, 2, \dots$, (repeticiones)

Y_{ijk} = Crecimiento micelial en cm^2 de *Fusarium verticillioides* en la ij -ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general del experimento.

α_i = Efecto verdadero de la i -ésima dosis de filtrado (A).

β_j = Efecto verdadero de la j -ésima tiempo (días) (B).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción (AB) de la i -ésima dosis de filtrado con la j -ésima tiempo (días).

ξ_{ijk} = Error experimental en la ijk -ésima unidad experimental

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la micoflora

Se detectó la presencia de *F. verticillioides* en los 8 materiales de maíz, se puede mencionar que las características concluyeron de acuerdo a las claves de Wharham *et al.* (1996), en el cual mencionan que los microconidios son abundantes, generalmente hialinos unicelulares, pero en ocasiones bicelulares, tienen forma oval o de garrote y están generalmente aplanados en cada extremo. Los macroconidios se presentan en forma infrecuente, son hialinos, delicados, con paredes delgadas y su forma varía de curvos a casi rectos; tienen de 3-7 septos y la célula basal tiene forma de pie. Nunca hay clamidosporas en el micelio, por lo tanto las características mencionadas son similares a las observadas en este trabajo.

De igual manera se identificaron dos especies de *Aspergillus*, además se encontró la presencia del género *Penicillium*, las características concluyeron con las propuestas por Wharham *et al.*, (1996) y con las indicadas por Barnett y Hunter (1998).



Figura No 1. Estructuras morfológicas de *F. verticillioides* A: Macroconidios, B: Conidióforo, C: microconidios (Fotos: E. Castro). Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.

Contaminación fúngica de los granos de maíz

Después de dos semanas de incubación a 28 °C, se evaluó el crecimiento fúngico en los granos de los 8 materiales de maíz en el medio MGA estudiando los granos donde habían crecido hongos. El porcentaje de granos contaminados se calculó teniendo en cuenta el total de los granos sembrados por tratamiento (100 granos/material).

De igual manera se identificaron y cuantificaron hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, presentes en los materiales de prueba con los siguientes porcentajes: *Fusarium verticillioides* (72.75%), *Penicillium* sp. (1.25%), *Aspergillus niger*(1.62%), *Aspergillus flavus* (3.125%) y 21.25% de granos que no se infectaron.

Gallardo *et al.*, (2006), encontraron la presencia de los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium* en una proporción de 67% para *Fusarium* en el Valle de Mayo, el género *Aspergillus* se encontró en mayor proporción en las zonas de Hermosillo con un 38% de incidencia, Valle del Yaqui 23%; mientras que en las muestras del Rio Sonora y Valle del Mayo fue de 22 y 16% respectivamente. Las especies de mayor incidencia fueron *Aspergillus flavus* y *A. niger*. El género *Penicillium* se aisló en mayor proporción en muestras del Valle del Mayo, representando el 5% de la invasión total.

Cisneros *et al.* (2007), encontró la presencia de los siguientes géneros fúngicos *Fusarium* (23%), *Alternaria* (19%), *Aspergillus* (3%) y *Penicillium* (3%), considerados como patogénicos en semillas de sorgo, como podemos observar sus resultados son casi similares a los encontrados en este trabajo solo que con diferente cultivo.

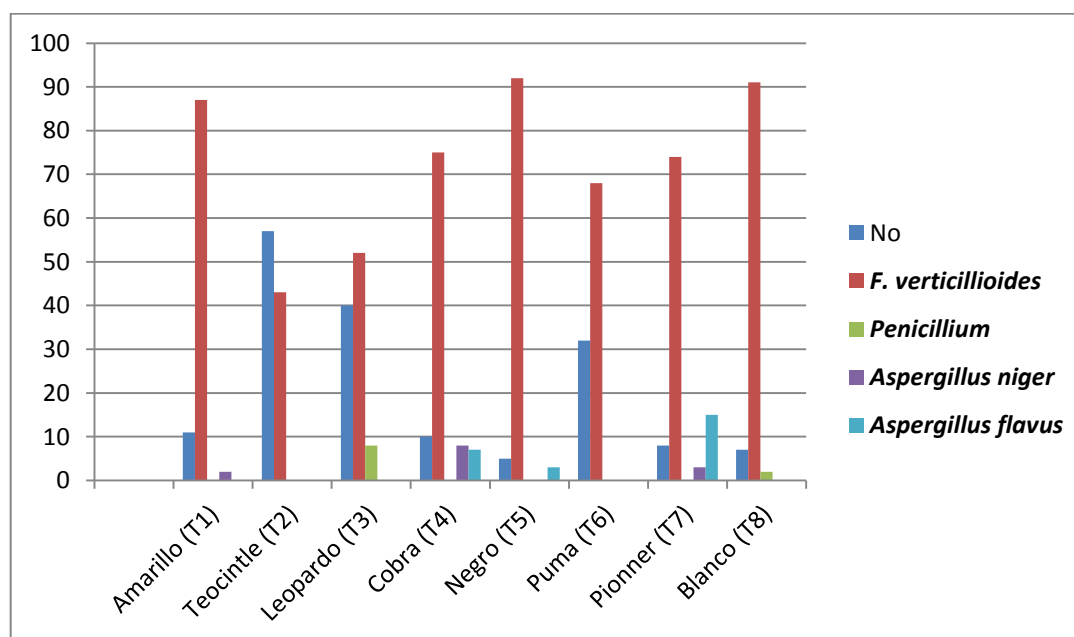
Hernández *et al.* (2007), encontraron la presencia de hongos asociados a la semilla en almacén, en maíz amarillo encontraron 50.3% de incidencia de *Aspergillus*, 5.5 % de *Fusarium* y 15.9 % de *Penicillium*, mientras que en maíz blanco, la incidencia fue de 44.6, 6.0 y 10.4 % respectivamente. En campo los maíces amarillos mostraron mayor incidencia de *Aspergillus* (3.1%), *Fusarium* (76.9%) y *Penicillium* (11.6%) que los maíces blancos (2.4, 6.3 y 7.9%, respectivamente).

Cuadro No. 3. Incidencia de hongos asociados a semillas de maíz. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011

T	% de granos no infectados		% de hongos desarrollados en MGA		
	No infectados	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
(T1)	11	87	0	2	0
(T2)	57	43	0	0	0
(T3)	40	52	8	0	0
(T4)	10	75	0	8	7
(T5)	5	92	0	0	3
(T6)	32	68	0	0	0
(T7)	8	74	0	3	15
(T8)	7	91	2	0	0

Amarillo (T1), Teocintle (T2), Leopardo (T3), Cobra (T4), Negro (T5), Puma (T6), Pionner (T7), Blanco (T8).

Figura No. 2. Incidencia de hongos asociados a semillas de maíz. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011



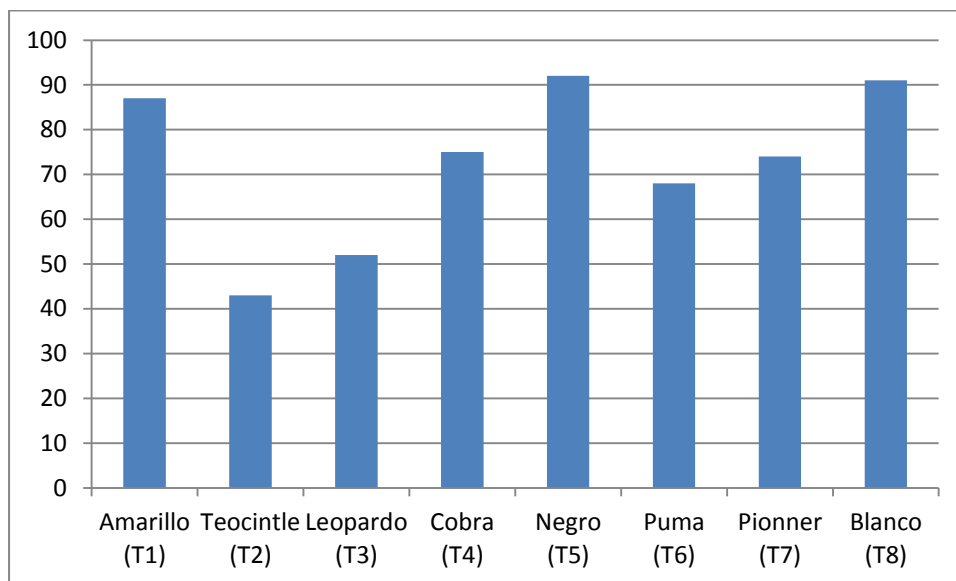
Ensayo No. 1: Incidencia de *F. verticillioides*

De acuerdo al análisis estadístico podemos darnos cuenta que el porcentaje de incidencia del hongo *F. verticillioides* se encontró en niveles altos de 92.0 % en el material criollo negro, seguido por un 91.0 % de incidencia en criollo blanco y un nivel relativamente bajo de 43.0 % en el teocintle y un porcentaje total de 72.75 %.

Bucio *et al.* (2003), encontraron alta incidencia de *Fusarium* y otros hongos, los cuales fueron en una proporción de 30.7 y 39.5%, respectivamente, y solo en un lote del municipio de Irapuato se encontró a *Aspergillus flavus*.

Kedera *et al.* (1998), reportaron la distribución de *F. verticillioides* en Kenya y una incidencia de 71 a 72 % en tres muestras de maíz. Estos datos son casi iguales a los encontrados en esta investigación.

Figura No. 3. Incidencia del hongo *F. verticillioides*. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.



Ensayo No. 2:

Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *F. verticillioides* en cultivo dual.

Los resultados de la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. por el método de cultivo dual resultaron ser favorables para el control del patógeno. Las dos especies inhibieron el crecimiento de *F. verticillioides* y lograron detener el crecimiento al hacer contacto, en la proporción de 42.64% (24.19cm²) hasta 57.23% (32.47cm²), comparado con el crecimiento del testigo el cual fue de 10.46% (5.93 cm²). *T. longibrachiatum* fue el que presentó actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *F. verticillioides* a las 120 h, por lo que recibe calificación de 1, en la escala de clasificación de Bell *et al.* (1982). Una vez alcanzada la zona de demarcación entre los inóculos, *T. asperellum* continuo su crecimiento hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno, sobre el que produjo esporas hasta las 240 h. reveló buenas potencialidades contra el patógeno ensayado, y recibió calificación de 2 en la misma escala. No se observó enrollamiento y estrangulación de las hifas, solo se logró ver lisis y colapso de micelio.

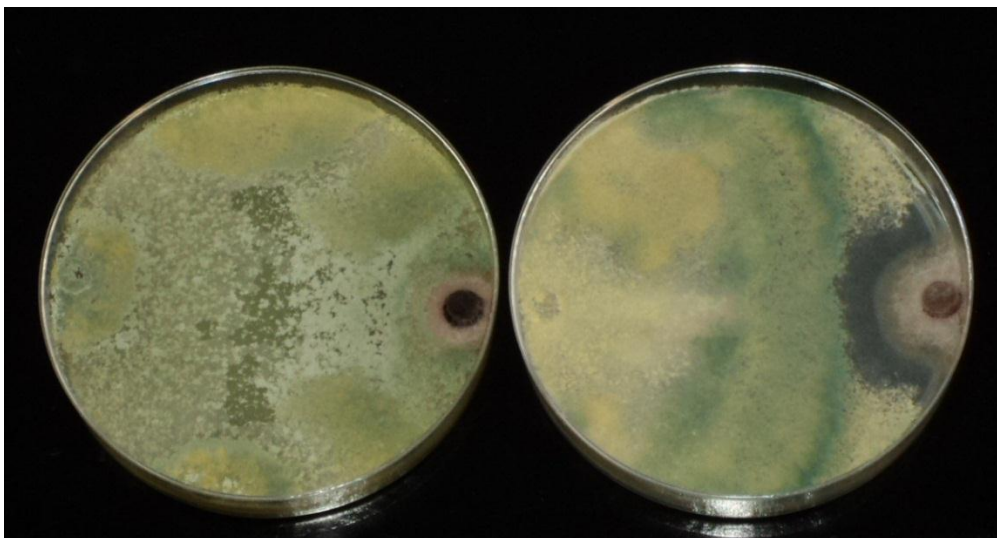


Figura No 4. Escalas de clasificación: Clase 1: *Trichoderma longibrachiatum* (izquierda), Clase 2: *Trichoderma asperellum* (derecha) (Fotos: E. Castro). Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.

Michel (2001), encontró un 40.1% de inhibición en el hongo *F. oxysporum* y 35.9% en *F. subglutinans* por cepas de *T. longibrachiatum* en cultivos apareados evaluados a los seis días después de la siembra (dds), lo cual para *F. verticillioides* el tiempo en que se mostró antagonismo fue a los cinco días después de la siembra.

Guigón *et al.* (2010), reportan en su investigación que el crecimiento de los fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *R. solani*, *Fusarium* spp. se redujo, en todos sus ensayos, durante su confrontación contra las cepas de *Trichoderma* spp. Las cepas de *T. asperellum* mostraron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *R. solani* y *B. cinerea* que *T. longibrachiatum*, pero no lograron reducir el crecimiento de *Fusarium* spp. El grado de inhibición ejercido sobre el crecimiento de los diferentes hongos Fitopatógenos varió de 44% a 64%, lo cual podemos constatar en esta investigación que las especies de *Trichoderma* mostraron ser superiores al patógeno lo que no sucedió para *Fusarium* spp. en la investigación que reportan dichos autores.

Hoyos *et al.* (2008), en una evaluación *in vitro* de 8 aislados de *Trichoderma* encontraron que *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* poseen una actividad antagónica y parasítica del 100% en los hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* de acuerdo a la clasificación de (Bell *et al.*, 1982), a la fecha no se reportan investigaciones contra *F. verticillioides* con las especies utilizadas en esta investigación.

Esparza (2009), reporta que de acuerdo a la clasificación de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982), ubicó a *T. asperellum* en la clase 1 con un 94.20% de inhibición según la media y a *T. longibrachiatum* en la clase 2 con un 89.01% contra el hongo *Phytophthora parasítica*. También logró observar como principal mecanismo de acción la competencia por espacio y nutrientes y el micoparasitismo, también dichos hongos indujeron lisis de micelio y la presencia de antibiosis, lo cual en esta investigación solo se logró ver lisis y colapso de micelio, pero no se pudo presenciar antibiosis en cultivos duales.

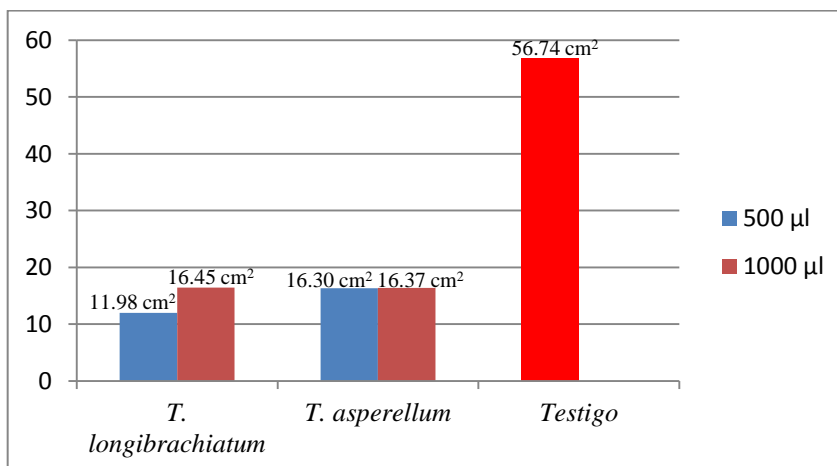
Ensayo No. 3:

Evaluación *in vitro* del efecto antibiótico de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *F. verticillioides* mediante incorporación de filtrado de *Trichoderma* spp. al medio.

Para esta investigación no se puede hablar solo de un metabolito en específico, porque en ningún momento se hizo la separación de cada uno, ni la identificación de ellos, por lo tanto solo se discute en conjunto, relacionando todas las enzimas que puedan estar involucradas y de todos los metabolitos posibles que se lograron producir en medio líquido de papa dextrosa a los siete días de incubación, de alguna manera solo se tratara de explicar el efecto que tiene *Trichoderma* spp. mediante antibiosis solo para relacionarlo como un mecanismo más de acción concerniente al micoparasitismo.

De acuerdo a la comparación de medias se encontró que el filtrado de *T. longibrachiatum*, a una dosis de 500µL (dosis 1) inhibió el desarrollo del patógeno en un 20.44% permitiéndole crecer solo 11.98cm² y a 1000µL (dosis 2) creció 16.45cm² con un 13.7% de inhibición, podemos darnos cuenta que hay presencia de metabolitos porque con respecto al crecimiento del testigo que fue de 56.74cm² las áreas de crecimiento tratadas son menores, aunque a 1000µL no haya inhibido más que la dosis de 500µL tal como se muestra en la figura No. 5.

Figura No.5. Efecto de las dos dosis del filtrado de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de *F. verticillioides* mediante antibiosis concerniente a la comparación de medias. Departamento de Parasitología, UAAAN, 2011.



Para el hongo *T. asperellum* se encontraron resultados diferentes, no mostro ninguna diferencia entre las dosis, ya que solo se logró observar que en 500 μ L, *F. verticillioides* creció 16.30 cm² inhibiendo 28.86%, mientras que a 1000 μ L creció 16.37cm² (28.72% de inhibición) con respecto al testigo que logro crecer 56.74cm² como podemos darnos cuenta los valores del área de crecimiento son casi iguales, pero aun así se demuestra una vez más que el hongo *Trichoderma* spp. además de poder competir por espacio y nutrientes, por efecto del parasitismo, a su vez también produce metabolitos los cuales pueden inhibir el crecimiento del patógeno.

El proceso de antibiosis está relacionado en el parasitismo de *Trichoderma* spp. lo cual en este trabajo fue posible presenciarlo y relacionarlo como una forma más de control, aunque hay una desventaja; que como es un antibiótico los hongos más adelante podrían adquirir resistencia tal como sucedió con *Agrobacterium tumefaciens* al producto Agrosín 84 antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* (Campbell, 1989 citado por Infante *et al.*,2009).

Michel *et al.* (2004), encontraron antibiosis de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans* por la producción de 6PAP (6-pentil- α -pirona), las cepas T1-14 y T116 inhibieron 47.6 y 32.2% respectivamente sobre el hongo *F. oxysporum* y para *F. subglutinans* encontraron que la cepa T116 inhibió 42.6% en cambio la cepa T1-14 solo logró inhibir 32.0%.

Ramos (2008), encontró 31.65, 56. 25, 18.13% de inhibición por *Trichoderma* spp. sobre tres cepas de *Fusarium oxysporum* evaluado a los 12 días después de la siembra, días muy diferentes a los de esta investigación ya que el patógeno logro crecer a lo máximo hasta el día siete.

Sánchez *et al.* (2007), encontraron que nueve cepas de *T. longibrachiatum* produjeron extracelularmente (en medios líquidos) proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas, las cuales estarían directamente involucradas en el proceso micoparasítico de *T. longibrachiatum* sobre *Thielaviopsis paradoxa*. No lograron observar enrollamiento, ni penetración de hifas del patógeno, al igual que esta investigación. De igual modo también lograron observar colapso de micelio.

CONCLUSIONES

El hongo *F. verticilloides* se encontró en todos los materiales de maíz y la incidencia fue alta para el T5 (Negro) y baja para T2 (Teocintle).

Trichoderma spp. son una forma de control de *F. verticilloides* y poseen una capacidad antagónica aceptable.

Especies de *Trichoderma* pueden producir metabolitos en medio líquido y estas son capaces de inhibir el desarrollo de muchos fitopatógenos, además que el filtrado de *Trichoderma* spp. inhibe el crecimiento de *F. verticilloides*.

BILIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. San Diego, California. 922 pp.
- Agamez, R. E., Barrera, V. J., Oviedo, Z. L. 2009. Evaluation of Antagonism and Multiplication The *Trichoderma* sp. In The Middle Static Liquid Banana Substrate. Acta biologica Colombiana. Vol.14, No.3. Bogotá Colombia.
- Álvarez, N. G. 1984. Fases y etapas fenológicas del cacahuete *Arachis hipogea* L. cultivado bajo riego en la región de Delicias, Chih. Tesis Profesional UAAAN.
- Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. 1979. "Introductory of Mycology". Third Edition. John Wiley, New York, EE. UU. 632pp.
- Bara, M. T. F., Lima, A. L., and Ulhoa, C. J. 2003. Purification and characterization of an exo- α -1, 3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters Vol. 219. 81-85 pp.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera Imperfect Fungy. Fourth Edition. Editorial Prentice Hall Inc. 88 -127; 241 pp.
- Bell, D. K., Well, H. D., and Markham, C. R. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. Vol.72. 379-382 pp.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. Department of Genetics, University of Sevilla, Spain. Vol. 7. 249-260pp.
- Boot, C. 1971. The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.

- Bottalico A.; A. Visadonti, A. Logrieco M. Solfrizzo and C. J. Mirocha. 1985. Occurrence of zearalenonas (diastereomeric mixture) in corn stalk root and their production by associated *Fusarium* sp. Applied environmental microbiology. Vol. 43, No.3. 547-551 pp.
- Bucio, V. C. M., Martínez J. O. A., y Morales G. R. H. 2003. Contaminación con hongos en maíz recién cosechado en el estado de Guanajuato durante el año 2003. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos Guanajuato, Gto. México.
- Calvert, O. H., Foudin, A.S., Minor H.C. and Krause, G. P. 1983. Environmental interaction of internal incidence of fungi in corn. Phytopathology. Vol. 63, No. 11. 990 pp.
- (CIMMYT) Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 1978. Enfermedades del maíz. Segunda Edición. El Batán. México.
- (CIMMYT) Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 1994. World maize facts and trends. México, DF.
- Cisneros, L. Ma. E., Mendoza, O. L. E., Mora, A. G. 2007. Cold tolerant sorghum hybrids and parental lines. III: Quality of seeds harvested from plants infected with *Fusarium verticillioides* (sacc.) Nirenberg. Agrociencia. Vol. 41. 405-415 pp. México.
- Cooney, J. M. y Lauren, D. R. 1999. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. Journal of Natural Products. Vol. 62. 681-683 pp.
- Cotten, T. K. and Munkvold, G. P. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. Phytopathology. Vol. 88, No. 6. 550-555 pp.
- Chulze, S. N., Ramirez, M. L., Torres, A., and Leslie, J. F. 2000. Genetic variation in *Fusarium* section liseola from no-till maize in Argentina. Appl. Environmental Microbiology. Vol. 66, No. 6. 5312-5315 pp.

- Damarys M., C. Medina y Z. Zenteno. 1976. Morfología de mazorcas de maíz. México. II boletín de la Sociedad de Microbiología. Vol. 10. 71-72 pp.
- Esparza, L. L. L. 2009. Efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en aislados de *Phytophthora parasítica* D. obtenidos en plantas de Jamaica. Tesis UACH. Texcoco, Estado de México.
- Ezziyani, M., Pérez, S. C., Ahmed, S. A., Requena M. E. & Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología. Vol. 26. 35-45 pp.
- FAO. Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Maíz. [Documento en línea]. Disponible en: <http://apps.fao.org/faostat>. [Consulta: noviembre 2009].
- Foley D., C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. Vol. 52. 870- 872 pp.
- Fuentes D., V.O. 1960. Elementos de fitopatología. Ediciones. Universidad de Coahuila.
- Gallardo, R. E. D., Ibarra, M. G. M., Sánchez, M. R. I., Cuamea, C. G., Molina, G. D., Parra, V. N. V., Rosas, B. E. C., Cortez, R. M. O. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 24, No. 01. México.
- García, A. M. 1979. Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana. Ed. Limusa. México. 938 p.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggar, R., and Kriek, N. P. J. 1988. Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environmental Microbiology. Vol. 54, No. 7. 1806-1811 pp.

- Guigón, L. C., Guerrero, P.V., Vargas, A. F., Carvajal, M. E., Ávila, Q. G.D., Bravo, L. L., Ruocco, M. L., S., Woo, S. y Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 28. 87-96 pp.
- Gilbertson R.L. and Manning W. J. 1976. Ecology of *Fusarium moniliforme* and other *Fusarium* in cultivated field soil in Colorado. Phytopathology. Vol. 73. 812 pp.
- Gilbertson R. L., Damicone J. P., and Manning, W. J. 1981. *Fusarium* crown rot of asparagus: sources of inoculums. Phytopathology. Vol. 71. 218 pp.
- Gilbertson R. L., Brown W. M., Jr. Ruppel E. G., and Capitera J. L. 1986. Association of corn stalk rot *Fusarium* spp. and western corn rootworm beetles in Colorado. Phytopathology. Vol. 76, No. 12. 1309-1314 pp.
- González M., O. A. 1986. Evaluación de la resistencia de 10 líneas de maíz a pudrición de tallo causada por *Fusarium* spp. en Buenavista, Coah. Tesis Profesional UAAAN.
- Harman, G. E., Chet I, Baker R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. Phytopathology. Vol. 71. 569-572 pp.
- Harman, G. E. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. Vol. 96, No. 2.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de cultura económica. México, D.F. 552 pp.
- Hernández, D. S., Reyes, L. M. A., García, O. J. G., Mayek, P. N., Reyes M. C. A. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 25, No. 2. 127-133 pp.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D., Lumsden, R. D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. Biocontrol Science and Technology. Vol. 3. 435-441 pp.

- Howell, C. R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. Cambridge University Press. Cambridge. Vol. 2. 173-185 pp.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Diseases. Vol. 87, No. 1. 1-10 pp.
- Hoyos, C. L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. y Orduz, S. 2008. Evaluation of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* under *in vitro* and greenhouse conditions. Agronomía colombiana. Bogotá, Colombia. Vol.26, No.3. 451-458 pp.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. La Habana, Cuba. Vol. 24, No. 1. 18; 22 pp.
- Jensen, D. F., Wolffhechel, H. 1995. Biological control: Benefits and Risks (Series: Plant and microbial biotechnology research. in: M.T.H., Heikki y J.M. Lynch (Eds.) The use of fungi, particularly *trichoderma* spp. And *Gliocladium* spp., to control root rot and damping-off diseases. Cambridge. Cambridge University Press. 177-189pp.
- Kedera, C. J., Plattner, R. D. and Desjardins, A. E. 1998. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin b1 in maize in western Kenya. Applied and environmental microbiology. Vol. 65, No. 1.
- Koehler B. 1936. Entry of *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium* into growing corn ears. Phytopathology. Vol. 26. 98-99 pp.
- Kucharer T. A. and T. Kommendahl. 1966. Kernel infection and corn stalk rot caused by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. Vol. 56. 983. 984 pp.
- Leslie J. F., Pearson C. A. S., Nelson P. E. and Toussoun T. A. 1990. *Fusarium* spp. From corn, sorghum, and soybean fields in the Central and Eastern United States. Phytopathology. Vol. 80. 343 – 350 pp.

- Leslie J. F. and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA. Vol. 8. 388 pp.
- Lucado J. S. 1970. Pathogenesis of corn seedlings infected with *Fusarium moniliforme* Sheldon. M. S. Thesis. Mississippi State university State College. 26 pp.
- Marcello, C. M., Steindorff, A. S., Silva, S. P., Silva, R. N., Mendes, B. L. A., Ulhoa, C. J. 2010. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiological Research Vol. 165. 75-81 pp.
- Manns T. F. and Adams J. F. 1923. Parasitic fungi internal of seed corn. J. Agric. Res. Vol. 23. 495-523 pp.
- Manzo, S. K. and Claflin, L. E. 1984. Survival of *Fusarium moniliforme* hyphae and conidia in grain sorghum stalks. Plant disease. Vol. 68. 866-867 pp.
- Marasas W. F. O., Miller J. D., Riley R. T. and Visconti A. 2001. Fumonisin occurrence, toxicology, metabolism, and risk assessment. APS press, St. Paul, Minnesota USA. 332 - 359 pp.
- Michel, A. A. C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Eufungi:Hipocreales), su actividad antibiótica y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hiphales). Tesis Doctorado. Universidad de Colima, México.
- Michel, A. A. C., Otero, S. M. A., Rebolledo, D. O., Lezama, G. R. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6-pentil- α -pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 22, No. 1. 14-21pp.
- Muntañola, M. 1999. Guía de los hongos microscópicos. Ediciones Omega, S. A., Barcelona, España. 167 pp.
- Naik, D. M., Nawa, I. N., Raemaekers, R. H. 1982. Absence of an effect from internally seed-borne *Fusarium moniliforme* on plant emergence, plant growth and yield of maize. Seed Science and Technology. Vol. 10. 56; 347pp.

- Ooka, J. J. and Kammedahl, T. 1977. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn field. *Phytopathology*. Vol. 67. 1023-1026 pp.
- Olivares Sáenz, Emilio. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L.
- Pammel L. H., King C. M. and Seal J. L. 1916. Studies on *Fusarium* disease of corn and sorghum (preliminary). *Iowa Agric. Exp. Stn. Bull.* 33-21 pp.
- Padrón, C. E., 2003. Diseños experimentales aplicados a la agricultura y ganadería. Editorial Trillas. México, D.F. 215 pp.
- Ramos, H. M. M. 2008. Efecto antagónico *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. Tesis de licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 51 pp.
- Reyna D. G. 1990. Evaluación de la Resistencia del material germoplasmico de 10 líneas de maíz (*Zea mays* L.) para el hongo *Fusarium moniliforme* bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura, UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Romero S. C. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección del Patronato Universitario A.C. México. 347 pp.
- Rodríguez, M. R., De León C. 2008. El cultivo de maíz. Colegio de Posgraduados. Ed. Mundi prensa México S.A. de C.V. 57-59; 127 pp.
- Rheeder J. P., Marasas W. F. O. and Vismer H. F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68. 2101- 2105 pp.
- Sánchez, V., Rebolledo, O., Picaso, R. M., Cardenas, E., González, O., Córdova, J. y Samuels G. J. 2007. *in vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia*. Vol. 163. 49-58 pp.
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., R. Hermosa, E. Monte. 2004. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics*. Vol. 46. 277-286 pp.

- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Maíz. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx/siacon.
- Scott G. E. and Futrell M. C. 1970. Response of maize seedlings to *Fusarium moniliforme* and toxic material extracted from this fungus. *Plant diseases*. Vol. 54. 483-486 pp.
- Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet I. 2005. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*. Vol. 95, No. 1.
- Stefanova, N. M., Sandoval, R. I. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp., en el control de Fitopatógenos de suelo. *Boletín Técnico CIV INISAV*. No. 2. 10-22pp.
- Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. and Chet, I. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit 36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics* Vol. 42. 114–122 pp.
- Warham, E. J., Butler, L. D. y Sutton, B. C. 1996. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT, México, D. F. 6, 29, 39; 84pp.
- Yedidia, I., Benhamou N. and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65.1061-1070 pp.
- Yedidia, I., Shoresh, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69. 7343–7353 pp.

Apéndice

Cuadro No 4. Componentes del medio verde de malaquita agar (MGA): (Castellá *et al.*, 1997 citado por Leslie and Summerell, 2006).

Peptona	15 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Oxalato verde de malaquita	2.5 mg
Agar	20 g
H ₂ O	1 L
Gentamicina	1 mL/L

Cuadro No. 5. Análisis de varianza de incidencia para *F. verticillioides*

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	7	28578.750000	4082.678467	7.9211**	0.000
ERROR	72	37110.000000	515.416687		
TOTAL	79	65688.750000			

C.V. = 31.70 %

** = altamente significativo

Cuadro No. 6. Resultados de la comparación de medias de incidencia para *F. verticillioides*

Tratamiento	Media	Agrupación
5	92.0000	A
8	91.0000	A
1	87.0000	A B
4	75.0000	A B
7	74.0000	A B
6	68.0000	B C
3	52.0000	C D
2	43.0000	D

Nivel de significancia = 0.05 Valor de la DMS = 20.1849 %

Cuadro No. 7. Análisis de varianza para PICR(Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1	425.724609	425.724609	8.3884**	0.027
ERROR	6	304.509766	50.751629		
TOTAL	7	730.234375			

C.V. = 14.26 % ** = altamente significativo

Cuadro No. 8. Resultados de la comparación de medias para PICR

Tratamiento	Media	Agrupación
2	57.2368	A
1	42.6471	B

T1= *T. longibrachiatum*, T2= *T. asperellum*

Nivel de significancia = 0.05 Valor de la DMS = 12.3266

Cuadro No 9. Radios de crecimiento del patógeno (RCP) y radios de crecimiento de antagonistas (RCA), correspondientes a cultivos duales evaluados a las 120 h.

	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
Repetición	RCA (cm)	RCP (cm)	RCA (cm)	RCP (cm)
r1	3.65	0.85	3.2	1.2
r2	3.75	0.85	3.45	0.85
r3	3.75	0.8	3.4	0.85
r4	3.75	0.75	3.25	1.0
Testigo	4.25	1.9	4.25	1.7

Cuadro No. 10. Análisis de varianza para antibiosis, mediante la incorporación de filtrado de *T. longibrachiatum* contra *F. verticillioides*.

FV	GL	SC	CM	FC	P > FC
DOSIS	1	279.914063	279.914063	134.0356**	0.000
DÍAS DE EXPOSICIÓN	6	4669.232422	778.205383	372.6403**	0.000
INTERACCIÓN	6	463.265625	77.210938	36.9721**	0.000
ERROR	42	87.710938	2.088356		
TOTAL	55	5500.123047			

C.V. = 10.16% ** = altamente significativo

Cuadro No. 11. Comparación de medias para *F. verticillioides* mediante antibiosis por el efecto del filtrado de *T. longibrachiatum*.

Dosis	MEDIA cm ²	% de inhibición	Agrupación
500µL	11.983214	20.4425	A
1000µL	16.454645	13.7082	B

Nivel de significancia = 0.05 Valor de la DMS = 1.1737

Cuadro No.12. Tabla de medias respecto al crecimiento diario acumulado de *F. verticillioides* tratado con filtrado de *T. longibrachiatum* respecto a las dos dosis.

Dosis	Día	Media cm²
1	1	1.245000
1	2	4.337500
1	3	9.344999
1	4	14.190001
1	5	16.435001
1	6	18.010000
1	7	20.320000
2	1	1.127500
2	2	4.387500
2	3	9.150000
2	4	15.120001
2	5	20.537498
2	6	30.294998
2	7	34.564999

Dosis 1 = 500µL

Dosis 2 = 1000µL

Cuadro No.13. Análisis de varianza para antibiosis, mediante la incorporación de filtrado de *T. asperellum* contra *F. verticillioides*.

FV	GL	SC	CM	FC	P > FC
DOSIS	1	0.067383	0.067383	0.0165 *	0.894
DÍAS DE EXPOSICIÓN	6	9012.801758	1502.133667	368.5873 **	0.0001
INTERACCIÓN	6	21.157227	3.526204	0.8652 **	0.529
ERROR	42	171.166016	4.075381		
TOTAL	55	9205.192383			

C.V. = 12.35% ** = altamente significativo

Cuadro No.14. Comparación de medias para *F. verticillioides* mediante antibiosis por el efecto del filtrado de *T. asperellum*.

Dosis	MEDIA	% de inhibición	Agrupación
500µL	16.309643	28.865375	A
1000µL	16.378214	28.744417	B

Nivel de significancia= 0.05 DMS = 2.0400

Cuadro No.15. Tabla de medias respecto al crecimiento diario acumulado de *F. verticillioides* tratado con filtrado de *T. asperellum* respecto a las dos dosis.

Dosis	Día	Media
1	1	1.015000
1	2	3.887500
1	3	8.487500
1	4	13.530000
1	5	21.139999
1	6	28.504999
1	7	37.602501
2	1	1.105000
2	2	3.715000
2	3	7.695000
2	4	11.552501
2	5	22.607500
2	6	30.472500
2	7	37.500000

Dosis 1 = 500 μ L

Dosis 2 = 1000 μ L