



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

Efecto de *Humphreya coffeata* sobre el
crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

M A E S T R O E N M A N E J O
D E
R E C U R S O S N A T U R L E S

P R E S E N T A

IBT. BENJAMÍN AMARO GUADARRAMA

DIRECTORA: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ
CODIRECTOR: DR. EDGAR GARCÍA HERNÁNDEZ



CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2021

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría y financiamiento de este proyecto.

Al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por permitirme realizar los estudios en la Maestría en Manejo de Recursos Naturales, así como al personal administrativo por su apoyo y amabilidad.

A mi asesora de tesis la doctora Maura Téllez Téllez, por creer en mí desde el primer día en que llegue al laboratorio de micología, compartir sus conocimientos, su tiempo, tener la paciencia de enseñarme cómo trabajar tanto en el laboratorio como académicamente, pero, sobre todo, a darme la oportunidad para realizar este trabajo y permitirme demostrarle mis capacidades. Gracias por hacer de mí una mejor persona y gracias por la formación académica para poder concluir este proyecto de forma exitosa.

A la doctora Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta, por compartir sus conocimientos, los cuales, formaron parte de mi formación profesional, además, de ser una gran persona con un gran corazón.

Al Dr. Edgar García Hernández, por fungir como mi codirector, brindarme su apoyo y disposición para realizar esta investigación.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez, por complementar este proyecto con sus conocimientos, siempre estar al pendiente de mis avances, darme críticas las cuales generaron que me esforzara más y de brindarme su apoyo cuando lo necesite.

A la Dra. Liliana Aguilar Marcelino, por estar disponible cuando lo necesite, brindándome parte de su tiempo y contribuir para que este proyecto avanzara.

Dedicatorias

A mis amigos y compañeros de laboratorio Alma, Tania, Reyes, Dianita, Mariel, Clarita, Lilia, Isabel y mi generación de maestría, a ustedes que siempre sacaron una sonrisa en mi lo cual ayudo a aligerar el trabajo, los quiero mucho.

A mis amigos José, Jehu, Ángel, Manuel, Manae y Cesar, que a pesar de que nunca tuve tiempo de verlos, nunca dejaron de estar al pendiente de mí.

Rafael, muchas gracias por todo el apoyo que me has dado, siempre has creído en mí, nunca me dejaste caer a pesar de las circunstancias, muchas gracias por estar ahí en los peores momentos de mi vida, además, de esas llamadas que siempre me inyectaron de energía para seguir adelante.

Gracias a mis padres que siempre dejaron que hiciera lo que yo quisiera, confiando en que sería una buena persona, este trabajo me permitió demostrarles que siempre se puede a pesar de las circunstancias.

A mis hermanos Lizzette, Eduardo, Lupita, Vanessa y Carlos, sepan que la vida es difícil pero no hay mejor satisfacción el demostrar que no importa, siempre se puede.

“Una vida sin aspiraciones es lo mismo que estar muriendo lento”

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	7
2.1 Hongos fitopatógenos en la postcosecha	7
2.2 Pérdidas postcosecha por <i>Rhizopus stolonifer</i>	7
2.2.1 Características morfológicas de <i>Rhizopus stolonifer</i>	9
2.2.2 Distribución en la naturaleza	10
2.2.3 Mecanismo de infección en frutas y verduras	10
2.2.4 Mecanismo de degradación en frutas y verduras	11
2.3 Medidas de control	12
2.4 Microorganismos antagonistas	14
2.4.1 Mecanismos de acción antagónica	15
2.4.2 Uso de hongos antagonistas	17
2.5 <i>Humphreya coffeata</i>	19
2.5.1 Características morfológicas de <i>Humphreya coffeata</i>	21
2.5.2 Sistema hifal de <i>Humphreya coffeata</i>	22
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	23
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	24
4.1 Hipótesis	24
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Organismos de estudio	25
5.2 Preparación del organismo antagonista	26
5.3 Pruebas de antagonismo	26
5.3.1 Variables evaluadas	26
5.3.2 Determinación de la capacidad antagónica	27
5.4 Pruebas de micoparasitismo	27
5.5 Caldo antifúngico	29
5.5.1 Evaluación antifúngica de los caldos de cultivo	31
5.6 Diseño estadístico	31
CAPÍTULO 6. RESULTADOS	32
6.1 Pruebas de antagonismo	32
6.1.1 Determinación de la capacidad antagónica	33
6.2 Observaciones en el microscopio	33
6.3 Efecto antifúngico de los caldos de cultivo	35
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	41
CAPÍTULO 8. CONCLUSIÓN	48

CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS	49
CAPÍTULO 10. LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>R. stolonifer</i>	10
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>H. coffeata</i>	21
Tabla 3. Escala para evaluar la capacidad antagónica	27
Tabla 4. Resultados obtenidos en el antagonismo	32
Tabla 5. Efecto del caldo de cultivo CH sobre el crecimiento en Rs a las 48h	35
Tabla 6. Efecto del caldo de cultivo HR sobre el crecimiento en Rs a las 48h	37
Tabla 7. Efecto del caldo de cultivo HB sobre el crecimiento en Rs a las 48h	38
Tabla 8. Comparación del PRCM de los tres caldos de cultivo (CH, HR y HB)	40

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Pág.
Figura 1. Características de <i>R. stolonifer</i>	09
Figura 2. Invasión de <i>R. stolonifer</i> en fresas	11
Figura 3. Modo de infección de <i>R. stolonifer</i>	12
Figura 4. Fungicida Fludioxonil para cultivos de papa	14
Figura 5. <i>H. coffeata</i>	22
Figura 6. Hifas de <i>H. coffeata</i> bajo microscopio a 100x	22
Figura 7. Diagrama general del proyecto de investigación	25
Figura 8. Microcultivo de Ridell	28
Figura 9. Hifas sobresaliendo de los fragmentos	29
Figura 10. Caldos de cultivo	30
Figura 11. Antagonismos después de 72h de la confrontación	32
Figura 12. Antagonismo después de las 240 h de haber entrado en contacto ambos organismos	33
Figura 13. Micoparasitismo de Hc	34
Figura 14. Crecimiento de Rs sobre el medio de cultivo CH a las 48h	36
Figura 15. Crecimiento de Rs sobre el medio de cultivo HR a las 48h	37
Figura 16. Crecimiento de Rs sobre el medio de cultivo HB a las 48h	39

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados
µm: Micrómetros
AF: Antagonista-fitopatígeno
atm: Atmosferas
CDBB: Colección del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CH: Caldo de cultivo con fragmentos de *H. coffeata*
CIB: Centro de Investigaciones Biológicas
cm: Centímetro
g: Gramo
h: Horas
HB: Caldo de cultivo con fragmentos de *H. coffeata* y biomasa de *R. stolonifer*
HC: *Humphreya coffeata*
HR: Caldo de cultivo con fragmentos de *H. coffeata* y *R. stolonifer* vivos
IPN: Instituto Politécnico Nacional
mg: Miligramo
mL: Mililitro
mm: Milímetro
PDA: Papa dextrosa agar
PRCM: Porcentaje en la reducción del crecimiento micelial
rpm: Revoluciones por minuto
Rs: *Rhizopus stolonifer*
Tan: Testigo antagonista
Tf: Testigo fitopatígeno
ton: Toneladas
UAEM: Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UV: Ultravioleta
WFCC: Word Federation for Culture Collection (por sus siglas en ingles)

Resumen

Rhizopus stolonifer es un hongo fitopatógeno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Es un hongo de rápido crecimiento y alta capacidad de desarrollo en humedades y temperaturas variables. Este fitopatógeno invade a una gran variedad de productos hortofrutícolas en la postcosecha generando pérdidas considerables en el sector alimenticio; por lo cual, se han buscado alternativas para su combate, como es la implementación de temperaturas altas o bajas, atmosferas controladas, radiaciones gamma y luz UV o el uso de fungicidas químicos que, con la adición de antagonistas microbianos, su eficiencia se ha visto incrementada. Sin embargo, la implementación de fungicidas químicos en los cultivos llega a generar cambios negativos en el medio ambiente, a un nivel físico, químico y/o biológico, provocando en el fitopatógeno un desarrollo en la resistencia a los componentes del fungicida. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antagónica del hongo *Humphreya coffeata* sobre *R. stolonifer*, sometiendo a estos en confrontación dual en placas, donde *H. coffeata* produjo un porcentaje en la reducción del crecimiento micelial (PRCM) del 45.24%. Se determinó la capacidad antagónica de *H. coffeata* mediante la escala propuesta por Bell, se pudo observar que el antagonista presentó grado 1, determinando que el antagonista logró sobrecrecer en toda la placa a los 10 días posteriores de la confrontación, eliminando por completo al fitopatógeno. Al observar la confrontación dual en microscopio (10x, 40x y 100x) se pudo notar un micoparasitismo por parte de *H. coffeata* hacia *R. stolonifer* como mecanismo de acción, lo cual el antagonista enrolló al fitopatógeno cubriendo totalmente sus hifas, degradando su micelio y provocándole la muerte. Con el objetivo de extraer los metabolitos producidos por el antagonista, los cuales utiliza para el control de *R. stolonifer*, se procedió a la formulación de tres caldos de cultivo, consistiendo en caldo de cultivo inoculado con *H. coffeata* (CH), caldo de cultivo inoculado con *H. coffeata* y *R. stolonifer* (HR) y caldo de cultivo con biomasa de *R. stolonifer* al 1% inoculado con *H. coffeata* (HB); evaluando la actividad antifúngica de estos caldos hacia *R. stolonifer* en placas con PDA suplementados en diferentes concentraciones (5%, 10% y 20%) cada 120 h durante cuatro ocasiones. Los caldos de

cultivo con mayores PRCM fueron HB con un 28.61% (15 días con el 10%), HR con un 39.49% (5 y 10 días con el 20%) y HR con un 47.81% (10 días con el 20%). Observando la esporulación de *R. stolonifer* en los ensayos mencionados, se pudo notar un retardo de un día para HB (15 días con el 10%), tres y dos días para HR (5 y 10 días con el 20%) y de un día para HB (10 días con el 20%). Estos resultados indican que el hongo *H. coffeata* puede ser utilizado como una opción de control biológico contra *R. stolonifer*.

Abstract

Rhizopus stolonifer is a phytopathogenic fungus that is widely distributed in nature. It is a fast-growing fungus with a high capacity for development in variable humidities and temperatures. This phytopathogen invades a great variety of fruit and vegetable products in the post-harvest period, generating considerable losses in the food sector; therefore, alternatives have been sought to combat it, such as the implementation of high or low temperatures, controlled atmospheres, gamma radiation and UV light or the use of chemical fungicides that, with the addition of microbial antagonists, their efficiency has been seen increased. However, the implementation of chemical fungicides in crops generates negative changes in the environment, at a physical, chemical and/or biological level, causing the phytopathogen to develop resistance to the components of the fungicide. The objective of this work was to evaluate the antagonistic capacity of the fungus *Humphreya coffeata* on *R. stolonifer*, subjecting them in dual confrontation in plates, where *H. coffeata* produced a percentage in the reduction of mycelial growth (PRCM) of 45.24%. The antagonistic capacity of *H. coffeata* was determined using the scale proposed by Bell, it could be observed that the antagonist presented grade 1, determining that the antagonist managed to overgrow in the entire plaque 10 days after the confrontation, eliminating the phytopathogen. When observing the dual confrontation under the microscope (10x, 40x and 100x) it was possible to notice a mycoparasitism on the part of *H. coffeata* towards *R. stolonifer* as a mechanism of

action, which the antagonist rolled up the phytopathogen completely covering its hyphae, degrading its mycelium, and causing death. In order to extract the metabolites produced by the antagonist, which it uses to control *R. stolonifer*, we proceeded to the formulation of three culture broths, consisting of culture broth inoculated with *H. coffeata* (CH), broth of culture inoculated with *H. coffeata* and *R. stolonifer* (HR) and culture broth with biomass of *R. stolonifer* at 1% inoculated with *H. coffeata* (HB); evaluating the antifungal activity of these broths towards *R. stolonifer* in plates with PDA supplemented in different concentrations (5%, 10% and 20%) every 120 h for four occasions. The culture broths with the highest PRCM were HB with 28.61% (15 days with 10%), HR with 39.49% (5 and 10 days with 20%) and HR with 47.81% (10 days with 20%). Observing the sporulation of *R. stolonifer* in the tests, a delay of one day was observed for HB (15 days with 10%), three and two days for HR (5 and 10 days with 20%) and a day for HB (10 days with 20%). These results indicate that the fungus *H. coffeata* can be used as a biological control option against *R. stolonifer*.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los productos hortofrutícolas son susceptibles al ataque microbiano, encontrándose entre ellos los hongos fitopatógenos. Estos organismos provocan distintas enfermedades en las frutas y verduras; las enfermedades que llegan provocar son la marchites, antracnosis y pudriciones. Las enfermedades provocadas por los hongos fitopatógenos generan reacciones químicas en los alimentos, dando lugar a que en ellos se modifiquen sus características organolépticas como lo es color, textura y sabor principalmente. Todo esto provoca que el alimento quede inservible para el consumo humano en un periodo de tiempo muy corto (Reglero, 2011). Los hongos fitopatógenos más invasivos son los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizopus* (Cuevas, 2016). Entre los hongos fitopatógenos mencionados, el hongo *Rhizopus stolonifer* es considerado uno de los principales invasores de frutas y verduras en la etapa de la postcosecha. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, sobrevive tanto en el suelo, el polvo como en los residuos orgánicos hasta llegar a invadir a los tejidos vegetales. Debido a que este hongo se caracteriza por ser un fitopatógeno de diversas frutas y verduras, además de poseer un amplio rango de resistencia ambiental, la industria agrícola busca constantemente métodos que ayuden a disminuir su invasión. Esto es porque, las frutas y verduras se caracterizan por ser altamente percederas y susceptibles al ataque microbiano, debido a su alto contenido de agua y la alta actividad metabólica que presentan aún después de ser cosechadas (Hernández-Lauzardo et al., 2006; Vázquez & Guerrero 2013).

En el sector agrícola, los fungicidas químicos sintéticos como el Dicloran (2,6-dicloran-4-nitroanilina) son un método comúnmente usado para el control de *R. stolonifer*. Este fungicida es una mezcla de sustancias químicas que se utilizan de manera constante con el objetivo de controlar las enfermedades agrícolas provocadas por este fitopatógeno (Wilson Charles et al., 1986). Cuando el Dicloran y otros fungicidas son aplicados en los cultivos, llegan a generar cambios en el medio ambiente, ya sea a un nivel físico, químico y/o biológico, debido a que son sustancias químicamente complejas y por lo tanto estos cambios producidos pueden conducir a la degradación parcial en el

medioambiente que en sus diversas formas pueden afectar el ecosistema (Gálvez-Gamboa et al., 2018). La constante aplicación de los fungicidas también llega a generar que los hongos fitopatógenos como *R. stolonifer* desarrollen resistencia a sus componentes, por lo que, en ocasiones es necesario el uso de un fungicida más potente (Bautista-Baños, 2006). Debido a estos factores sobre el uso de fungicidas químicos, es que el consumidor evidencia un descontento sobre su uso. Por otro lado, el consumir frutas y verduras otorga grandes beneficios a la salud, debido a los nutrientes que contienen. La introducción de frutas y verduras al mercado 100% saludables y libres de fungicidas químicos es una buena opción para incrementar su consumo (Molina-Mercader et al., 2006).

Una opción viable como alternativa, es el uso de control físico, radiación gamma, aplicación de luz ultravioleta, atmosferas controladas y control biológico (Solorio, 2000; Velázquez et al., 2008). El control biológico es basado en el uso de organismos antagonistas, los cuales, son eficaces para el combate de patógenos, como es en el caso de los hongos fitopatógenos. La implementación de organismos antagonistas para el control de hongos fitopatógenos puede ayudar a evitar la invasión de estos y, por lo tanto, las enfermedades que provocan en las frutas y verduras (Bautista-Baños, 2006). Entre el grupo de antagonistas, se encuentran los hongos del género *Ganoderma*, siendo de los hongos más estudiados, debido a sus propiedades medicinales como antitumorales y antioxidantes (Russell & Paterson, 2006). Los metabolitos secundarios que produce mayormente este hongo son los triterpenos y polisacáridos (Berovič et al., 2003). A los triterpenos se les han atribuido actividades antifúngicas, siendo utilizados contra *Mycosphaerella fijiensis* (Niño et al., 2007). Algunos polisacáridos producidos por *Ganoderma* spp. han sido utilizados para el control de hongos fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae* y *Curvularia clavata*, obteniendo una considerable inhibición en su crecimiento (Atencio et al., 2011). Por otro lado, *Humphreya coffeata* es un hongo que tiene una similitud taxonómica con este género, sobre todo con *Ganoderma lucidum*. El hongo *H. coffeata* cuenta con la capacidad de producción de agentes activos similares a los de *G. lucidum* (Porrás-Arboleda et al., 2009). Sin embargo, el hongo *H. coffeata* no ha

sido investigado para el control de hongos fitopatógenos como *R. stolonifer*, y por ser una potencial alternativa debido a que produce metabolitos secundarios similares a los de *G. lucidum*, puede contar con las características adecuadas para el control de *R. stolonifer*.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Hongos fitopatógenos en la postcosecha

Uno de los grandes problemas fitosanitarios que en los cultivos agrícolas se manifiesta constantemente, es la presencia de plagas y enfermedades ocasionadas en su mayoría por la presencia de hongos fitopatógenos (Moo-koh et al., 2014). Se ha reportado que los hongos fitopatógenos pueden comenzar a producir enfermedades de dos formas distintas, durante la precosecha y la postcosecha (Solario, 2000). Debido a la invasión de hongos fitopatógenos en frutas y verduras, en países industrializados se estiman pérdidas de hasta el 25%; mientras que, en países en desarrollo, se han estimado que pueden exceder el 50% del total de la producción (Spadaro & Lodovica, 2004; Tripathi & Dubey, 2004). Los géneros de hongos fitopatógenos reportados como principales agentes causales de enfermedades postcosecha son *Talaromyces*, *Alternaria*, *Botrytis* y *Rhizopus* (Alfaro-Gutiérrez, 2011). El hongo *Talaromyces minioluteus* ha sido reportado como un invasor de una variedad de frutas y verduras, como el tomate, cebolla, naranja y membrillo, causando daños en estos como pudrición y licuefacción total del fruto en poscosecha (Gryganskyi et al., 2018). El hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* provoca la “pudrición negra”, ataca generalmente a tomates en la postcosecha, generándoles manchas superficiales negras o café secas hundidas y posteriormente formando una capa densa del hongo sobre las heridas del producto (Wang et al., 2008). Otro hongo fitopatógeno es *Botrytis cinerea*, causa una enfermedad conocida como “moho gris”. Esta enfermedad se caracteriza por manchas en el fruto y posteriores lesiones e invade a una amplia variedad de frutas y verduras. Uno de los hongos fitopatógenos de mayor invasión y gran número de hospederos es *R. stolonifer*, este hongo causa la enfermedad conocida como “pudrición blanda” en frutas y verduras (García-Nieto, 2020).

2.2 Pérdidas postcosecha por *Rhizopus stolonifer*

En México, las pérdidas en la postcosecha han sido cuantificadas de manera parcial, reportando pérdidas en cultivos de tomate de más del 25%, debido a la podredumbre por hongos fitopatógenos sobresaliendo *R. stolonifer* (Spadaro & Lodovica, 2004).

Estudios realizados por Abdel-Mallek et al. (1995) demuestran estos datos, ya que aislaron hongos fitopatógenos de distintos puntos del mercado; tomando 11 especies recuperadas de 156 tomates enfermos, en donde *R. stolonifer* fue de los hongos fitopatógenos con mayor frecuencia de invasión (35.9%). Bautista-Baños et al. (2008) aislaron hongos fitopatógenos tomados de tomates que fueron recolectados de 15 mercados en distintos locales, en el estado de Morelos, México. *R. stolonifer* fue el fitopatógeno más predominante, con una frecuencia de casi el 50% de invasión.

Uno de los productos donde México destaca, es en la producción de fresa; siendo el tercer productor a nivel mundial, con una producción anual de 658, 436 ton, en donde Morelos participa con una producción de 95.9 ton; Estados Unidos es el segundo productor mundial con 1,449,280 ton y China se encuentra en el primer lugar produciendo 3,717,283 ton (Plascencia et al., 2012; SIAP, 2017). Sin embargo, la fresa también es susceptible al ataque de *R. stolonifer*. Fraire-Cordero et al. (2003) realizaron estudios tomando muestras de parcelas de fresas comerciales de Zamora, Michoacán, México y de fresas importadas de California, Estados Unidos; con el objetivo de identificar la frecuencia de la invasión de hongos fitopatógenos postcosecha, en los que predominó *Rhizopus* sp. con una frecuencia de hasta el 95% en la región de Zamora, Michoacán, México y con 22% de las que se importaron de California, Estados Unidos. Plascencia-Tenorio (2011), menciona en estudios realizados en los mercados de New York y Chicago en Estados Unidos sobre las pérdidas postcosecha ocasionadas en fresas por daños mecánicos e invasión de hongos fitopatógenos las cuales ascienden del 28.8% al 41.2% destacando las pérdidas por moho gris (*Botritis cinérea*) y pudrición blanda (*R. stolonifer*). Mulkay et al. (2010) diagnosticaron a las enfermedades con mayor incidencia ocasionadas por hongos fitopatógenos durante la postcosecha en papaya; en tres localidades frutícolas de Cuba. Reportaron que la pudrición blanda provocada por *R. stolonifer* fue la que ocasionó los mayores daños (56.4%), siendo superior a la antracnosis. Teixeira da Silva et al. (2007) mencionaron que la pudrición blanda causada por *Rhizopus* spp. es una de las enfermedades con mayor frecuencia durante el almacenamiento y transporte de este fruto.

2.2.1 Características morfológicas de *Rhizopus stolonifer*

El sinónimo más actualizado de este hongo es *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., Toulouse (1902). Este hongo cuenta con esporangióforos carentes de septos, sin ramificar, son aéreos y miden de entre los 6-15 μm de diámetro y hasta 2 mm de alto (Medeiros-Nóbrega, 2013). Los esporangióforos nacen de unas estructuras llamadas estolones, de los cuales, también crecen los rizoides que se desarrollan en todas direcciones (De la Garza, 1996; Martínez-Hernández, 2017). En la punta de los esporangióforos se encuentran los esporangios midiendo hasta 275 μm de diámetro (Figura 1), aquí se encuentra la columela que es donde se desarrollan las esporangiosporas y miden de entre 8-15 μm , siendo de forma elipsoidal (Pontón et al., 2002). En la Tabla 1 se muestra su clasificación taxonómica (Index fungorum, 2021).

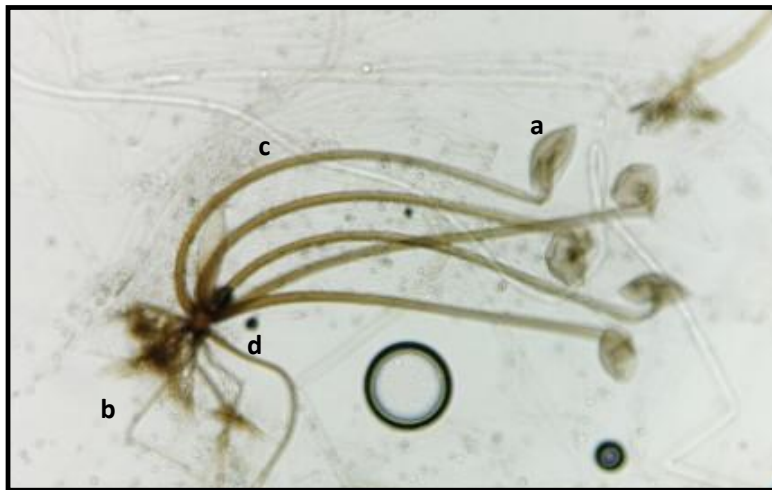


Figura 1. Características de *R. stolonifer*. (a) Esporangio, (b) Rizoides, (c) Esporangióforo y d) Estolones.
Fuente: Propiedad del autor del presente estudio.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *R. stolonifer*.

Reino	Fungi
Filo	Mucoromycota
Clase	Mucoromycetes
Orden	Mucorales
Familia	Mucoraceae
Género	<i>Rhizopus</i>
Especie	<i>stolonifer</i>

2.2.2 Distribución en la naturaleza

Las esporas de este hongo se diseminan fácilmente por el aire, esto le permite distribuirse ampliamente en la naturaleza, pudiendo encontrarse en diversos lugares como el polvo, estiércol, la madera, en algunas semillas y en los nidos de las aves. Este fitopatógeno se caracteriza por ser de crecimiento rápido y micelio aéreo, con la capacidad de desarrollarse en humedades relativas variables (75-84%), además, a temperaturas de entre 3-34°C con una de óptima de 15.5-25°C (De la Garza, 1996; Pontón et al., 2002; Plascencia et al., 2012;).

2.2.3 Mecanismo de infección en frutas y verduras

La infección efectuada por de *R. stolonifer* se lleva a cabo durante la postcosecha. Esto es debido a que el fitopatógeno necesita que el hospedero se encuentre maduro y con heridas, estas cortaduras o golpes se pueden dar durante su manejo como la cosecha, el transporte, en la maquinaria empleada para el empaquetado y en el almacenamiento; cuando esto ocurre, las esporangiosporas se depositan en las heridas del fruto (Zamora-Magdaleno et al., 1999; Bautista-Baños et al., 2008)

2.2.4 Mecanismo de degradación en frutas y verduras

Las esporangiosporas cuando se encuentran depositadas en el fruto comenzarán a producir hifas, las cuales, a su vez secretarán enzimas pectinolíticas que degradan y disuelven las células de los tejidos, dando como resultado la pérdida de la cohesión entre ellas, produciendo una sustancia líquida y dando como resultado una pudrición blanda. Las enzimas pectinolíticas secretadas por el fitopatógeno avanzan por delante del micelio y siguen separando a las células antes de que el micelio se fije en ellas. El hongo también secreta enzimas celulíticas sobre los tejidos macerados, degradando así la celulosa del hospedero. El micelio del hongo crece intercelularmente y al parecer no invade a las células; solo lo hace cuando han muerto y han comenzado a desintegrarse. Esto parece indicar que el micelio nunca entra en contacto con las células vivas del hospedante. El hongo continúa desarrollándose en el interior de los tejidos, ablandando la epidermis del hospedero, rompiéndola con facilidad, con ello, el hongo emerge a través de las heridas preexistentes en el fruto, produciendo estolones, rizoides esporangios y esporangióforos, siendo los rizoides los que perforan la epidermis ablandada del fruto (Figura 2 y 3). La mayoría de las infecciones efectuadas por este fitopatógeno, durante el almacenamiento de los frutos se deben a las esporangiosporas asexuales. La reproducción sexual también puede ocurrir, solo que requiere la presencia de dos micelios fisiológicamente distintos y compatibles; cuando dos cepas opuestas se ponen en contacto (Agrios, 1985; Alexopoulos et al., 1996; Solorio, 2000; Alvarado-Hernández, 2011).

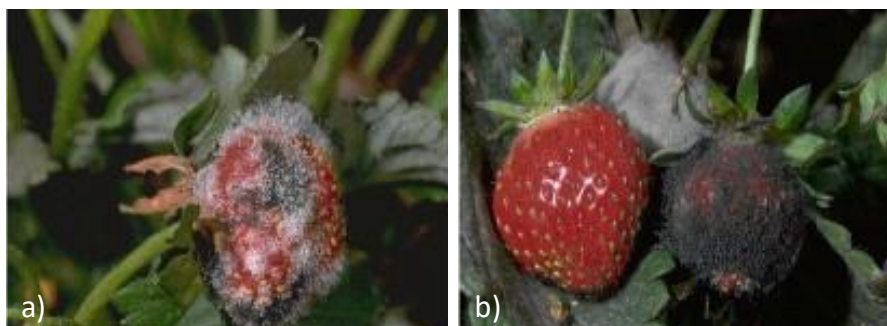


Figura 2. Invasión de *R. stolonifer* en fresas. **a)** Síntoma inicial **b)** Síntoma avanzado. Fuente: Solorio, (2000).

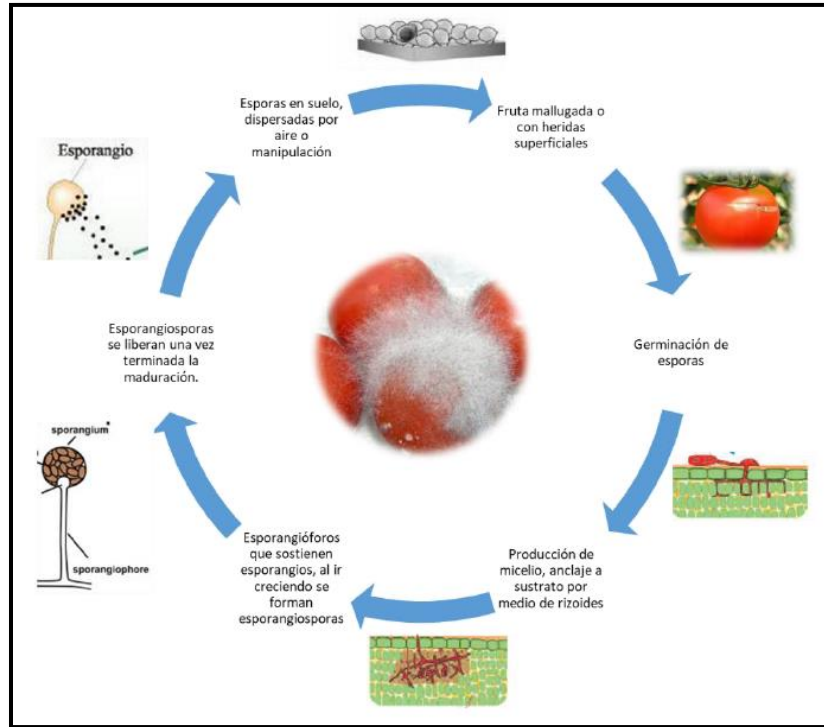


Figura 3. Modo de infección de *R. stolonifer*. Fuente: García-Nieto, 2020.

Se ha observado que *R. stolonifer* tarda unas 96 h en descomponer completamente al hospedero, de esta manera es que genera pérdidas considerables en el sector alimenticio (Velázquez-del Valle et al., 2007). Entre los productos hortofrutícolas que este fitopatógeno invade son: tomate (*Physalis philadelphica*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), camote (*Ipomoea batatas*), durazno (*Prunus pérsica*), melón (*Cucumis melo*), papaya (*Carica papaya*), cacahuate (*Arachis hypogaea*), betabel (*Beta vulgaris*), coliflor (*Brassica oleracea*), zanahoria (*Daucus carota*), sandía (*Citrullus lanatus*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*), cebolla (*Allium cepa*), berenjena (*Solanum melongena*), chile piquín (*Capsicum annuum*), todos los frutos rojos y las cucurbitáceas (Alfaro-Gutiérrez, 2011).

2.3 Medidas de control

Control preventivo: Al momento de la cosecha, transporte y el almacenamiento se requiere de un cuidadoso manejo para evitar ocasionar heridas en el producto y con ello la entrada del fitopatógeno.

Atmósferas controladas: Este tipo de métodos han sido utilizados para extender la vida de los productos en el almacén a través del control de pudriciones. Algunos estudios demostraron que diferentes tratamientos hipobáricos para controlar la pudrición blanda provocada por *R. stolonifer* se redujeron con valores de 0.5 atm a una exposición de 4 h (Velázquez et al., 2008).

Radiaciones gamma y luz UV: Se ha empleado esta tecnología para inhibir el desarrollo de *R. stolonifer* en jitomate. En este método se valoró el tratamiento combinado de la radiación gamma y agua caliente, obteniendo un 90% de inhibición sobre el fitopatógeno. En adición, Pan et al. (2004) analizaron el efecto de la combinación de luz UV y aire a 45°C durante una exposición de tres horas aplicado en fresas, obteniendo un control positivo en el control de las pudriciones ocasionadas por *R. stolonifer* y el mantenimiento de la calidad del producto.

Fungicidas: El principal método de control que utilizan los agricultores para el combate de *R. stolonifer* ha sido en el uso de fungicidas químicos. Los fungicidas más utilizados han sido el Dicloran, Fludioxonil, Iprodione y Tebuconazole. Estudios realizados *in situ* sobre frutos de durazno, el Dicloran redujo la pudrición entre el 87 a 100%. En otros estudios utilizando Iprodione, se observó una reducción del 59% en la pudrición del jitomate. Sin embargo, en el año de 1996 los fabricantes cancelaron de manera voluntaria su producción (Velázquez-del Valle, 2007). El fungicida Fludioxonil (Figura 4) redujo la incidencia de *R. stolonifer* entre un 75-90% aplicándolo en duraznos y ciruelas; respectivamente, el Tebuconazol controló la pudrición en estos frutos entre un 69-81% (Alfaro-Gutiérrez, 2011). Diversos estudios han demostrado que los componentes de los fungicidas mencionados llegan a provocar cepas resistentes en un periodo largo de uso y, además, estos representan un riesgo potencial para la seguridad ambiental y la salud humana (Tripathi & Dubey, 2004). El uso indiscriminado de fungicidas químicos sintéticos tiene efectos adversos los cuales están impactando de manera significativa. Entre los efectos que se presentan se encuentran la reducción de la

biodiversidad en los agroecosistemas, generación de poblaciones con resistencia a fungicidas debido a los mecanismos naturales de mutación que en los hongos fitopatógenos se presentan y a los problemas de salud pública debido a los residuos químicos que se generan (Yáñez et al., 2013).



Figura 4. Fungicida Fludioxonil para cultivos de papa. Fuente: Huisell, (2018).

Control biológico: Actualmente se han realizado diversas investigaciones sobre el control biológico con el fin de encontrar alternativas naturales para el control de las enfermedades postcosecha provocadas por la invasión de hongos fitopatógenos; valorando opciones como el empleo de antagonistas microbianos y/o metabolitos secundarios empleado por estos. Se ha señalado la necesidad de profundizar sobre este tema, investigando sobre el mecanismo de acción implicado y su potencial microbiano para el control de los organismos fitopatógenos. Esto contribuirá a potenciar el empleo de mejores estrategias de control sin poner en riesgo el medio ambiente y la salud humana al utilizar fungicidas químicos, además, se ha demostrado que los antagonistas microbianos pueden entrar en combinación con otros métodos de control para reforzar su funcionalidad (Velázquez-del Valle, 2007).

2.4 Microorganismos antagonistas

En la naturaleza, existe un grupo importante de microorganismos que cuentan con la característica de tener efectos antagónicos hacia otros microorganismos. Las acciones

que efectúan los antagonistas pueden ser aprovechadas como una manera de control biológico de algunos patógenos como son los hongos fitopatógenos (Fernández-Larrea, 2001). Según Spadaro & Lodovica (2004) las características que debe tener un buen antagonista son las siguientes:

- Genéticamente estable, es decir, que no se produzcan variaciones celulares que lo lleguen a afectar.
- Efectivo a bajas concentraciones.
- No exigente en cuanto a requerimientos nutricionales.
- Efectivo para controlar un gran número de organismos patógenos.
- De fácil reproducción
- Fácil de manipular.
- Compatible con procedimientos comerciales.
- No patógeno del hospedero a proteger
- No productor de metabolitos secundarios que sean dañinos a la salud humana.

2.4.1 Mecanismos de acción antagónica

Antes de utilizar algún organismo antagonista para control biológico es necesario entender los distintos mecanismos de acción que se llevan a cabo para el control de fitopatógenos. Estos mecanismos de acción no se conocen en su totalidad, sin embargo, en el caso de los hongos, son fundamentalmente tres tipos: competencia directa por el espacio o por los nutrientes (competencia), producción de metabolitos secundarios como antibióticos (antibiosis) y enrollamiento micelial, penetración, lisis y vacuolización, conocido como micoparasitismo (Howell, 2003). Janisiewicz & Korsten (2002) mencionan que más de un mecanismo de acción puede estar implicado por un antagonista.

Antibiosis: El antagonista secreta compuestos antimicrobiales para suprimir y/o matar al fitopatógeno (Verma et al., 2007). Ejemplo de esto, se encuentra en algunas de las especies de *Trichoderma* sp. que producen metabolitos volátiles como poliquétidos, sesquiterpenos, esteroides e isonitrilos. Este mecanismo tiene grandes efectos significativos, inhibiendo el desarrollo y crecimiento de hongos fitopatógenos (Fernández et al., 2013; Michel-Aceves et al., 2019). Esto se puede notar por la inhibición en el desarrollo del fitopatógeno y que no se establece un contacto físico con el antagonista, estas sustancias son consideradas como antibióticas (Benítez et al., 2004).

Competencia: En este comportamiento los organismos confrontados solo competirán por los mismos nutrientes en el mismo sitio. Para notarlo a grandes rasgos, la utilización de estos nutrientes por parte del antagonista reducirá la cantidad o espacio disponible para el fitopatógeno. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del antagonista, como una rápida velocidad de crecimiento, también, pueden afectar factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad entre otros (Gamboa-Villa, 2017).

Micoparasitismo: Este proceso incluye que las hifas del antagonista se coloquen alrededor de las hifas del fitopatógeno; controlando así su desarrollo y/o provocándole la muerte. Este mecanismo de acción implica una serie de eventos secuenciales que incluye el reconocimiento, ataque y subsecuentemente la penetración de las hifas del antagonista hacia el fitopatógeno. Dependiendo del antagonista, en este comportamiento se puede generar la formación de estructuras llamadas “apresorios” que sirven para penetrar en el huésped o simplemente lo envuelven. La interacción que se genera con esto necesita estar acompañada con la producción de metabolitos secundarios tales como enzimas degradadoras de pared celular del fitopatógeno como quitinasas, celulasas y β -1,3-glucanasa (Howell, 2003).

2.4.2 Uso de hongos antagonistas

Investigaciones enfocadas en la búsqueda de hongos antagonistas de hongos fitopatógenos, han arrojado resultados favorables. Mutlag et al. (2018) pudieron determinar que el hongo *Pleurotus ostreatus* es antagonista de *Rhizopus* sp. Sometieron a estos hongos en confrontación dual en placas; observaron que *P. ostreatus* detuvo el crecimiento de *Rhizopus* sp. cubriendo 2/3 partes de la placa y el fitopatógeno solo 1/3. Cruz-Muños, (2012) realizó extractos obtenidos de medio de cultivo líquido (caldo de papa y dextrosa) con el hongo *Pycnoporus sanguineus*. De este medio líquido, extrajeron un pigmento naranja con acetato de etilo. Se evaluó el efecto del pigmento para el control *in vitro* de hongos fitopatógenos postcosecha (*Botrytis cinérea*, *Colletotrichum fragariae* y *C. gloeosporioides*) por medio del método de difusión en agar; observando un efecto en el control de los hongos fitopatógenos mencionados, obteniendo una reducción en el crecimiento micelial del 60-70 % para *B. cinerea*, para *C. fragariae* la reducción fue aproximadamente del 50% y un 40% para *C. gloeosporioides* con la adición de 10, y 20 mg/mL del extracto. Wan-Mohtar et al. (2017) mencionan que el micelio de *Ganoderma lucidum* ha sido una fuente importante de sulfatos de glucano. Los sulfatos de glucano producidos por *G. lucidum* fueron evaluados para determinar su actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, encontrando en ellos una concentración inhibitoria mínima de 60 mg / mL y una concentración mínima fungicida de 100 mg / mL. Shaid et al. (2016) realizaron tres extractos (de acetona, metanólico y acuoso) obtenidos de cuerpos fructíferos del hongo *G. lucidum* y fueron evaluados contra dos hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*) aislados de *Calendula officinalis*. Realizaron el método de difusión de pozos en agar colocando los extractos a distintas concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%). El extracto metanólico mostró una reducción en el crecimiento micelial del 64% contra *F. oxysporum*; y contra *A. alternata* tuvo una reducción del 47% a una concentración del 20% para ambos casos; el extracto de acetona mostró una reducción del 57% contra *F. oxysporum* y 50% contra *A. alternata* al 20% de concentración; el extracto acuoso mostró una reducción del 47% contra *F. oxysporum* y del 43% contra *A. alternata* con el 20% de concentración. Sun et al. (2014)

utilizaron a los hongos *Ganoderma applanatum* y *Lentinula edodes*, los cuales, fueron sometidos a fermentación líquida obteniendo tres tipos de polisacáridos (llamados La, Eu y Yb). Analizaron el efecto antifúngico de estos polisacáridos contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria brassicae*, por medio del método de difusión en agar en diferentes concentraciones (0.46, 0.84, 1.72, 3.39, y 6.25 mg/mL), obteniendo las más altas reducciones en el crecimiento micelial del 85% para *F. oxysporum*, 85% en *G. graminis*, 90% en *C. gloeosporioides* y 80% en *A. brassicae*, correspondientes a una concentración de 6.25 mg/mL con los polisacáridos Yb obtenidos del hongo *G. applanatum*. En cuanto a *L. edodes*, las reducciones más altas en el crecimiento micelial fueron del 55% en *F. oxysporum*, 62% en *G. graminis*, 62% en *C. gloeosporioides* y 7% en *A. brassicae*, correspondientes a una concentración de 6.25 mg/mL con los polisacáridos Yb.

Rodríguez (2010) evaluó la actividad antifúngica de extractos a partir del micelio liofilizado y del cuerpo fructífero de *G. lucidum* frente a cepas de *Aspergillus* spp. De este estudio se encontró que el cuerpo fructífero presentó un 21.91% de reducción en el crecimiento micelial y el micelio liofilizado un 23%. Otros estudios realizados por Arias-Londoño et al. (2019) analizaron la actividad antifúngica de *G. lucidum* hacia el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* causante de la enfermedad llamada “Sigatoka negra”. Se encontró que *G. lucidum* es una gran fuente de extractos proteicos con gran potencial con capacidad para degradar diferentes compuestos como polisacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos, los cuales constituyen partes esenciales de una célula viva del fitopatógeno. Estos extractos fueron caracterizados en términos de sus actividades enzimáticas como deoxyribonucleasa, ribonucleasa, proteasa, glucanasa y quitinasa lo cuales presentaron un 79% de inhibición frente a *M. fijiensis*. Mehmood et al. (2019) mencionan que algunas especies de hongos antagonistas cuentan con la capacidad de generar inhibidores para la detección del cuórum (quorum sensing como comúnmente se le conoce) en hongos patógenos, interrumpiendo así la comunicación célula-célula; por ejemplo, Zhu et al. (2011) demostraron que *Auricularia auricular*, contiene compuestos “anti-quorum sensing” heterocíclicos (cisteinildopas,

leucodopacromo y dopaquinona) e inhibió la producción de N-acilhomoserina lactona (AHL) que son una clase de moléculas de señalización involucradas en la detección de quórum. Del mismo modo, *Phellinus igniarius*, *F. graminearum*, *Lasiodiplodia*, *Polyporus squamosus*, *Armillaria mellea* y *Ganoderma lucidum* tienen potencial para descargar compuestos anti-quorum sensing en patógenos.

2.5 *Humphreya coffeata*

El sinónimo más actualizado de este hongo es *Humphreya coffeata* (Berk.) Steyaert, Persoonia (1972). Es un hongo basidiomiceto, los cuales son orgánicamente activos. Los metabolitos que producen pueden contener distintas actividades como la antitumoral, antioxidante, antidiabética y antimicrobiana encontrándose la nematocida y antifúngica, esta última se ha logrado gracias a compuestos como las estrobilurinas, azoxistrobina y onfalotina encontradas en hongos de este tipo (Sandargo et al., 2019). Los hongos basidiomicetos se han utilizado para combatir diversas enfermedades como el hipertensión, Alzheimer, tuberculosis, diabetes, colesterol, cáncer, VIH e hígado graso (Brizuela et al., 1998; De Silva et al., 2013). El hongo *H. coffeata* pertenece a la familia *Ganodermateceae*, en donde se encuentran los hongos del género *Ganoderma*, los cuales, han sido muy utilizados y estudiados durante las últimas décadas, debido a su eficacia demostrada como remedio popular para tratar la hepatopatía crónica, hepatitis, nefritis, hipertensión, hiperlipemia entre otras enfermedades (Hincapie et al., 2005; Santafé & Zuluaga, 2007; Sandargo et al., 2019).

Los triterpenoides han sido especialmente encontrados en el género *Ganoderma* aislando principalmente ácidos ganodéricos, ácidos lucidémicos, y ganodéroiles (Berovič et al., 2003). Los polisacáridos también han sido encontrados en este género y mayormente pertenecen al grupo de los β -glucanos, que poseen enlaces β -(1,3) en la cadena principal (Tang et al., 2007). Tanto los triterpenoides como los polisacáridos obtenidos de este género han sido reportados con actividades antifúngicas (Gallego & García, 2009).

Las sustancias fisiológicamente activas tienen una distinta calidad que varía dependiendo de la cepa, al igual que la ubicación, condiciones de cultivo y del crecimiento del hongo (Berovič et al., 2003). Dentro del género *Ganoderma*, se encuentra *Ganoderma lucidum*, que es también conocido como Reishi o Ling-Zhi. Este hongo es uno de los organismos con mayor uso en Asia. El interés sobre el uso de este hongo es debido al potencial de los metabolitos secundarios que produce (Rusell & Paterson, 2006). El hongo *G. lucidum* cuenta con múltiples investigaciones en donde gran parte han sido enfocados para la producción de biomasa y de polisacáridos tanto intra como extracelular, además, la capacidad antifúngica de este hongo es otro de los factores que lo caracteriza (Hung-Chan et al., 2009). Sin embargo, el hongo *H. coffeata* tiene similitud taxonómica con *G. lucidum*, lo que sugiere que tendría también una capacidad de producción de agentes activos similares, abriendo la posibilidad de descubrir nuevas actividades antimicrobianas (Jong & Birmingham, 1993; Yuen & Gohel, 2005; Rhee et al., 2008; Agapito-Ocampo, 2019). El hongo *H. coffeata* podría ser una opción para la obtención de bioproductos de carácter antifúngico. Estudios realizados por Agapito-Ocampo, (2019) acerca de este hongo, han sido una base primordial para el seguimiento de nuevas investigaciones y el aprovechamiento de este, hongo para la búsqueda de metabolitos de interés.

En el Estado de Morelos, en el municipio de Tlaquiltenango, se aisló la cepa de *H. coffeata*, la cual está depositada en el Herbario Micológico de Morelos bajo el registro HEMIM-140. En la Tabla 2 se presenta su clasificación taxonómica (Indexfungorum, 2017).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *H. coffeata*

Reino	Fungí
Filo	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Polyporales
Familia	Ganodermataceae
Género	<i>Humphreya</i>
Especie	<i>coffeata</i>

2.5.1 Características morfológicas de *Humphreya coffeata*

Este hongo es saprófito; cuenta con un píleo 1.5-10.5 cm de diámetro, plano convexo a depresso; su superficie es rugosa, finalmente velutinosa a lisa, con zonaciones concéntricas pardo amarillento, pardo negruzco y pardo anaranjado (Figura 5).

Contexto: 0.2-0.5 cm de grosor, blanco amarillento a pardo claro.

Olor a papa y sabor amargo.

Himenoforo: tubos 0.1-0.5 cm de largo blanco grisáceo a beige pardusco; poros 4-5 por mm, blancos amarillo verdoso.

Estípite: 2.5- 15.5 cm de largo, 0.5-2 cm de ancho, uniforme, central, algunas veces lateral; superficie finalmente velutinosa a lisa, pardo anaranjado a pardo oscuro.

Habito: solitario a gregario

Hábitat: sobre raíces y madera enterrada o en el suelo

Estacionalidad: de julio a noviembre

Distribución: América central, América del sur e islas del caribe.

Observaciones: esta especie se caracteriza por las zonaciones de la superficie del píleo, de tonos pardo claro y pardo oscuro a pardo anaranjado, además por el blanco amarillento de los poros (Agapito-Ocampo, 2019).



Figura 5. *H. coffeata*. Fuente: Valenzuela-Garza, 2010.

2.5.2 Sistema hifal de *Humphreya coffeata*

Hifas generativas con fíbulas, de paredes delgadas no ramificadas. Las hifas miden de entre los 2.5-4 μm de diámetro (Figura 6). Las hifas esqueléticas son de color amarillentas en hidróxido de potasio.

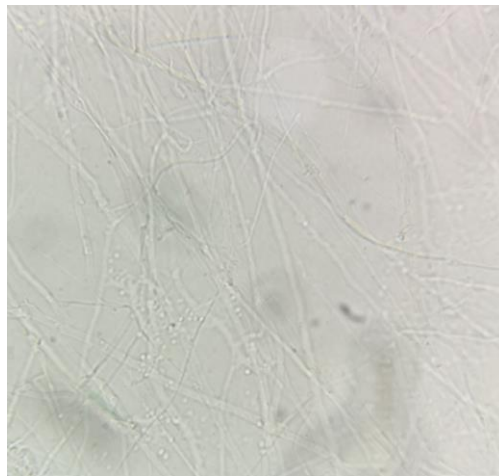


Figura 6. Hifas de *H. coffeata* bajo microscopio a 100x. Fuente: Propiedad del autor del presente estudio.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

La conservación de alimentos frescos es de suma importancia debido a la creciente demanda, pero, sobre todo, a las pérdidas en la producción generadas por la presencia de hongos fitopatógenos. Por lo que, la implementación de alternativas naturales como el uso de antagonistas microbianos para el control de hongos fitopatógenos como *R. stolonifer*, causante de la pudrición blanda, puede ser aprovechada como una forma de control biológico y debido a que a los hongos basidiomicetos se les han reportado actividades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y nematocidas, además, de las propiedades medicinales y nutricionales, pueden ser candidatos ideales para ser aprovechados para este método, sin ocasionar daño al ser humano y el medio ambiente y disminuir las pérdidas ocasionadas por este hongo fitopatógeno. El hongo *H. coffeata* es un hongo basidiomiceto, además, cuenta con similitud taxonómica con *G. lucidum*, lo que sugiere que también cuente con la capacidad de producción de agentes activos similares, entre los que se encuentran los antifúngicos. Por lo que, en este trabajo se evaluó la capacidad antagónica del hongo *H. coffeata* para controlar el crecimiento de *R. stolonifer*.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto de *H. coffeata* sobre el crecimiento de *R. stolonifer*

Específicos:

1. Realizar pruebas de antagonismo entre *H. coffeata* y *R. stolonifer*.
2. Determinar el mecanismo de acción antagónico de *H. coffeata* hacia *R. stolonifer*.
3. Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de caldos de cultivo de *H. coffeata* hacia *R. stolonifer*.

4.1 Hipótesis

El hongo *H. coffeata* será antagonista y presentará actividad antifúngica hacia *R. stolonifer*.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 7 se muestra el diagrama general del proyecto de investigación.

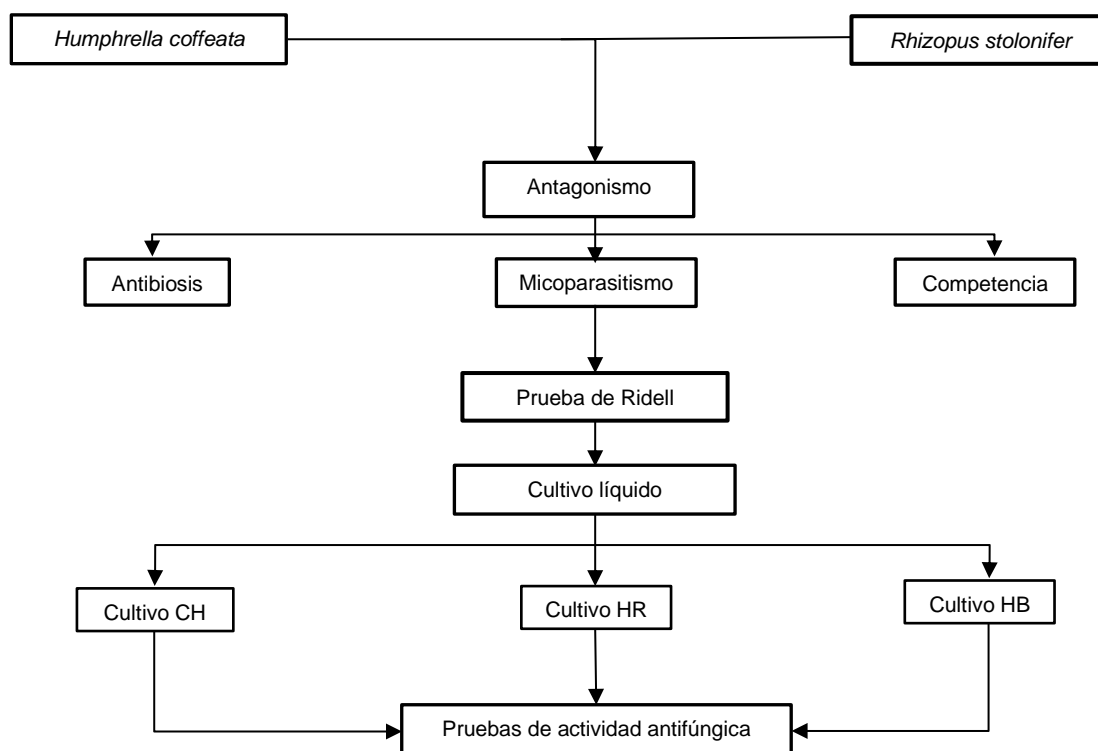


Figura 7. Diagrama general del proyecto de investigación.

5.1 Organismos de estudio

La cepa fitopatógena *R. stolonifer* (Rs) fue obtenida solicitándola a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares afiliada a la WFCC (World Federation for Culture Collection) bajo el acrónimo 500, entregada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Esta cepa se encuentra bajo la Colección del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (CDBB) 1384.

La cepa *H. coffeata* (HEMIM-140) se obtuvo del laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) depositada en el herbario micológico.

5.2 Preparación del organismo antagonista

El hongo *H. coffeata* fue previamente activado mediante resiembra en medio PDA, en placas de 50x15 mm incubándolos a 25°C hasta crecer en toda el área de la placa que fue de 4 días aproximadamente.

5.3 Pruebas de antagonismo

Se realizaron confrontaciones duales para evaluar el efecto antagónico de *H. coffeata* (Hc) hacia *R. stolonifer*; se estableció un ensayo de antagonista-fitopatógeno (AF), testigo antagonista (Tan) y testigo fitopatógeno (Tf). Se inocularon en placas de PDA de 90 x 15 mm con el antagonista (Hc), colocando un inóculo de 4 mm de diámetro a 1 cm en la periferia de la placa con cuatro días de crecimiento; se incubó a 25°C en completa oscuridad. A los cuatro días posteriores se colocó de forma equidistante en cada una de las placas un inóculo del hongo fitopatógeno (Rs) a 1 cm de la otra periferia de la placa, con un día de crecimiento; se incubaron a 25°C en completa oscuridad. Este procedimiento se realizó con tres réplicas junto con un testigo tanto para el antagonista como para el fitopatógeno. Los tratamientos testigo consistieron en placas con medio de cultivo PDA solo con un disco de micelio de 4 mm de diámetro para cada uno, colocándolo a 1 cm de la periferia de la placa (Guigón & Gonzales, 2004; Arguelles et al. 2017).

5.3.1 Variables evaluadas

Se midió en mm cada 24 h el crecimiento micelial de cada organismo en todos los ensayos; en cuanto entraron en contacto las hifas de ambos organismos confrontados, se procedió a calcular el porcentaje en la reducción del crecimiento micelial (PRCM) del antagonista hacia el fitopatógeno. Posteriormente se dejaron pasar 240 h de la confrontación para observar el comportamiento presentado, calculándolo con base a la escala propuesta por Bell (Gamboa, 2017). Para el cálculo del porcentaje en la reducción del crecimiento micelial (PRCM) se utilizó la siguiente fórmula:

$$PRCM = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Dónde:

A: Es el crecimiento radial del fitopatógeno testigo

B: Es el crecimiento radial del fitopatógeno junto con el antagonista.

5.3.2 Determinación de la capacidad antagónica

A las 240 h después de haberse llevado a cabo la confrontación dual entre antagonista-fitopatógeno, se evaluó la capacidad antagónica de los ensayos utilizando la escala propuesta por Bell et al. (1982) de los 5 grados, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Escala para evaluar la capacidad antagónica.

Valor	Descripción
1	El antagonista sobrecrece al fitopatógeno ocupando el 100% de la placa
2	El antagonista sobrecrece al fitopatógeno inhibiéndolo y ocupando el 75% de la placa
3	Fitopatógeno y antagonista crecen 50% deteniendo ambos su crecimiento
4	El fitopatógeno crece más de 75% entremezclándose con el antagonista e inhibiéndolo
5	El fitopatógeno crece en toda la placa deteniendo al antagonista

5.4 Pruebas de micoparasitismo

Para observar el comportamiento de la confrontación del antagonista sobre el fitopatógeno se llevó a cabo la evaluación *in vitro* siguiendo como referencia la técnica de microcultivos de Ridell (Gamboa, 2017). Esta técnica consistió en colocar dentro de una placa papel filtro, una varilla de vidrio y sobre ella un portaobjetos (todo el material estéril) sobre el cual se colocaron dos fragmentos de 10 mm² de PDA a una distancia entre ellos de 10 mm. Sobre uno de los fragmentos de agar se inoculó por picadura una porción de micelio del antagonista y sobre el otro fragmento de agar una porción de micelio del fitopatógeno. Para mantener la humedad se adicionaron 5 mL de agua

estéril sobre el papel filtro. Las placas se incubaron a 25°C realizando tres replicas (Figura 8).

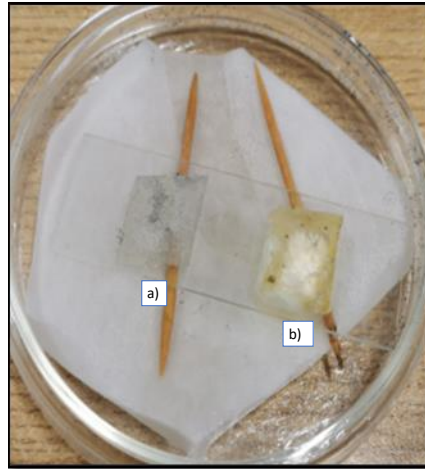


Figura 8. Microcultivo de Ridell a) Fragmento de *R. stolonifer* y b) Fragmento de *H. coffeata*. Fuente: Propiedad del autor del presente estudio

Posteriormente se realizaron observaciones en el microscopio estereoscópico cada 24 h, hasta observar la interacción de las hifas de ambos microorganismos. Cuando se observó la interacción de las hifas de ambos (Figura 9), el portaobjetos fue retirado de las placas, los fragmentos de PDA fueron cuidadosamente retirados y se adicionó una gota de ácido láctico, para posteriormente ser observados al microscopio óptico a 10x, 40x y 100x. La evaluación microscópica consistió en observar e identificar deformación, enrollamiento, penetración o lisis del micelio del fitopatógeno provocado por el antagonista (Howell, 2003).

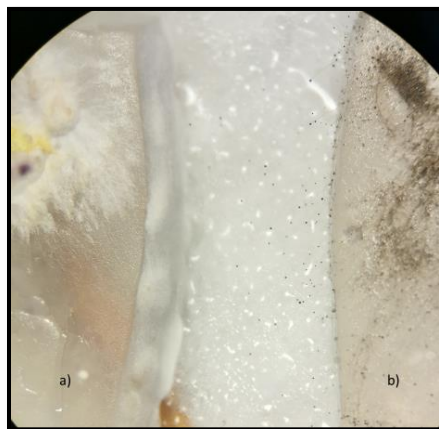


Figura 9. Hifas sobresaliendo de los fragmentos de PDA a) *H. coffeata* y b) *R. stolonifer*. Fuente: Propiedad del autor del presente estudio.

5.5 Caldo antifúngico

Se llevó a cabo el método de cultivo y otro de co-cultivo descrito por Maldonado-Zuñiga et al. (2014) con algunas modificaciones; las cuales consistieron en la realización de un cultivo en medio líquido con (g/L): 0.5 de $MgSO_4$; 1 de $KH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0.01 de $FeSO_4$; 0.73 de urea; 5 de puré de papa comercial en polvo y 10 de sacarosa. Todo se colocó en matraces con capacidad de 125 mL con 75 mL del medio de cultivo preparado, se llevó a esterilizar a $120^\circ C$ durante 20 min. De este preparado se realizaron tres distintos tipos de ensayos llamados CH, HR y HB (Figura 10); los cuales, consistieron en lo siguiente:

CH: Medio de cultivo basal más la adición de dos inóculos de 9 mm de diámetro de PDA con el hongo *H. coffeata* con siete días de crecimiento.

HR: Medio de cultivo basal más la adición de dos inóculos de 9 mm de diámetro de PDA con el hongo *H. coffeata* con siete días de crecimiento, todo se colocó en una incubadora orbital a una agitación de 100 rpm a $25^\circ C$ en completa oscuridad. Posteriormente a los tres días de crecimiento, se adicionaron a cada uno de los matraces dos inóculos de 9 mm de diámetro de PDA con el hongo *R. stolonifer* con un día de crecimiento.

HB: Para la preparación de este medio de cultivo se necesitó primero producir biomasa fúngica de *R. stolonifer*, para ello, se preparó un medio de cultivo basal en matraces con capacidad de 125 mL, con 75 mL del medio de cultivo esterilizado a 120°C durante 20 min. Cada matraz fue adicionado con tres inóculos de 9 mm de diámetro con el hongo *R. stolonifer*, con un día de crecimiento, realizando 10 réplicas. Se dejó crecer durante tres días hasta observar un notable crecimiento y se extrajo la biomasa producida con la ayuda de papel filtro para después ser almacenado en una cámara de secado a 30°C durante dos días hasta notar que la biomasa había perdido total humedad, realizado esto, se procedió al preparado del medio liquido HB en donde se utilizó un medio de cultivo basal más la adición de dos inóculos de 9 mm de diámetro de PDA con el hongo *H. coffeata* con siete días de crecimiento, más biomasa fúngica de *R. stolonifer* al 1%.

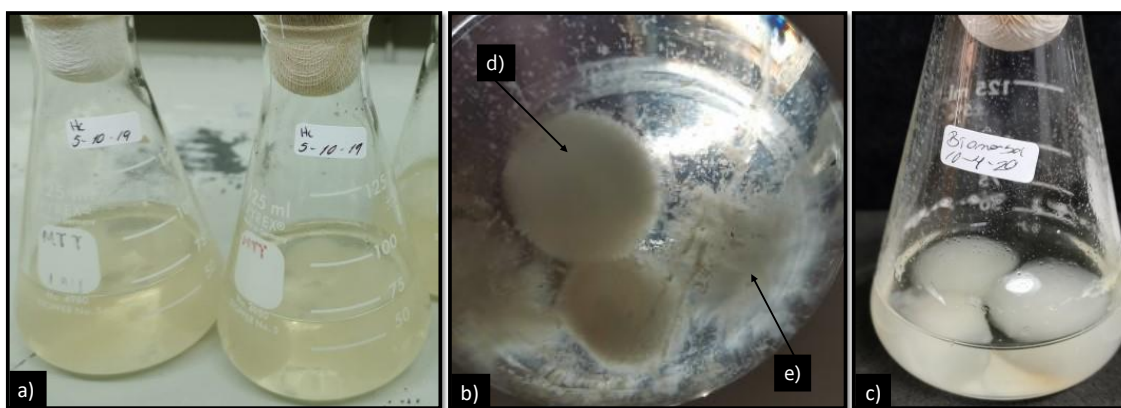


Figura 10. Caldos de cultivo a) CH, b) HR, c) HB, d) *H. coffeata* y e) *R. stolonifer*. Fuente: Propiedad del autor del presente estudio.

Se realizaron 12 réplicas de los tres distintos medios de cultivo preparados (CH, HR y HB) y se colocaron en incubadora orbital en agitación de 100 rpm a 25°C en completa oscuridad.

La extracción se llevó a cabo cada 120 h por cuatro ocasiones, tomando tres matraces de cada caldo de cultivo y extrayendo la parte líquida con la ayuda de papel Whatman grado 2. Posteriormente el líquido se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min.

5.5.1 Evaluación antifúngica de los caldos de cultivo

Se evaluó la actividad antifúngica de los caldos de cultivo producidos (CH, HR y HB) contra el organismo fitopatógeno (Rs), para ello, se realizó el método de difusión en agar, tomando muestras de los caldos y diferentes concentraciones (5%, 10% y 20%) fueron incorporadas en 10 ml en placas de 50x15 mm con PDA, más un testigo de solo PDA (Ochoa et al., 2012). A cada placa se le colocó en el centro un fragmento de PDA con *R. stolonifer* de 4 mm diámetro con un día de crecimiento. Las placas fueron incubadas a 25°C en completa oscuridad y revisando cada 24 h el crecimiento micelial hasta que el crecimiento del micelio del fitopatógeno en la placa testigo invadió completamente esta, midiendo diariamente con un vernier en mm.

El porcentaje en la reducción del crecimiento micelial (PRCM) se determinó usando la siguiente formula (Ochoa et al., 2012):

$$\% \text{Reducción} = (\text{crecimiento micelial del testigo} - \text{crecimiento micelial del tratamiento} / \text{crecimiento micelial del testigo}) \times 100$$

5.6 Diseño estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza al azar (ANOVA) y la prueba de diferenciación de medias por el método de Tukey.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1 Pruebas de antagonismo

Este método permitió corroborar que Hc tiene un efecto sobre el crecimiento del fitopatógeno (Rs). Evaluando el porcentaje en la reducción del crecimiento micelial (PRCM) se obtuvo un valor de 45.24%, a pesar de que *R. stolonifer* es 40 veces más veloz que *H. coffeata* (velocidad de crecimiento de los testigos; Tabla 4; Figura 11).

Tabla 4. Resultados obtenidos en el antagonismo.

Cepa	<i>Humphreya coffeata</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
*VC cm/h	0.0224	0.9722
†PRCM %	45.24	0

*VC: Velocidad de crecimiento de los testigos

†PICR: Porcentaje en la reducción micelial.

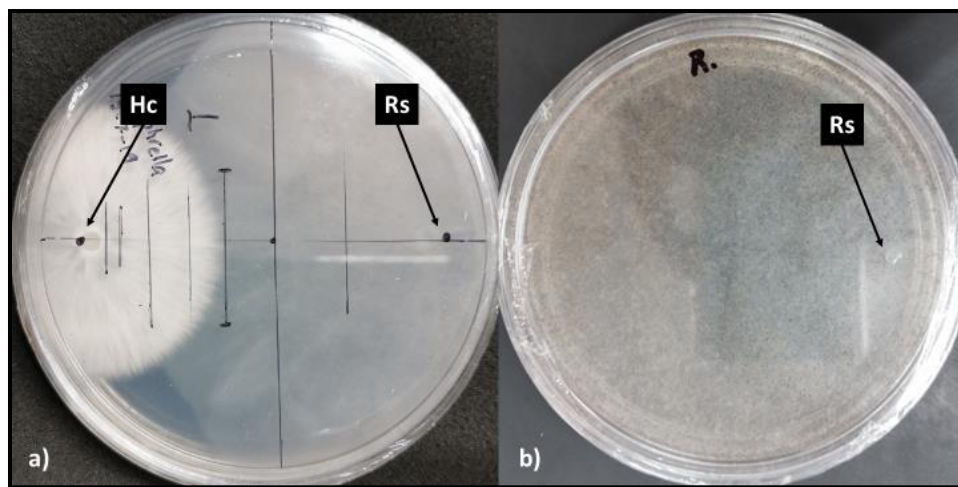


Figura 11. Antagonismo después de 72 h de la confrontación. **a)** *H. coffeata* y *R. stolonifer*, **b)** *Rhizopus stolonifer* (Testigo).

6.1.1 Determinación de la capacidad antagonista

El método de los 5 grados propuesta por Bell et al. (1982) nos permitió observar la capacidad antagonista de las confrontaciones duales, donde, *H. coffeata* presentó el grado 1; esto menciona que el antagonista (Hc) logró invadir toda la placa, creciendo sobre el fitopatógeno (Rs) y eliminándolo (Figura 12).

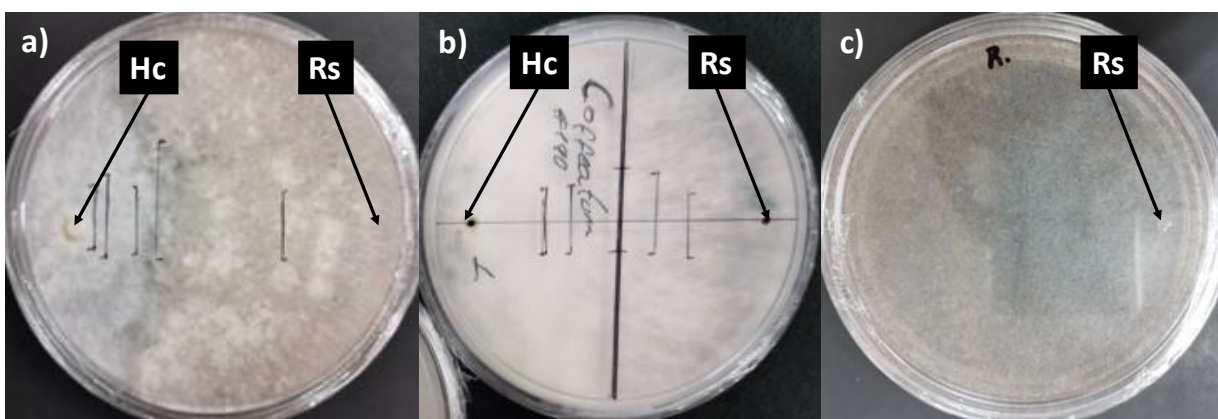


Figura 12. Antagonismo después de las 240 h de haber entrado en contacto ambos organismos. **a)** *H. coffeata* y *R. stolonifer*, **b)** *H. coffeata* y *R. stolonifer* (parte trasera) y **c)** *R. stolonifer* (Testigo).

6.2 Observaciones en el microscopio

Después de observar el comportamiento del antagonismo, los resultados obtenidos indicaron que el mecanismo de acción del antagonista (Hc) fue micoparasitismo, ya que no presentó un halo de inhibición entre el antagonista y fitopatógeno (antibiosis) y tampoco se detuvieron al momento de encontrarse (competencia), únicamente se observó la formación de una franja por parte del antagonista (Hs) y la invasión total hacia el fitopatógeno en toda la placa como lo indica el grado 1 de la escala de Bell.

Mediante la prueba de Ridell se corroboró este mecanismo de acción ya que las hifas del antagonista miden entre 2.5-4 μm de diámetro, mientras que las del fitopatógeno miden de entre 6-15 μm de diámetro (Valenzuela & Chacón-Jiménez, 1991; Medeiros-

Nóbrega, 2013). Como se puede observar en la Figura 16, el antagonista (Hc) enrolló al fitopatógeno (Rs) cubriendo totalmente las hifas de este.

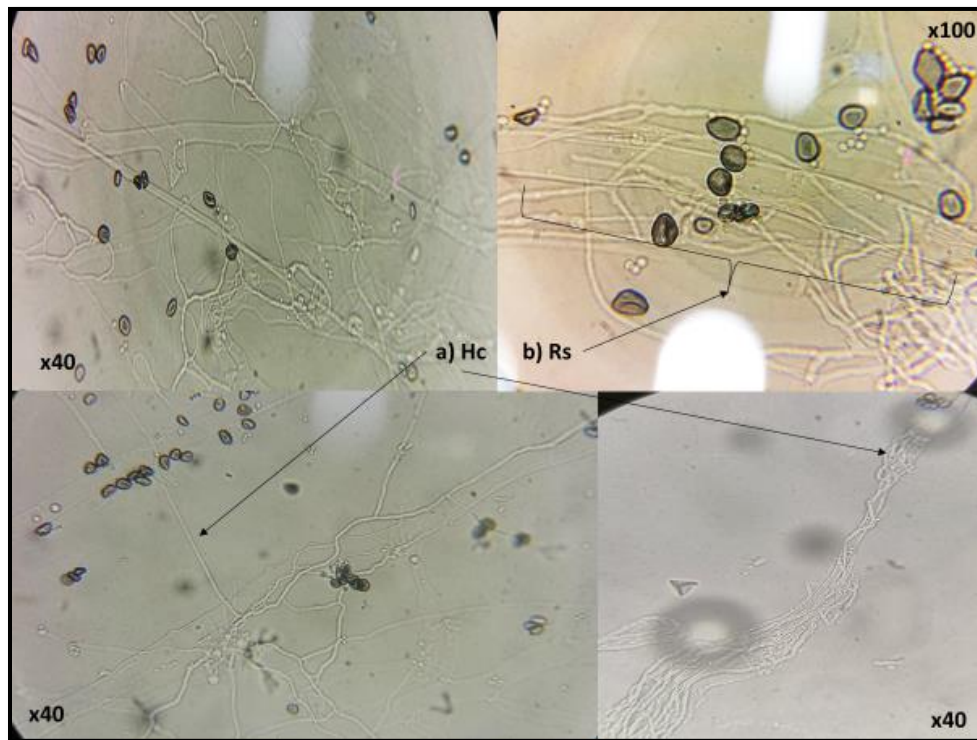


Figura 13. Micoparasitismo de Hc. **a)** *H. coffeata* **b)** *R. stolonifer*.

Este tipo de análisis ayudó a determinar que existe el mecanismo de acción del micoparasitismo, por lo que en los métodos realizados para la obtención de CH, HR y HB ayudó a producir en los caldos de cultivo los metabolitos secundarios que produce el antagonista (Hc) para controlar al hongo fitopatógeno (Rs); ya que, en el micoparasitismo el antagonista debe secretar algún componente como quitinasas o inhibidores de la síntesis de glucanos como triterpenoides que inhiben el crecimiento o buen desarrollo del fitopatógeno. Esto es debido a que la pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos está compuesta principalmente por glucanos y quitina, además, los triterpenoides son especialmente encontrados en el género *Ganoderma* en donde *H. coffeata* comparte gran similitud (Gallego & García, 2009).

6.3 Efecto antifúngico de los caldos de cultivo

Los resultados obtenidos en este método ayudaron a identificar la actividad antifúngica de los caldos de cultivo producidos (CH, HR y HB) en las distintas concentraciones (5%, 10% y 20%) después de 48 h de incubación los cuales fueron suficientes para que el testigo invadiera y esporulara en toda la placa.

El caldo de cultivo del medio CH (Tabla 5 y Figura 14) mostró una reducción en el crecimiento micelial hacia el fitopatógeno (Rs) del 4.43 al 28.61%; siendo los de mayor porcentaje los ensayos correspondientes al 5%, 10% (15 días) y el de 20% (5 días) con un 28.25%, 28.61% y 26.08% respectivamente. Por otro lado, los ensayos correspondientes al 5%, 10% y 20% (10 días) no redujeron el crecimiento del fitopatógeno (Rs) al igual que los ensayos con el 5%, 10% y 20% (20 días).

Respecto a la esporulación, en comparación con el testigo se obtuvieron resultados que van de 1-3 días de retardo. El caldo del 20% (20 días) retardó 3 días la esporulación, los caldos con el 5%, 10% y 20% (10 días) retardaron 1, 2 y 2 días, seguido con el 10% (15 días) y 10% (20 días) con 1 y 2 días respectivamente. Los ensayos 5%, 10%, 20% (5 días), 5% (15 días), 20% (15 días) y 5% (20 días) no lograron retardar la esporulación.

Tabla 5. Efecto del caldo de cultivo CH sobre el crecimiento en Rs a las 48h.

¶Días	†Concentraciones %	‡‡Vc	*Crecimiento	PRCM	Retardo en la esporulación (días)
5	5	0.453	21.74	5.43	0
	10	0.423	20.34	4.43	0
	20	0.354	17	26.08	0
10	5	0.479	23	0	1
	10	0.479	23	0	2
	20	0.479	23	0	2
15	5	0.342	16.41	28.25	0
	10	0.342	16.41	28.61	1
	20	0.368	17.70	23.18	0
20	5	0.479	23	0	0
	10	0.479	23	0	2
	20	0.479	23	0	3
Testigo	-	0.479	23	-	0

¶Días transcurridos de los caldos en incubadora. †Concentración del caldo adicionado a la placa ‡‡Vc: Velocidad de crecimiento de Rs en mm/h. *Crecimiento de Rs a las 48h en mm (radio). **Porcentaje en la reducción del crecimiento micelial.

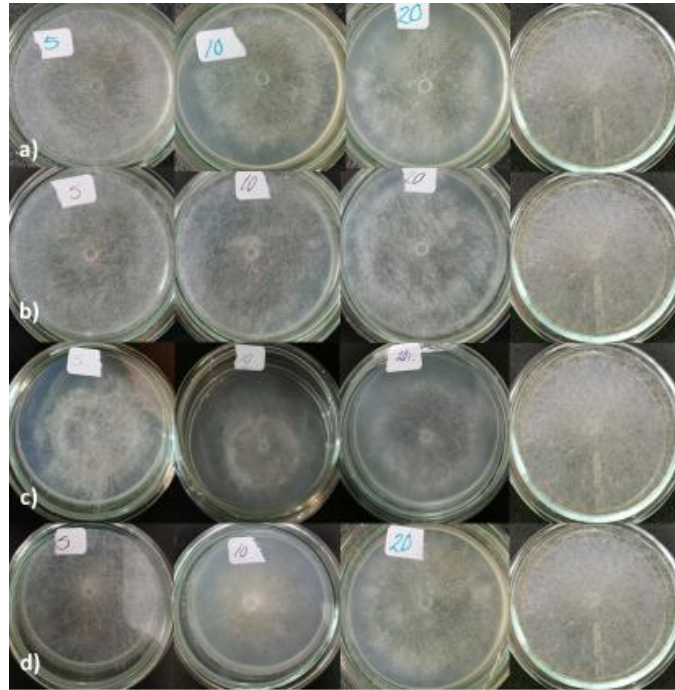


Figura 14. Crecimiento de Rs sobre el medio de cultivo CH a las 48h. **a)** 5%, 10%, 20% y testigo (5 días), **b)** 5%, 10%, 20% y testigo (10 días), **c)** 5%, 10%, 20% y testigo (15 días) y **d)** 5%, 10%, 20% y testigo (20 días).

En cuanto a los resultados correspondientes al caldo de cultivo HR (Tabla 6 y Figura 15) los resultados obtenidos determinaron que se presentaron porcentajes en la reducción crecimiento micelial que van desde 1.81-39.49%, siendo los más altos los ensayos con las concentraciones del 20% (5 días) y 20% (10 días) con un 39.49%, estando entre los más bajos las concentraciones con el 10% (15 días) con un 1.81%, seguido del 5% y 20% (15 días) con un 3.62% y 6.52%.

En cuanto al retardo en la esporulación presentada en comparación con el testigo se obtuvieron resultados que van de 1-3 días, estando entre los de mayor retardo las concentraciones del 10% y 20% (5 días) con 3 días, seguido de 20% (10 días), 10% (15 días) y 20% (15 días) con 2 días de retardo, 10% y 20% (20 días) solo con 1 día de retardo, los ensayos restantes no lograron retardar la esporularon.

Tabla 6. Efecto del caldo de cultivo HR sobre el crecimiento en Rs a las 48h.

¶Días	†Concentraciones en %	††Vc	*Crecimiento	PRCM	Retardo en la esporulación (días)
5	5	0.357	17.13	25.35	0
	10	0.321	15.40	32.96	3
	20	0.282	13.53	39.49	3
10	5	0.393	18.86	24.63	0
	10	0.310	14.91	34.05	0
	20	0.282	13.53	39.49	2
15	5	0.461	22.12	3.62	0
	10	0.478	22.97	1.81	2
	20	0.447	21.50	6.52	2
20	5	0.300	14.42	37.31	0
	10	0.315	15.16	34.05	1
	20	0.350	16.80	26.81	1
Testigo	-	0.479	23	-	0

¶Días transcurridos de los caldos en incubadora. †Concentración de caldo adicionado a la placa ††Vc: Velocidad de crecimiento de Rs en mm/h. *Crecimiento de Rs a las 48h en mm (radio). ** Porcentaje en la reducción del crecimiento micelial de Rs.

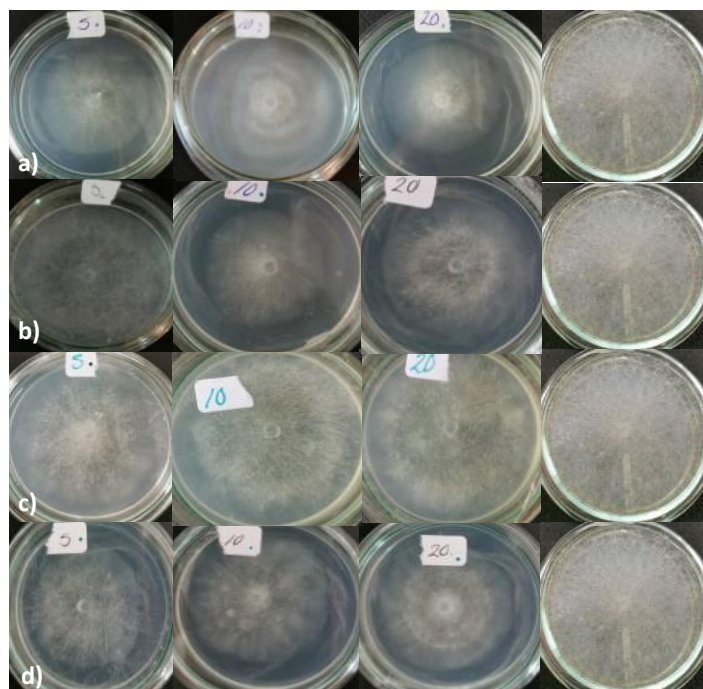


Figura 15. Crecimiento de Rs sobre el medio de cultivo HR a las 48h. **a)** 5%, 10%, 20% y testigo (5 días), **b)** 5%, 10%, 20% y testigo (10 días), **c)** 5%, 10%, 20% y testigo (15 días) y **d)** 5%, 10%, 20% y testigo (20 días).

Los resultados obtenidos del caldo HB (Tabla 7 Figura 16) los porcentajes en la reducción del crecimiento micelial van desde el 4.70-47.81%, siendo el más alto el porcentaje correspondiente al 20% (10 días) con un 47.81%, seguido del 5% y 10% (10 días) con 30.79% y 35.14%, estando entre los más bajos el correspondiente al 20% (5 días) con un 4.70% de reducción en el crecimiento.

En cuanto al retardo en la esporulación se obtuvieron resultados que van desde 1 a 3 días, siendo el más alto el porcentaje correspondiente al 20% (5 días) con 3 días de retardo, seguido con los ensayos de 10% (5 días) y 20% (15 días) con 2 días de retardo, posteriormente los ensayos con el 10%, 20% (10 días), 10% (15 días) y 10%, 20% (20 días) solo con 1 día de retardo, los ensayos restantes no lograron retardar la esporularon.

Tabla 7. Efecto del caldo de cultivo HB sobre el crecimiento en Rs a las 48h.

¶Días	†Concentraciones en %	††Vc	*Crecimiento	PRCM	Retardo en la esporulación (días)
5	5	0.420	20.43	12.31	0
	10	0.457	21.93	5.42	2
	20	0.466	22.37	4.70	3
10	5	0.321	15.41	32.97	0
	10	0.311	14.95	35.14	1
	20	0.241	11.61	47.81	1
15	5	0.479	23	0	0
	10	0.427	21.66	5.79	1
	20	0.446	21.42	6.88	2
20	5	0.479	23	0	0
	10	0.479	23	0	1
	20	0.479	23	0	1
Testigo	-	0.479	23	-	0

Días transcurridos de los caldos en incubadora. †Concentración de caldo adicionado a la placa. ††Vc: Velocidad de crecimiento de Rs en mm/h. *Crecimiento de Rs a las 48h en mm (radio). ** Porcentaje en la reducción del crecimiento micelial de Rs.

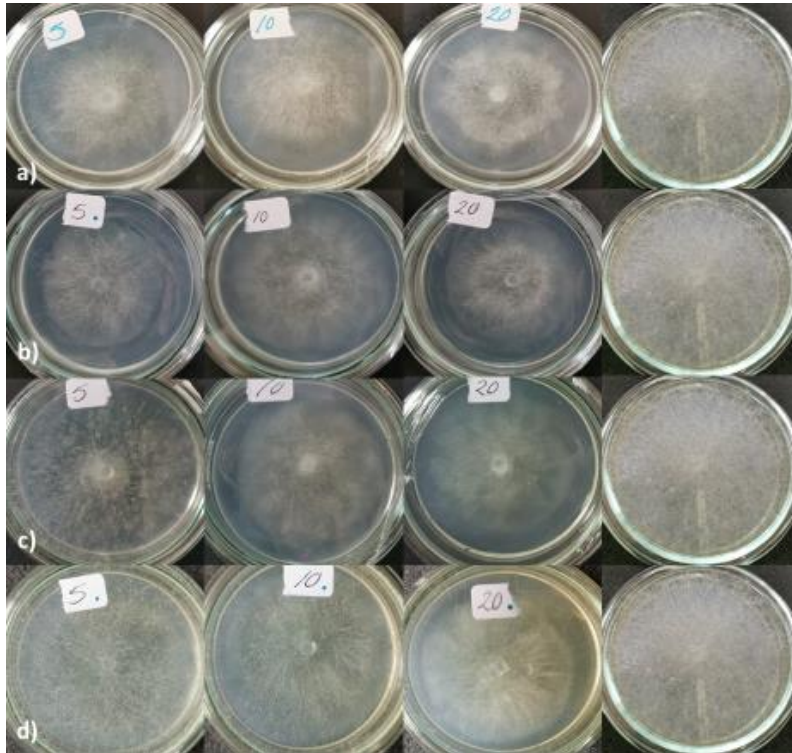


Figura 16. Crecimiento de Rs sobre el medio de cultivo HB a las 48h. **a)** 5%, 10%, 20% y testigo (5 días), **b)** 5%, 10%, 20% y testigo (10 días), **c)** 5%, 10%, 20% y testigo (15 días) y **d)** 5%, 10%, 20% y testigo (20 días).

Posteriormente se realizó un ANOVA completamente al azar de todos los ensayos de los caldos de cultivo sobre el porcentaje en la reducción del crecimiento micelial hacia el fitopatógeno (Rs; Tabla 8). Por lo que se puede observar, los porcentajes más altos de reducción corresponden al caldo HB 20% (10 días) con un 47.81%, con un día en el retardo de la esporulación, seguido del caldo HR 20% (10 días) y 20% (5 días) con un 39.49% para ambos; sin embargo, el ensayo 20% (5 días) fue el tratamiento que presentó más días en el retardo de la esporulación (tres días de retardo).

Tabla 8. Comparación del PRCM de los tres caldos de cultivo (CH, HR y HB).

Caldo	Días-Concentración	*PRCM	#DE±
HB	10-20%	47.81000 ^a	5.0482
HR	5-20%	39.49270 ^b	1.6603
HR	10-20%	39.49270 ^b	1.6603
HR	20-5%	37.36260 ^b	2.5861
HB	10-10%	35.14490 ^{bc}	0.6275
HR	20-10%	34.06590 ^{bcd}	4.4066
HR	10-10%	34.05793 ^{bcd}	0.6275
HB	10-5%	32.97093 ^{bcde}	0.6275
HR	5-10%	32.97093 ^{bcde}	4.3928
CH	15-10%	28.62310 ^{cdef}	5.1367
CH	15-5%	28.26083 ^{cdef}	3.919
HR	20-20%	26.81157 ^{def}	0.3818
CH	5-20%	26.08693 ^{ef}	2.8758
HR	5-5%	25.36227 ^{ef}	4.981
HR	10-5%	24.63763 ^f	1.2551
CH	15-20%	23.18837 ^f	2.5102
HB	5-5%	12.31877 ^g	1.2551
HB	15-20%	6.88400 ^{gh}	0.6275
HR	15-20%	6.52170 ^{gh}	2.1739
HB	15-10%	5.79703 ^{gh}	3.1377
CH	5-5%	5.43477 ^{gh}	4.981
HB	5-10%	5.43473 ^{gh}	1.8826
HB	5-20%	4.71007 ^{gh}	1.2551
CH	5-10%	4.43000 ^h	0.4764
HR	15-5%	3.62313 ^h	3.8172
HR	15-10%	1.81157 ^h	1.6603
CH	10-5%	0.00000 ^h	0
CH	10-10%	0.00000 ^h	0
CH	10-20%	0.00000 ^h	0
CH	20-10%	0.00000 ^h	0
HB	20-20%	0.00000 ^h	0
HB	20-10%	0.00000 ^h	0
CH	20-5%	0.00000 ^h	0

*Porcentaje en la reducción del crecimiento micelial de Rs. #Desviación estándar. Análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$), medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

Los métodos desarrollados para determinar el aislamiento e identificación de productos naturales con diferentes propiedades como antifúngicas, antibacterianas o nematocidas; impulsan a las industrias y hacen que el uso de los productos naturales crezca cada día más. Se han aislado miles de productos naturales obtenidos de distintas fuentes, de las cuales, los hongos siguen ofreciendo grandes oportunidades para su obtención, otorgando así grandes posibilidades para la producción de nuevas estructuras con actividades biológicas. Los hongos basidiomicetos presentan una gran capacidad para la producción de metabolitos con actividad biológica. Los metabolitos producidos por estos hongos abarcan desde enzimas, reguladores de crecimiento hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales y nematocidas (Brizuela et al., 1998). Los compuestos que los basidiomicetos producen se han encontrado en el micelio, cuerpo fructífero y en el caldo de cultivo. El cultivo líquido de basidiomicetos son una buena fuente para la obtención de sustancias con actividades antifúngicas. Esta cualidad puede definir la función de un hongo como antagonista de hongos fitopatógenos (Gross & Asther, 1989).

Dentro de los hongos basidiomicetos con un gran potencial para la producción de metabolitos con distintas propiedades se encuentra *Ganoderma lucidum*. A este organismo se le ha caracterizado por contar con una amplia gama de metabolitos con propiedades medicinales, de las cuales, también se encuentran las antifúngicas (Arias & Camilo, 2010). *H. coffeata* ha sido descrito como un hongo con gran similitud taxonómica con *G. lucidum*, además, estudios realizados por Agapito-Ocampo, (2019) demostró que, con el uso de recubrimientos comestibles a partir de polisacáridos extraídos de este hongo, es posible extender la vida útil de fresas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. Estas características sugieren que *H. coffeata* tendría también la capacidad de producir metabolitos con actividad biológica como la antifúngica, logrando con ello, la capacidad de descubrir nuevos componentes en condiciones controladas (Yuen & Gohel, 2005).

La confrontación dual ha sido utilizada ampliamente para determinar que organismo juega el papel de antagonista. Este método permite observar distintos comportamientos entre los organismos confrontados; en el caso de los hongos se puede observar la secreción de compuestos antimicrobiales (antibiosis), lucha por los nutrientes y espacio (competencia), la utilización de un hongo patógeno como alimento por su antagonista (micoparasitismo) o también la combinación de estos (Fernández-Larrea, 2001).

Guédez et al. (2009) utilizaron al hongo *Trichoderma harzianum* como antagonista contra el mismo fitopatógeno estudiado en este trabajo (*R. stolonifer*); estos organismos entraron en contacto a la 96 h de haberse cultivado y obtuvieron un porcentaje en la reducción del crecimiento micelial del 62% sobre *R. stolonifer*; esto indica que el hongo utilizado en este trabajo como antagonista tiene menor capacidad en la reducción del crecimiento micelial hacia *R. stolonifer*, sin embargo, se debe considerar que *T. harzianum* se le conoce como un hongo antagonista de diversos hongos fitopatógenos ya que cuenta con características favorables como rápido crecimiento y es adaptable al medio ambiente.

Sin embargo, Morales-Mora et al. (2020) reportaron un 28% de reducción en el crecimiento micelial, hacia *R. stolonifer* utilizando al mismo organismo antagonista (*T. harzianum*), lo cual resulta ser menor a lo reportado por Guédez et al. (2009) al igual que lo reportado en este trabajo. Esto puede ser debido a que las cepas son distintas o no se controlaron las condiciones de humedad lo cual no se reporta en ambos casos. Aun con esto, es importante considerar a *H. coffeata* como un antagonista de este fitopatógeno debido a que no existen casos de trabajos reportados sobre este hongo con dicho potencial.

La escala propuesta por Bell et al. (1982), ayuda a determinar la capacidad antagónica que tiene un organismo hacia otro; este método es usado comúnmente después de haber observado la reducción en el crecimiento micelial; posterior a esto, los

organismos confrontados siguen manteniéndose durante 10 días más en incubación bajo las mismas condiciones (temperatura y completa oscuridad) en el mismo sitio.

Mutlag et al. (2018) utilizaron al hongo *Pleurotus ostreatus* como antagonista hacia aislados de hongos fitopatógenos en los que se encontraba de *Rhizopus* sp. Estos investigadores realizaron el método de confrontación dual en PDA colocando en el centro al antagonista y alrededor de este a *Rhizopus* sp. incubándolos a 25°C durante 72 h. No analizaron el porcentaje de reducción micelial, solo observaron la capacidad antifúngica de *P. ostreatus* hacia el fitopatógeno (*Rhizopus* sp.), notando que el antagonista cubrió 2/3 partes de la placa y el fitopatógeno solo 1/3. En este trabajo los organismos confrontados se colocaron separados uno del otro a 10 mm de la periferia de la placa con PDA en incubación a 25°C y se logró observar que *H. coffeata* al momento de entrar en contacto con *R. stolonifer* género una barrera micelial y a los 10 días posteriores cubrió totalmente la placa, sobrecreciendo en el fitopatógeno (Rs). Este comportamiento determinó que se obtuvo un grado 1 en la escala propuesta por Bell et al. (1982). En este trabajo, se obtuvo el mayor grado de capacidad antagónica que a lo reportados por Morales-Mora et al. (2020) donde utilizaron como antagonista a *T. harzianum* una cepa aislada de la raíz de *Persea americana*; realizaron la confrontación dual por triplicado en PDA, evaluando la capacidad antagónica basada en la escala propuesta por Bell et al. (1982), incubándolos por un periodo de siete a 10 días; obteniendo un grado 4 y lo describen mencionando que el hongo fitopatógeno creció al menos 2/3 partes del medio, resistiendo así, la invasión de *T. harzianum*. Esto evidencia la capacidad antagónica con la que cuenta *H. coffeata* hacia *R. stolonifer* ya que el número de días en incubación fue similar a la evaluada en este trabajo.

En las cepas de género *Trichoderma*, se han presentado variaciones relacionadas con su habilidad de realizar micoparasitismo como mecanismo de acción. El micoparasitismo es el proceso mediante el cual, las hifas del antagonista enrollan y/o penetran en el micelio del hospedero produciendo la degradación de su pared celular (Saba et al.,

2012). Dicho mecanismo ha sido reportado por Guédez et al. (2009) donde a las 96 h de la confrontación dual entre *T. barzianum* y diversos fitopatógenos, tomaron una porción de los hongos con parte de medio de cultivo en la franja de la confrontación; esta se colocó en un portaobjetos, se colocó una gota de azul de algodón y se observó al microscopio el mecanismo de acción del antagonista. Ellos observaron que las hifas de *T. barzianum* cubrieron a las hifas del hongo fitopatógeno, alimentándose de él y degradando su micelio.

Arjona (2015) realizó otro método distinto para determinar la presencia de micoparasitismo utilizando a *Trichoderma* sp. hacia *Rosellina necatrix*. Para este estudio, realizó un marcaje diferencial de los dos hongos a estudiar, transformando los micelios fúngicos implicados con genes que expresaron proteínas con distinto espectro de emisión de fluorescencia (*R. necatrix* marcado con emisión de fluorescencia verde y *Trichoderma* spp. marcado con emisión de fluorescencia roja); observando bajo microscopio de fluorescencia determinaron que *Trichoderma* sp. realizó un micoparasitismo incipiente, mencionando esto porque no se observó enrollamiento de hifas de *Trichoderma* sp. sobre *R. necatrix*, ni formación de papilas de penetración (apresorios), solo se observó crecimiento quimiostático de las hifas de *Trichoderma* spp. paralelo a las hifas de *R. necatrix*. Este comportamiento podría ser debido al exudado de enzimas por parte del antagonista para degradar los componentes de la pared celular del patógeno y puedan ser usados por el antagonista como nutrientes.

En el presente trabajo se logró observar micoparasitismo de la cepa *H. coffeata* sobre el fitopatógeno *R. stolonifer*, debido a que el antagonista, aunque no generó estructuras penetrantes como apresorios, si enrolló el micelio del fitopatógeno degradándolo y generando su muerte. Uno de los factores a considerar para lograr observar el micoparasitismo, es el de conocer el tamaño de las hifas de ambos organismos. El diámetro de las hifas de *H. coffeata* es de 2.5-4 μ m, mientras que las del *R. stolonifer* miden de entre 6-15 μ m; esto facilitó la identificación de ambos organismos en el microscopio

y la determinación del mecanismo de acción (Valenzuela & Chacón-Jiménez, 1991; Medeiros-Nóbrega, 2013) Existen diversos métodos para determinar si el mecanismo de acción de un antagonista es el micoparasitismo, pero debido a que es un proceso complejo el cual incluye una serie de eventos tales como el reconocimiento del antagonista hacia el fitopatógeno, ataque, penetración y muerte celular; este comportamiento tiene que ir acompañado de secreciones enzimáticas extracelulares como celulasas, pectinasas, β -1-3-glucanasas y amilasas. La función de estas enzimas es el degradar los polisacáridos, quitinas y glucanos presentes en la pared celular de los hongos (Verma et al., 2007; Naglot et al., 2015).

La extracción de metabolitos producidos por un organismo es algo que despierta el interés de muchos investigadores debido a la capacidad en la actividad biológica que estos puedan presentar, en donde la preparación de medio de cultivo y el método de co-cultivo son muy usados para la extracción de metabolitos secundarios producidos por organismos antagonistas.

Maldonado Zúñiga et al. (2019) evaluaron el efecto antifúngico de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis*, sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*; para ello, realizaron dos tipos de cultivos. Al primer cultivo le llamaron cultivo individual el cual solo cultivaron en medio PD (papa dextrosa) a los antagonistas (*Trichoderma* sp. y *B. subtilis*) añadiendo 2 g del micelio desactivado del organismo a confrontar (*C. gloeosporioides*); se incubaron por 72 h con agitación constante a 180 rpm a una temperatura de 32 °C. En el segundo método (co-cultivo), el procedimiento se repitió solo que adicionalmente se agregaron 108 UFC de *B. subtilis* y en un embudo de separación añadieron el sobrenadante de los cultivos con el solvente acetato de etilo en una relación de volumen 1:1. Para la evaluación antifúngica utilizaron medio PDA suplementado con los caldos obtenidos a distintas concentraciones, arrojando porcentajes de reducción en el crecimiento micelial del 52% empleando los metabolitos producidos por *B. subtilis* a 150 μ g/mL, mientras que la cepa *Trichoderma* sp. alcanzó un 31 % de reducción del crecimiento de *C.*

gloeosporioides en el cultivo individual. El análisis de los metabolitos obtenidos del co-cultivo sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*, obtuvieron un máximo de 80%, a concentración de 450 µg/mL.

En el presente trabajo el método realizado fue similar ya que se realizaron tres distintos medios de cultivo, el primero inoculado con solo el antagonista *H. coffeata* (llamado CH), el segundo con inóculos del fitopatógeno vivo *R. stolonifer* y antagonista *H. coffeata* (llamado CR) y el tercero con micelio desactivado del fitopatógeno *R. stolonifer* y micelio vivo del antagonista *H. coffeata*. Todo se incubo a 25°C a una agitación de 100 rpm durante un total de 480 h analizando el efecto de estos medios cada 120 h.

Barrera-Necha & Bautista-Baños (2008) analizaron el efecto de extractos y polvos obtenidos de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *R. stolonifer*, donde no tuvieron algún efecto en extractos etanólicos y acuosos, pero sí en el extracto metanólico con un 46-94% de reducción en el crecimiento micelial. Esto puede deberse a que los metabolitos que *C. nocturnum* produce fueron tomados por el metanol debido a la polaridad de este elemento. Estos porcentajes fueron mayores a lo reportado ya que el mayor porcentaje de reducción por parte del medio HB fue de 47.81%; sin embargo, en comparación a los extractos acuosos y etanólicos sí se presentaron reducciones en el crecimiento micelial en los distintos medios de cultivo. Por otro lado, en los medios de cultivo (CH, HR y HB) se observó que el mayor PRCM se encuentra entre los 5 y 10 días, por lo que pudo deberse a que, en estos días, se encuentra la fase estacionaria de *H. coffeata* que es donde los metabolitos secundarios se producen.

En otras investigaciones utilizando aceites esenciales de dos tipos clonales de *Thymus vulgaris* (llamados Laval-1 y Laval-2), Bhaskara et al. (1998) determinaron el efecto antifúngico hacia *R. stolonifer* al cual lograron inhibir un 5,5-50,5% respectivamente por aceite de Laval-1, utilizando concentraciones de 50 a 200 ppm, mientras que para Laval-2 los valores de reducción en el crecimiento fueron de 11,5-65,8 %. Estos valores son

cercanos a los obtenidos en los tres medios de cultivo en donde se obtuvieron valores de 2.17-47.81% por lo que *H. coffeata* sí genera metabolitos en cultivo líquido y co-cultivo para controlan a *R. stolonifer*.

Este es el primer trabajo en el que se emplean medios de cultivo de *H. coffeata* para el control biológico del fitopatógeno *R. stolonifer* resaltando así la importancia que tienen los hongos basidiomicetos en la biotecnología.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIÓN

Se realizó la confrontación dual para determinar la capacidad antagónica de *H. coffeata* sobre *R. stolonifer*, para posteriormente elaborar los diferentes caldos de cultivo y someterlos a evaluación antifúngica contra *R. stolonifer*. El hongo *H. coffeata* resultó ser un antagonista efectivo contra *R. stolonifer*, realizando un micoparasitismo como mecanismo de acción. Los caldos de cultivo HB 20% (10 días), HR 20% (10 días) y 20% (5 días), presentaron los más altos porcentajes en la reducción del crecimiento micelial hacia *R. stolonifer*. Se puede considerar a *H. coffeata* como agente de control biológico contra *R. stolonifer* protegiendo a los productos hortofrutícolas, permitiendo sustituir el uso de fungicidas químicos, los cuales, son perjudiciales para el ambiente y la salud, mejorando así la calidad de los productos.

CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el micoparasitismo de *H. coffeata* sobre *R. stolonifer* utilizando un microscopio electrónico de barrido para observar más a detalle las hifas de ambos organismos.
- Evaluar la actividad antifúngica de los caldos (HC, HR y HB) *in vivo* aplicado a cultivos contra *R. stolonifer*, mediante el uso de recubrimientos comestibles suplementados con los caldos.
- Determinar qué moléculas están implicadas por *H. coffeata* en el control de *R. stolonifer*.

CAPÍTULO 10. LITERATURA CITADA

- Abdel-Mallek A. Y., S. K. Hemida & M. M. K. Bagy. 1995. Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathologia*. 130, 109-116.
- Agapito-Ocampo A. R. 2019. Elaboración de un recubrimiento comestible a partir del hongo *Humphreya coffeatum*. Tesis, Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México, 1-60.
- Agrios N. G. 1985. Fitopatología. Editorial Limusa. Primera Edición. México DF. 838.
- Alexopoulos C. J., C. W. Mims and M. Blackwell. 1996. Introductory Micology. John Wiley Sons, Inc. Fourt edition. New York, U.S.A. 865.
- Alfaro-Gutiérrez I. C. 2011. Cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:fr.) Vuill. Por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México, 1-65.
- Alvarado-Hernández A. M. 2011. Efecto antifúngico *in vitro* e *in situ* del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:fr.) Vuill. 29-30.
- Arguelles Uc A. K., J. Pérez Moreno, V. Ayala Escobar & E. Zavaleta Mejía, 2017. Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*). *Mex Jour Phyto*. 266-267.
- Arias N., & F. Camilo. 201. Evaluación de metabolitos secundarios del hongo *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a *Fusarium* spp. de interés clínico. Tesis, Licenciatura, Facultad de Ciencias de Biología D. C., Pontificia Universidad Javeriana. 8-25.
- Arias-Londoño M. A., P. A. Zapata-Ocampo, A. R. Mosquera-Arevalo, J. D. Sánchez-Torres & L. Atehortua-Garcés. 2019. Determinación de proteínas antifúngicas de cultivos sumergidos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae) con actividad sobre el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*. *Actual. Biol*. 41(111): 53-64.

- Arjona G. Ma. I. 2015. Proceso de infección de *Rosellinia necatrix* en aguacate y determinación del antagonismo (antibiosis y micoparasitismo) de *Trichoderma* spp., en el control biológico de la podredumbre blanca radicular. Tesis, Doctorado, Instituto de agricultura sostenible. Universidad de Córdoba. 1-139.
- Atencio JRP., C. R. R. Carballo, R. R. Ochoa, V. L. Lara & J. L. O. Medina. 2011. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Navisporus floccosus* y *Ganoderma* sp. contra hongos fitopatógenos. Fitosanidad, 15:123-128.
- Barrera-Necha L. L. & S. Bautista-Baños. 2008. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. Rev Mex Fito, 26(1), 27-31.
- Bautista-Baños S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 8(1), 1-6.
- Bautista-Baños S., M. G. Del Valle Velázquez, A. N. Lauzardo-Hernández & E. Barka Ait. 2008. The *Rhizopus stolonifer* - Tomato interaction. Plant Micro Interact. 269-289.
- Bell K., D. Wells & R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens”, Phytopathology. 72: 379-382.
- Benítez T., A. M. Rincón, M. C. Limón & A. C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249-260.
- Berovič M., J. Habijanič, I. Zore, B. Wraber, D. Hodzar, B. Boh, & Pohleven, F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. Journal of Biotechnology. 103: 77–86.
- Bhaskara M., P. Angers, A. Gosselin & J. Arul. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochem. 47(8); 1515-1520.
- Brizuela M. A., L. García, L. Pérez, & M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología. 15: 69-74.

- Cruz-Muños R. 2012. Producción de extractos de *Pycnoporus sanguineus* con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas. Tesis, Maestría, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politecnico Nacional, México D. F., 12-45.
- Cuevas Moreno J. A. 2016. Los hongos: Héroes y villanos de la prosperidad humana. Revista digital universitaria. 17(9), 2-10.
- De la Garza. 1996. Fitopatología general. Imprenta universitaria de la UANL, facultad de Agronomía Marín, N. L. 317-320.
- De Silva D. D., S. Rapior, E. Sudarman, M. Stadler, J. Xu, S. A. Alias & K. D. Hyde. 2013. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. Fungal Diversity, 62(1):1-40.
- Fernández-Larrea O. V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 62: 96-100.
- Fernández T., F. Cardoso, A. Stecca, R. Silva, R. Santos & C. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnol Letters 35:1461–1468.
- Fraire-Cordero Ma. L., Ma. J. Yáñez-Morales, D. Nieto-Ángel & G. Vázquez-Gálvez. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragraria x ananassa* Duch.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(3), 285-291.
- Gallego Giraldo S. & G. A. García Giraldo. 2009. Obtención de biomasa y exopolisacaridos de *Humphreya coffeata* en cultivo sumergido. Tesis, Licenciatura, Universidad EAFIT. Medellín.
- Gálvez Gamboa G.T., M. R. Sánchez Servín, F. Parra Cota, J. García Pereyra, G. N. Aviña Martínez & S. Santos Villalobos. 2018. Plaguicidas en la agricultura mexicana y potenciales alternativas sustentables para su sustitución. Rev Bio Agro Tuxpan. 7(11)1977-1991.
- Gamboa-Villa L. C. 2017. Selección de cepas nativas de *trichoderma* spp. para el control de *Fusarium sacchari* y *Fusarium andiyazi* causantes de la necrosis de las raíces en caña

- de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis, Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- García-Nieto D. A. 2020. Estudio del efecto antagónico de idiolitos bacterianos contra *Rhizopus stolonifer* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis, Maestría, Centro de investigación en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla pp. 1-53.
- Gross B. & M. Asther. 1989. Aromes de basidiomycetes: caractéristiques, analyses et productions. *Sci Alimts.* 9: 427-454.
- Gryganskyi A. P., J. Golan, S. Dolatabadi, S. Mondo, A. Idnurm, A. Muszewska, ... & J. E. Stajich. 2018. Phylogenetic and Phylogenomic De finition of *Rhizopus* Species. *Genes, Genomes, Enetics.* 2007–2018.
- Guédez C., L. Cañizález, C. Castillo & R. Olivar. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Rev Soc Ve Micro.* 29(1), 34-38.
- Guigón L.C. & González G.P.A. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Rev Mex Fito.* 22 (1), 117-124.
- Hernández-Lauzardo A.N., S. Bautista-Baños, M. G. Velázquez-del Valle & J. L. Trejo-Espino. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of Rhizopus Rot disease of fruits and vegetables. *Rev Mex Fito.* 24:65-69.
- Hincapie A. S., L. Martínez, Y. Tobón & V. Medellín. 2005. Diseño para la obtención de micelio y metabolitos de *Ganoderma lucidum* en un sistema de fermentación discontinuo. Trabajo de grado. Universidad EAFIT, Departamento de Ingeniería de Procesos. Área de Biotecnología.
- Howell C. R. 2003. Mecanismos employed by *Trichoderma* species in the Biological control of plant diseases. The history and evolution of current concepts. *Plant Disease.* 87(1): 4-10.
- Hung-Chan H., C. Chih-I, H. Chia-Nan, & L. Yung-Chuan. 2009. Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture. *Biop Bios Engin.* 32:217–224.

- Janisiewicz W. J. & L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*. 40: 411-441.
- Jong S., C. Birmingham, J. M. 1993. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Adv Appl Microbiol*. 39:153–84.
- Maldonado-Zúñiga E., J. M. Becerril Merlos, B. Correa Sánchez, R. Pérez-Pérez, M. N. Chávez Avilés. 2019. Evaluación de metabolitos antifúngicos obtenidos en medio PD mediante el cultivo y co-cultivo de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. *Seguridad Alimentaria*. 7-15.
- Martínez-Hernández E. 2017. Actividad antifúngica de extractos vegetales contra *Botrytis cinerea* en fresa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 7-8.
- Medeiros-Nóbrega F. 2013. Investigaçãõ da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae*. Tesis, Licenciatura, Universidad federal de Paraíba, JOÃO PESSOA.
- Mehmood A., G. Liu, X. Wang, G. Meng, C. Wang & Y. Lui. 2019. Fungal quorum-sensing molecules and inhibitors with potential antifungal activity: A review. *molecules*. 24(10): 1950.
- Michel-Aceves A. C., J. Hernández-Morales, R. Toledo-Aguilar, J. E. Sabino López & T. Romero-Rosales. 2019. Capacidad antagonica de *Trichoderma* spp. nativa contra *Phytophthora parasica* y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de jamaica. *Rev Fito Méx*. 42(3): 235 – 241.
- Moo-Koh F. A., J. Cristóbal-Alejo, A. Reyes-Ramírez, J. M. Tun-Suárez, R. Sandoval-Luna & J. A. Ramírez-Pool. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso del *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia*. 48(8): 833-845.
- Mutlag N. H., M. A. Sadeq, A. M. Hussein, & H. Rasim. 2018. Assessment of the effect of autoclaving of *Pleurotus ostreatus* filtrate on its pathogenicity and antagonistic ability. *Biochemical and Cellular Archives*. 18(2), 2095-2099.
- Molina-Mercader G., S. Zaldúan-Flores, G. González-Vargas, E. Sanfuentes-VonStowasser. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinérea* en viveros forestales en Chile. *BOSQUE* 27(2): 126-134.

- Morales-Mora L. A., P. Andrade-Hoyos, A. Valencia-de Ita & O. Romero-Arenas. 2020. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. Rev Mex Fito. Publicación anticipada en línea 1-16.
- Mulkay T., A. Paumier, M. Aranguren & O. Herrera. 2010. Diagnóstico de las enfermedades fungosas de mayor incidencia durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.), el mango (*Mangifera indica* L.) y el aguacate (*Persea americana* Miller) en tres localidades frutícolas de Cuba. Rev Citri. 27(2): 23-30.
- Naglot A., S. Goswami, I. Rahman, D. Shrimali, K. Yadav, K. Vikas, A. Rabha, H. Gogoi & V. Veer. 2015. Antagonistic potential of native *Trichoderma viride* strain against potent tea fungal pathogens in north east India. The Plant Pathology Journal. 31(3): 278-289.
- Niño J., J. Ospina, Y. M. Correa & O. M. Mosquera. 2007. Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Scientia et technica, 1:425-426.
- Ochoa Fuentes Y. M., E. Cerna Chávez, J. Landeros Flores, S. Hernández Camacho & J. C. Delgado Ortiz. 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. Rev Inter Bot. experimental. 81, 69-73.
- Pan J., A. R. Vicente, G. A. Martínez, A. R. Chaves & P. M. Civello. 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. Jour Sci Food Agr 84, 1831–1838.
- Plascencia-Tenorio R. I. 2011. Bacterias antagonicas aisladas de fresa, como controladoras de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa postcosecha. Tesis, Posgrado, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México.
- Plascencia-Tenorio R. I., V. Olalde-Portugal, H. G. Mena-Violante, L. F. Ceja-Torres, J. Venegas-González, G. Oyoque-Salcedo & M. V. Angoa-Pérez. 2012. Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Ra Ximhai, 8(3):103-110.

- Pontón J., D. Ma. Moragues, J. Gené, J. Guarro & G. Quindós. 2002. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Rev Ibero Mic.* 1-45.
- Porras-Arboleda S., M. Valdez-Cruz, B. Rojano, C. Aguilar, L. Rocha-Zavaleta, & Trujillo-Roldan, M. 2009. Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreyia coffeata* (Berk.) Stey. (Aphylophoromycetidae) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity. *Inter Jour Med Mushr.* 4: 11.
- Rhee S., J. Cho, S., Y. Kim, K., M. Cha, D., S. & Park, H. J. 2008. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble beta-glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *Lwt-Food Sci Technol.* 41:545-9.
- Reglero Rada G. 2011. Curso de análisis sensorial de los alimentos. 1-72.
- Rodríguez Villamil K. J. 2010. Evaluación de metabolitos de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a aislamientos humanos y animales de *Aspergillus* spp. y dermatofitos. Tesis, Licenciatura, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, 7-28.
- Rusell R. & M. Paterson. 2006. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67:1985-2001.
- Saba H., D. Vibhash, M. Manisha, K. S. Prashant, H. Farhan & A. Tauseef. 2012. *Trichoderma* a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere.* 3: 524-531.
- Sandargo B., C. Chepkirui, T. Cheng, L. Chaverra-Muñoz, B. Thongbai, M. Stadler, & S. Hüttel. 2019. Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotech Adv*, 37(6):107344.
- Santafé G. & J. Zuluaga. 2007. Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos de la familia Ganodermataceae del departamento de Córdoba. Montería. Proyecto de investigación. Universidad de Córdoba. Departamento de química. 1-49.
- Shahid A. A., M. Asif, M. Shahbaz & M. Ali. 2016. Antifungal potential of *Ganoderma lucidum* extract against plant pathogenic fungi of *Calendula Officinalis* L. 5th International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences. 1-5.

- Solorio P. A. 2000. Identificación de hongos fitopatógenos de frutos de fresa (*Fragaria sp.*) en postcosecha del Centro de Abastos de Zamora, Michoacán e Irapuato, Guanajuato. Tesis, Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 1-37.
- Spadaro D. & G. M. Lodovica. 2004. State of the art and future prospects of biological control of *postharvest fruti* diseases. *Internacional Jour Food Micro* 91: 185-194.
- Sun X., X. jin, W. Pan & J. Wang. 2014. Syntheses of new rare earth complexes with carboxymethylated polysaccharides and evaluation of their *in vitro* antifungal activities. *Carbo Poly.* 113, 194–199.
- Tang Y. J. L. W. Zhu, H. M. Li, & D. S. LI. 2007. Submerged culture of mushrooms in bioreactors challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Tech Biotech.* 45: 221–229.
- Teixeira da Silva J., Z. Rashid, D. Tan Nhut, D. Sivakumar, A. Gera, M. Teixeira, & P. Tennant. 2007. Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology Tree and Forestry Science and Biotechnology. Global Science Books. 1-27.
- Tripathi P. & N. Dubey. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Posth Bio Tech.* 32: 235-245.
- Valenzuela R. & S. Chacón-Jiménez. 1991. Los poliporáceos de México. III. Algunas especies de la reserva de la biosfera el cielo, Tamaulipas. *Rev Mex Mic.* 7, 39-70.
- Velázquez-del Valle M.G., S. Bautista-Baños & A. N. Hernández Lauzardo. 2007. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Rev Mex Fito.* 26(1): 49 – 55.
- Velázquez-del Valle M. G., S. Bautista-Baños, A. N. Hernández-Lauzardo, M. G. Guerra-Sánchez & E. Amora-Lazcano. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Rev Mex Fito.* 26(1): 49-55.
- Verma M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: *Pan Bio Ctrl. Bioch Engin Jour.* 37: 1-20.

- Wan-Mohtar W. A. A. Q. I., C. Viegemann, A. Klaus & S. A. Halim Lim. 2017. Antifungal-demelanizing properties and RAW264.7 macrophages stimulation of glucan sulfate from the mycelium of the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Food Sci Biotech.* 26(1): 159-165.
- Wang Y., Y. Bao, D. Shen, W. Feng, T. Yu, J. Zhang & X. D. Zheng. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *Inter Jour Food Micro*, 123(3): 234–239.
- Wilson Charles L., D. Franklin Jerry & Pusey Lawrence. 1986. Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Disease Ctr Pest Mgmt.* 77(2): 303-305.
- Yáñez Juárez M. G., F. Ayala Tafoya, L. Partida Ruvalcada, T. J. Velásquez Alcatraz, T. P. Godoy Aungulo & Días Valdés T. 2013. Efecto de bicarbonatos en el control, de cenicilla (*Oidium* sp.) en pepino (*Cocumis sativus* L.) *Rev Mex Cs Ars.* 5(6): 992-999.
- Yuen J. W. M. & M. D. I. Gohel. 2005. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. *Nutr Cancer.* 53:11-7.
- Zamora-Magdaleno Ma. T., J. Cajuste-Bomtemps, Ma. T. B. Colinas-León & H. Santacruz-U. 1999. Efecto de los daños mecánicos sobre el comportamiento postcosecha de fruto de aguacate. *Rev Chap Hort* 5, 319-328.
- Zhu, H., W. Liu, B. Tian, H. Liu, S. Ning. 2011. Inhibition of quorum sensing in the opportunistic pathogenic bacterium *Chromobacterium violaceum* by an extract from fruiting bodies of lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Med. Mushr.* 13, 559–564.

DICTIOTOPOGRAFÍA

- Huisell. Producto Fludioxonil y Fludioxonil 25% FS 25g/l FS utilizada para papa. En <https://spanish.alibaba.com/product-detail/good-product-fludioxonilfludioxonil-25-fs-25g-l-fs-used-for-potato-1600168369638.html>
- Indexfungorum.En<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=315260>, Fecha de consulta: 10 de abril del 2019.
- Indexfungorum.En<http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDSpecies.asp?RecordID=119545>, Fecha de consulta: 17 de marzo del 2021.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avances de siembras y cosechas 2017. En <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>, Fecha de consulta: 01 de mayo del 2019.
- Valenzuela-Garza R. (2010). *Humphreya coffeata*. Banco de imágenes. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). En <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5002Hongos/Hongos/RVG0049%20Humphreya%20coffeata.jpg.info>, Fecha de consulta: 07 de marzo del 2021.

Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Efecto de *Humphreya coffeata* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*”**”, que presenta el alumno **BENJAMÍN AMARO GUADARRAMA**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. Maura Téllez Téllez
Profesora Investigadora UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2021-05-05 20:25:02 | Firmante

Pm4+qRzLkBfflhlidsLfAC3wFY1FciROKiD6NtNNXCryILqG370RpadNQwYmhtZg1YdihD7nXEUYmqax792c0JQgU614ZHlzdUjMPoMRn7WN31/IM97or7F1cv6SiTBU5RFdoyxBwVmKgNx+QSWxD+U+oMY4qeYufgLfVY95blRzqgXCv7Gf6fkFDBRtDgKwAmJSAZ/7LmhTdSws53mlR2tMOSmFqsb7U5oEnoJ5Y2PM0ZQge7MqJ8k0JeHVTDtsjVDGLaPO Nj12CN7b9kzAREpbXAnfeyY1tuot3duyzJKq9wJX9b+M39ssHe5Dh197sVtxolyupnNbPGuD4paw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



8fAln4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/KX00EKPQZ3mYHe3b3rUNbw0YyfrFuS7U>



Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021



**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Efecto de *Humphreya coffeata* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*”**, que presenta el alumno **BENJAMÍN AMARO GUADARRAMA**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta
Profesora Investigadora UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2021-05-05 19:37:55 | Firmante

oXhC+P8gORtwS4zDz3dzK3RJV1/V+wrKPI94OskSQA472+EZzPa7xOBnhT1XqfhrnuG/cCGCzI94XiVen2Qc1hmd5FkrqN9S+9obM6rddb4/XcXjNBSVcn5bXVPkZoUJu63sZ+td+8BP8q1T+Al2doCGNn+G6/a5W8bVeTEbUx4918TWCjmewv7hB59S+T+XV7HXAbZTnSeRru+oVPfvmqa/S4qFck/du9YoA1LCHbqQh+n5URmWD0glMOXA3MID4Pt7M4bSGwjE4fSp+By+PwT3BgwEPbj4DYbbSh1kuQtw9dbA0BVJkOg5lelu4qtbiRgse42JjLyMD/DGCWGMwQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3UdCjb

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RqsxxJVnTJgmJMVg8bmclcysc7Aslv6J>



Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Efecto de *Humphreya coffeata* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer***”, que presenta el alumno **BENJAMÍN AMARO GUADARRAMA**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Gerardo Díaz Godínez
Profesor Investigador UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERARDO DÍAZ GODÍNEZ | Fecha:2021-05-09 12:24:16 | Firmante

IjkqhySKIs86dcqg1fle2DfT6IMFXc/6TRjJWF4SJHp0Oi+pqvwm7rTIW+9cyVB83St+Wz7BNxqq1EGHLwjlYADjttNnptFIPgv3x6TRBv3AQgQ3ub5Ak866Ti7/moH5EBfOVbxwpb2f dtOLn6P9H59XkiJ2F2/pJlXlcVbtYoihSVKVLbg5g4l6z9jqswnbbzH5mmdT4NtqFnPy4/qRF7YhjjLkj69UJI9JuPiuqk2tWC+NTY2JGHcyhfVbBuM3OWI8eeSCsxjcQhVK5XApqC6fA cU9A1pO+lwcZnc1ktpPqRomw/p9deLRc+qy46qTXSP7yuYuLpErGUqSma+g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Z8BgTe

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pBI7IOgcT9hYZhajnmF3REYq9IM0dOh>



Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Efecto de *Humphreya coffeata* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*”**”, que presenta el alumno **BENJAMÍN AMARO GUADARRAMA**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Edgar Martínez Fernández
Profesor Investigador UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2021-05-12 11:53:29 | Firmante

l0jGTnkletmo3hibrA4bHk5xDde7Caairm8+ifYZXuUKxch1QYXQD23ILBngAT2YP11YkLqoePk1QysyziJE8NI1ztC0XzdnsOHheeRooYjZk1eMjVnNZI5EpFgAkdGa5ZQ6klrWnhEyPI1JoOBDDamyvcerpj95sxqv60wuEqVBa3aJ7QLXsJXAdZkiBptS84whsJP1xPZh689Hx3uszlsvmYgEHvGkbhiHgD3VEjjLC1stVrINBhod+DWHphKbCQP1uGpCnTLkKajRs717EAUz29xAeZvpj6GxxhwDI8mBOGyXBOCKKhGgV+6Eg1XPlyOmsVZNyFRJmpnf16kQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[EvYlKy](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fXrdYvXLEk0VzmU0Bzza1v3pOdjAcWtM>



Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Efecto de *Humphreya coffeata* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*”**”, que presenta el alumno **BENJAMÍN AMARO GUADARRAMA**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Guadalupe Peña Chora
Profesor Investigador UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2021-05-05 17:09:02 | Firmante

2kl0mvVktT1e6u1T+Fd235yzBUoc+jZi228+kVOwGnGuTRVwBRjqVvEqXW/1XdoHM499ADnkmbjmlUR88KsGI68U7v2jPmYtAjHnNn5uHxI5Ni/vjIMrzLq8II2XC1QHZrhS3R5KHwoZFFRtH3pJy/f7Es7b2eNBaAzfhkzrwDi+JMBeBABcfGyY2bUQXHjcSxX2PQfVYYuqFANcGj7ExvhVM2FSDIPjvLVLZQc4LkJpyGkK3bZkt8Hui5WS4GKUPqOCFnBXDKjCulAr6w+l5+8s+wwzZrIzgtFlr49G+Qwg2kx6BtlL3ct3+PPJVjiYZFFBRRnZO6omluRifYYUeg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[zEL5j4](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AhUvQI9UG4r6x99Q2SjvMj1PaznIGPaA>

